

**UNIVERSIDAD DE GRANADA**

**Facultad de Farmacia**  
*Departamento de Química Física*



*Síntesis, fotofísica y aplicación a la espectroscopía de  
correlación de fluorescencia de derivados xanténicos  
útiles como sondas fluorescentes “on/off”*

**TESIS DOCTORAL**

***José Manuel Paredes Martínez***

*Granada, 2010*

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: José Manuel Paredes Martínez  
D.L.: GR 2402-2010  
ISBN: 978-84-693-1306-0



*Síntesis, fotofísica y aplicación a la espectroscopía  
de correlación de fluorescencia de derivados  
xanténicos útiles como sondas fluorescentes “on/off”*

*Los Directores,*

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

*Fdo. Dr. Luis Crovetto González  
(Profesor Ayudante Doctor)*

*Fdo. Dr. Ángel Orte Gutiérrez  
(Profesor Ayudante Doctor)*

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

*Fdo. José Manuel Paredes Martínez  
Granada, 2010*



# *Índice*



---

<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>I.1 JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO</b>	3
<b>I.2. DERIVADOS DE LA FLUORESCENCIA TG-I, TG-II Y OTROS DERIVADOS</b>	8
I.2.1. Usos de la fluorescencia	8
I.2.2. Limitaciones de la fluorescencia	10
I.2.3. Derivados de la fluorescencia	15
I.2.3.1. Familia Tokyo Green	21
I.2.3.1.1 Tokyo Green-I y Tokyo Green-II	25
I.2.3.1.1.1. Características fundamentales	26
I.2.3.1.1.2. Aplicaciones	26
<b>I.3. ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA CON RESOLUCIÓN TEMPORAL: CONTAJE DE FOTONES INDIVIDUALES CORRELACIONADOS EN EL TIEMPO</b>	36
I.3.1. Fundamentos de la técnica TCSPC	37
I.3.2. Fuentes de luz para la técnica TCSPC	40
I.3.2.1. Lámparas de flash	41
I.3.2.2. Radiación de sincrotrón	42
I.3.2.3. Láseres de colorantes de picosegundos	42
I.3.2.4. Láseres de Titanio:Zafiro (Ti:Sa) de femtosegundos	43
I.3.3. Detectores para instrumentos de TCSPC	45
I.3.3.1. Fototubos de díodos en cadena	46
I.3.3.2. Fototubos multiplicadores de platos de microcanales	46
I.3.3.3. Fotodiodos	47

I.3.4. Integral de convolución. Análisis de los decaimientos	48
<b>I.4. REACCIONES DE TRANSFERENCIA PROTÓNICA EN EL ESTADO EXCITADO (ESPT)</b>	<b>51</b>
I.4.1. Antecedentes históricos sobre ESPT	51
I.4.2. Reacciones ESPT en presencia de un aceptor/dador protónico	65
I.4.3. Reacciones ESPT de la fluoresceína	72
I.4.4. Identificabilidad del sistema compartimental	79
<b>I.5. MÉTODOS DE ANÁLISIS</b>	<b>84</b>
I.5.1. Análisis no lineal por mínimos cuadrados (NLLS)	84
I.5.1.1. Requerimientos para un análisis NLLS	85
I.5.1.2. Mínimos cuadrados	85
I.5.1.3. Estimación de la bondad del ajuste	87
I.5.1.4. Análisis global	89
I.5.2.- Análisis global compartimental	90
I.5.2.1. Definición de compartimento. Análisis compartimental	90
I.5.2.2. Análisis compartimental en fotofísica	95
I.5.2.3. Teoría del análisis global compartimental para procesos en el estado excitado	99
I.5.3. Comparación entre el análisis global y el análisis global compartimental	106
<b>I.6. ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA DE MOLÉCULAS INDIVIDUALES</b>	<b>113</b>
I.6.1. Espectroscopia de correlación de fluorescencia	117
I.6.1.1. Fundamentos	117

---

I.6.1.2 Instrumentación	129
I.6.1.3 Modificaciones	131
I.6.1.4. Aplicaciones y futuro	134
<b>II. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>137</b>
<b>II.1. INSTRUMENTACIÓN</b>	<b>139</b>
II.1.1.- pH-metro	139
II.1.2.- Balanza	139
II.1.3.- Espectrofotómetro de absorción	139
II.1.4.- Espectrofluorímetro en estado estacionario	140
II.1.5.- Fluorímetro con resolución temporal y excitación láser	141
II.1.5.1.- Fuente de excitación láser	141
II.1.5.2.- Sistema TCSPC	142
II.1.6.- Microscopio invertido de fluorescencia en tiempo resuelto	144
II.1.7.-Espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear	148
<b>II.2.- REACTIVOS</b>	<b>149</b>
<b>II.3.-METODOLOGÍA</b>	<b>150</b>
II.3.1.- Síntesis de los colorantes Tokyo Green I y Tokyo Green II	150
II.3.2.- Preparación de las disoluciones	151
II.3.3.1.- Experimentación con el Tokyo Green-I	152
II.3.3.2.- Experimentación con el Tokyo Green-II	153
II.3.4.- Procedimientos experimentales	154

II.3.4.1.- Medidas de absorción	155
II.3.4.2.- Medidas de fluorescencia en estado estacionario	155
II.3.4.3.- Fluorescencia resuelta en el tiempo a nivel de conjunto	156
II.3.4.4.- Medidas de fluorescencia a nivel molecular	157
II.3.4.5.- Espectroscopia de RMN	157
II.3.5. Tratamiento de los datos y métodos de análisis	161
II.3.6. Modelo compartimental	161
II.3.7. <i>Time-Tagged Time-Resolved</i> (TTTR)	170
II.3.8. Espectroscopía de correlación de fluorescencia. (FCS)	172
II.3.8.1. Difusión	173
II.3.8.2. Cruce entre sistemas	178
II.3.8.3. Correlación cruzada	182
II.3.9. Análisis de funciones de autocorrelación con ventana temporal	184
<b>III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	187
<b>III.1. FOTOESTABILIDAD</b>	189
<b>III.2. ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN Y EQUILIBRIO EN EL ESTADO FUNDAMENTAL</b>	191
III.2.1. Estudio del equilibrio ácido-base y obtención de los espectros de absorción de las especies prototrópicas en disolución acuosas	191
III.2.1.1. Obtención de $\epsilon_A$	193

---

III.2.1.2 Obtención de $\varepsilon_N$	298
III.2.1.3. Obtención de $\varepsilon_c$	205
<b>III.3. ESPECTROSCOPIA DE EMISIÓN DE FLUORESCENCIA EN ESTADO ESTACIONARIO Y CARACTERIZACIÓN DE LA EMISIÓN DE LAS ESPECIES PROTOTRÓPICAS EN DISOLUCIÓN ACUOSA</b>	209
<b>III.4. INFLUENCIA DE LA FUERZA IÓNICA SOBRE EL VALOR DEL <math>pK_a</math></b>	216
III.4.1. Obtención de los valores de $pK_a^{app}$	216
III.4.1.1. Determinación de $pK_a^{app}$ por método absorciométrico	216
III.4.1.2. Determinación de $pK_a^{app}$ por método fluorimétrico directo	221
III.4.1.3. Determinación de $pK_a^{app}$ por método fluorimétrico ratiométrico	224
III.4.2 Obtención del valor de $pK_a$ termodinámico	227
III.4.3. Equilibrios ácido-base del TG-I y del TG-II y dimensiones moleculares	231
<b>III.5. ESTUDIO DE LAS REACCIONES DE TRANFERENCIA PROTÓNICA EN ESTADO EXCITADO DEL TG-I Y DEL TG-II MEDIANTE FLUORIMETRÍA EN ESTADO ESTACIONARIO</b>	235
III.5.1. Influencia de un aceptor/dador protónico en la intensidad de fluorescencia del sistema neutro/anión	235
III.5.2. Cálculo de $pK_a^*$ de la reacción neutro/anión, mediada por la presencia de un aceptor/dado protónico	238

<b>III.6. SISTEMA BICOMPARTIMENTAL <math>N^* \rightleftharpoons A^*</math> EN AUSENCIA Y PRESENCIA DE TAMPÓN FOSFATO COMO ACEPTOR/DADOR PROTÓNICO. FLUORIMETRÍA CON RESOLUCIÓN TEMPORAL</b>	243
III.6.1. Análisis global del sistema $N^* \rightleftharpoons A^*$ en ausencia de aceptor/dador de protones	244
III.6.2. Análisis global del sistema $N^* \rightleftharpoons A^*$ en presencia de aceptor/dador de protones	251
III.6.3. Análisis global bicompartimental	258
<b>III.7. ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA DE MOLÉCULAS INDIVIDUALES</b>	265
III.7.1. Obtención del tiempo de vida fluorescencia del Tokyo Green-II a través de medidas a nivel molecular	265
III.7.2. Espectroscopía de correlación de fluorescencia (FCS)	268
III.7.2.1. Estudio del cruce entre los estados singlete y triplete	269
III.7.2.2. Estudio de las constantes cinéticas del estado fundamental del equilibrio neutro – anión	272
III.7.2.3. Obtención del valor de $pK_a$	278
III.7.2.4. Estudio de la influencia del tampón fosfato en las constantes cinéticas del equilibrio $N \rightleftharpoons A$ del TG-II	280
III.7.2.5.- Estudio de la influencia de otros tampones en el equilibrio químico $N \rightleftharpoons A$ mediante espectroscopía de correlación de fluorescencia	293
III.7.2.5.1.-Influencia del tampón HEPES y trizma	293

III.7.2.5.2.-Influencia del tampón acético/acetato en el equilibrio químico $N \rightleftharpoons A$	299
<b>IV. CONCLUSIONES</b>	305
<b>V. BIBLIOGRAFÍA</b>	313



# *I. Introducción*



## I.1. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

Los sensores son dispositivos capaces de registrar de forma directa, continua y reversible una sustancia particular, pudiendo determinarla cualitativa o cuantitativamente. Las propiedades de los sensores fluorescentes se utilizan con ventaja en todo tipo de investigaciones ya sean químicas, biológicas, médicas, etc., ya que la mayor ventaja que presenta la fluorescencia es su enorme sensibilidad, además de una sencilla automatización y costes no excesivamente elevados.

Históricamente, una de las moléculas más utilizadas como marcador biológico ha sido la fluoresceína, ya que posee elevado rendimiento cuántico de fluorescencia junto a un alto coeficiente de extinción a 490 nm. Debido a su amplio uso, nuestro grupo de investigación ha efectuado varios estudios en los que se usa este colorante como etiqueta fluorescente y ha desarrollado diversas metodologías aplicables al análisis biológico (*Yguerabide et al., 1996; Álvarez-Pez et al., 1997; Talavera et al., 1997, 2000, 2003*).

La fluoresceína en disolución acuosa se presenta bajo cuatro diferentes formas prototrópicas en función del valor de pH, a saber; catión, neutro, monoanión y dianión. A su vez, la forma neutra se presenta bajo tres formas tautoméricas; lactona, cetona y zwitterión. Los coeficientes de extinción y los rendimientos cuánticos de fluorescencia son muy distintos para las diferentes especies prototrópicas. A pH cercano al fisiológico solo tiene lugar el equilibrio monoanión-dianión, y ambas especies presentan espectros de absorción y de fluorescencia diferentes. El dianión posee mayores coeficientes de extinción y rendimientos cuánticos que el monoanión y esto provoca una gran sensibilidad de la señal fluorescente frente al pH.

Hace algunos años se abordó un proyecto de investigación en nuestro grupo para estudiar las reacciones de transferencia protónica en el estado excitado (ESPT) entre el monoanión y dianión de fluoresceína, mediante fluorimetría en estado estacionario (*Yguerabide et al., 1994*). Una vez demostrado que la reacción ESPT tiene lugar, se propuso un modelo en dos estados excitados en presencia de un dador/aceptor protónico, deduciendo las expresiones teóricas derivadas del modelo, que fueron utilizadas para recuperar los parámetros cinéticos y espectrales del sistema estudiado. Los resultados muestran que los dos tiempos de vida de fluorescencia se hacen dependientes del pH y de la concentración de fosfatos, tal y como predice la teoría elaborada (*Álvarez-Pez et al., 2001*).

Como la fluoresceína se emplea asiduamente en el etiquetado de proteínas y estas pueden contener aminoácidos con grupos dadores/aceptores protónicos, también se abordó el estudio de las interacciones entre el citado colorante y un modelo de aminoácido con un grupo dador/aceptor protónico libre (N-acetil-aspártico). El sistema fluoresceína/N-ac-as resultó tan complejo que, para recuperar los parámetros cinéticos y espectrales, se necesitó aplicar el análisis global compartimental (GCA), una poderosa herramienta que permite analizar una superficie de decaimientos de fluorescencia recogidos a diversas longitudes de onda de excitación y de emisión y a distintos valores de pH (*Crovetto et al., 2004*). Seguidamente, se realizó un estudio teórico para proponer las condiciones experimentales necesarias para que los parámetros recuperados mediante GCA fueran identificables de forma única (*Boens et al., 2004*).

Debido al uso en aumento de las técnicas fluorimétricas en los análisis químicos y biológicos, se ha generado una extensa investigación sobre nuevos y mejorados fluoróforos. Entre estos se encuentra el derivado fluorado de la fluoresceína, 2',7'-difluorofluoresceína (Oregon Green 488) que tiene mayor

fotoestabilidad que la fluoresceína y la está desplazando de su uso habitual como etiqueta fluorescente de biomoléculas. Con este sistema se realizó la extensión del modelo cinético a un sistema en tres estados excitados sucesivos, ya que los valores de  $pK_a$  entre las 4 especies prototrópicas en el estado fundamental son bastante próximos entre sí, lo que permite que a un pH adecuado, existan simultáneamente tres especies prototrópicas (*Orte et al., 2005,a,b,c*). Se debe aclarar que las reacciones en estado excitado en la 2',7'-difluorofluoresceína (OG488) son promovidas por las especies dadoras/ceptoras protónicas del tampón formado por ácido acético y acetato sódico.

En resumen, la presencia de estas reacciones ESPT modula los decaimientos de fluorescencia de la fluoresceína y de sus derivados, mostrando diferentes tiempos de decaimiento en función tanto del pH, como de la concentración de tampón. Sin embargo, la naturaleza bi-exponencial de los decaimientos de estos colorantes, hace difícil su aplicación como sensores basados en el tiempo de vida de fluorescencia. Por esta razón, pensamos que sería muy útil poder encontrar un colorante que muestre un solo tiempo de vida, cuyo valor pueda ser tuneado mediante la concentración de fosfato, a un determinado pH. Así se dispondría de una forma directa de analizar la concentración del ión fosfato en una disolución compleja.

En el año 2005, se sintetizaron varios derivados de fluoresceína llamados Tokyo Green (**TG**) (*Urano et al., 2005*). En tales derivados se ha reemplazado el grupo carboxilo del ácido benzoico por un grupo metilo o metoxi, lo cual implica que solo puede existir una forma aniónica, lo que disminuye el número de especies prototrópicas en disolución y simplifica el número de equilibrios entre ellas. Además, entre estos derivados, el 9-[1-(2-Metoxi-5-metilfenil)]-6-hidroxi-3H-xanten-3-ona (**TG-I**) y 9-[1-(2-Metil-4-metoxifenil)]-6-hidroxi-3H-xanten-3-ona (**TG-II**) se pueden considerar como

sondas fluorescentes “on/off” alrededor del valor de pH fisiológico, ya que el anión fluoresce con intensidad aceptable a pHs ligeramente básicos, mientras que el rendimiento cuántico de la forma neutra, a pHs ligeramente ácidos es prácticamente cero. Esta característica, en principio, hace interesante el estudio de las reacciones ESPT mediadas por un dador/aceptor de protones adecuado, ya que nuestro objetivo es la búsqueda de un colorante que muestre un único tiempo de vida en determinadas condiciones experimentales que, además, se pueda sintonizar a valores de pH cercanos a la neutralidad, mediante la variación de la concentración de fosfatos.

En base a los motivos expuestos, se propone en esta Memoria la síntesis de los dos derivados TG anteriormente mencionados que se comportan como sondas “on/off”. Además, debido a la escasa información disponible sobre estos compuestos, se plantea su estudio fotofísico detallado, al objeto de aportar la información cuantitativa necesaria para su utilización como etiquetas fluorescentes de biomoléculas. Para ello, se aplicará el análisis global compartimental, GCA, al sistema en dos estados excitados que se planteará en las cercanías del pH fisiológico, al objeto de recuperar los parámetros cinéticos y espectrales correspondientes. Finalmente se desea también investigar la reacción de transferencia protónica mediada por la presencia de dadores/aceptores protónicos a nivel de moléculas individuales, mediante la espectroscopia de correlación de fluorescencia (FCS).

En resumen, el objetivo final de esta Memoria es servir como base para una interpretación más correcta de la señal fluorescente en las aplicaciones donde los Tokyo Green se presenten como mejores alternativas al uso de otros colorantes, así como comprobar la capacidad de estos colorantes de ser utilizados como sensores fluorescentes del valor de pH en virtud de sus propiedades “on/off”, y como sensores de la concentración ambiental de

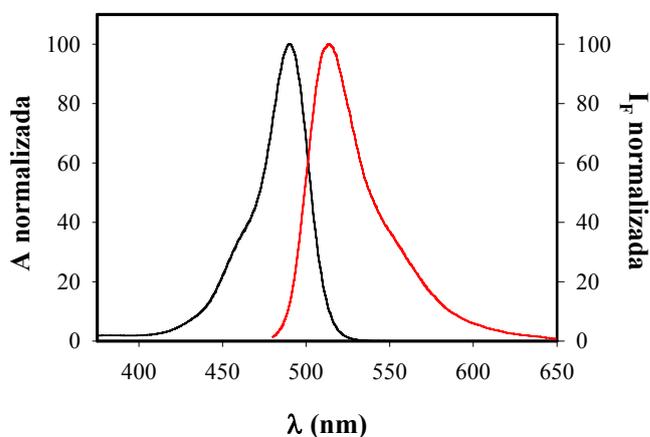
fosfatos en las cercanías del pH fisiológico, a través de la reacción de transferencia protónica.

## I.2. DERIVADOS DE LA FLUORESCÉINA. TOKYO GREEN-I, TOKYO GREEN-II Y OTROS DERIVADOS.

### 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 absorptividad molar, excelente rendimiento cuántico y buena solubilidad en agua. Tiene un máximo de absorción a 490 nm (figura I-1), cercano a la línea del láser de argón (488 nm). Presenta un máximo de emisión a 514 nm y su rendimiento cuántico de fluorescencia es 0.94, a 22°C, en disolución acuosa de NaOH 0.1 M (Haugland, 2002). Adicionalmente, la posibilidad de prepararla con un alto grado de pureza, hace que se emplee como fluoróforo de referencia. La fluoresceína ha sido muy utilizada en microscopía confocal con barrido láser (Miller *et al.*, 1994; Wells y Johnson, 1994) y también se usa extensamente en citometría de flujo (Feldhaus *et al.*, 2003; Vermes *et al.*, 1995). Además es quizás el colorante más empleado en el etiquetado de macromoléculas y macroestructuras de interés biológico, lo que se consigue mediante la síntesis de ciertos derivados activos frente a determinados grupos químicos específicos. Los derivados más empleados han sido el isotiocianato y el éster succinimídico, que reaccionan fácilmente con aminas primarias. Las macromoléculas etiquetadas con fluoresceína se pueden detectar con una gran sensibilidad, por lo que han sido muy utilizadas en combinación con técnicas de separación 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. Así, se ha usado para

medir distancias entre macromoléculas doblemente etiquetadas (Murchie *et al.*, 1989), o en la detección de interacciones entre macromoléculas, como puede ser en la detección de la hibridación de ADN en medios homogéneos (Talavera *et al.*, 1997, 2003). 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).



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

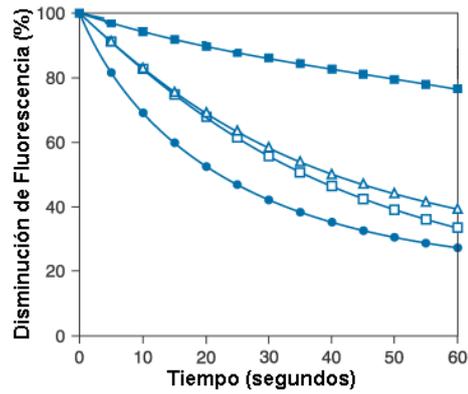
A continuación, y simplemente como ejemplos de su extendido uso, se citarán algunos campos de la Ciencia muy diferentes en donde la fluoresceína está siendo empleada: conversión de energía solar (Chan y Bolton, 1980), biología (Yu *et al.*, 2002), veterinaria (Somanath y Gandhi, 2002), contador cuántico (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 ADN (Singer *et al.*, 1997; Wittwer *et al.*, 1997), hibridación de ADN (Talavera *et al.*,

1997, 2000, 2003), ADN 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 sobre agua y marinos (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), medioambiente (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.

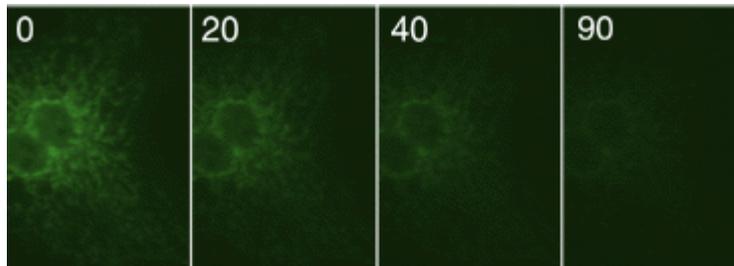
### I.2.2. Limitaciones de la fluoresceína.

La fluoresceína y sus conjugados en macromoléculas tienen algunos inconvenientes. Entre éstos se pueden citar:

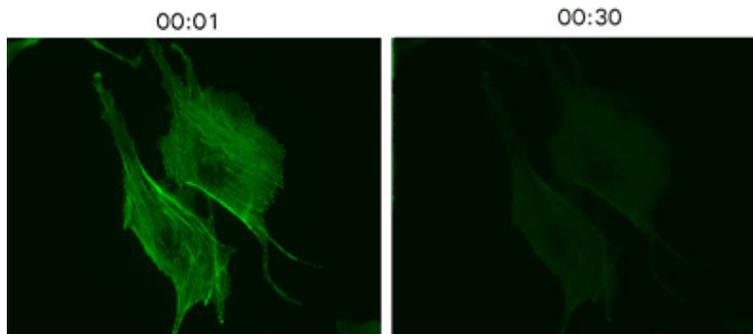
- Su velocidad de fotoblanqueamiento relativamente alta (Song *et al.*, 1995, 1996). En las figuras I-2 – I-5 se muestran algunos ejemplos de este efecto sobre la fluoresceína y derivados.



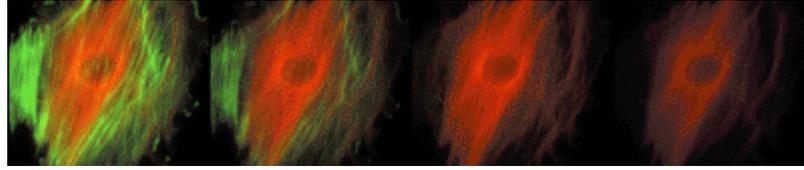
**Figura I-2.** Comparación de la fotoestabilidad de diferentes fluoróforos conjugados con anticuerpos. Oregon Green 514 (■), BODIPY FL (▲), Oregon Green 488 (□) y fluoresceína (●) (Haugland, 2002).



**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).

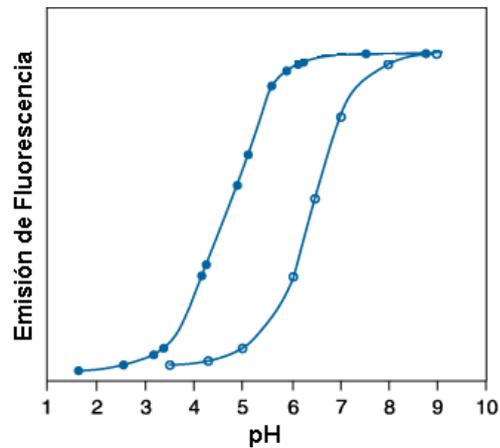


**Figura I-4.** Células del endotelio de arteria pulmonar bovina etiquetadas con fluoresceína-faloidina. Las imágenes fueron recogidas en el primer segundo y a los treinta segundos a partir del comienzo de la iluminación de la muestra (Haugland, 2002).



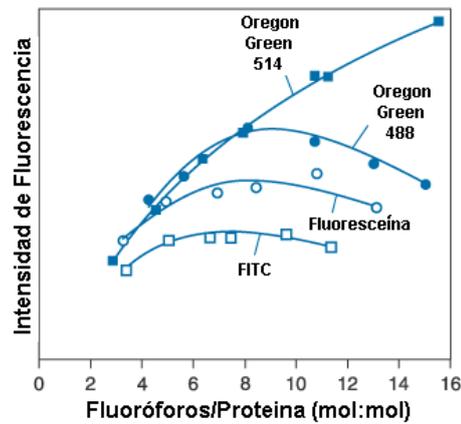
**Figura I-5.** Citoesqueleto de células endoteliales de arteria pulmonar bovina etiquetado con fluoresceína-faloidina (fluorescencia verde) y el fluoróforo Cy3 (fluorescencia roja). Las imágenes se recogieron en intervalos de 30 segundos tras el inicio de la exposición (*Haugland, 2002*).

- Otro problema que presenta la fluoresceína es que su fluorescencia depende de forma notable del pH del medio en los alrededores de la neutralidad (*Yguerabide et al., 1994; Sjöback et al., 1995*). La intensidad de fluorescencia se reduce significativamente por debajo del valor de pH 7 (figura I-6), debido al  $pK_a$  y a los diferentes rendimientos cuánticos de las especies prototrópicas. Sin embargo, esta dependencia con el pH ha sido explotada con ventaja utilizándose como sonda de pH intracelular (*Alvarez-Pez et al. 2001*). Otros derivados como la 2',7'-bis-(2-carboxietil)-5-(y -6)-carboxifluoresceína (BCECF) poseen mejor retención en el interior celular (*Rink et al., 1982; Paradiso et al., 1984*).



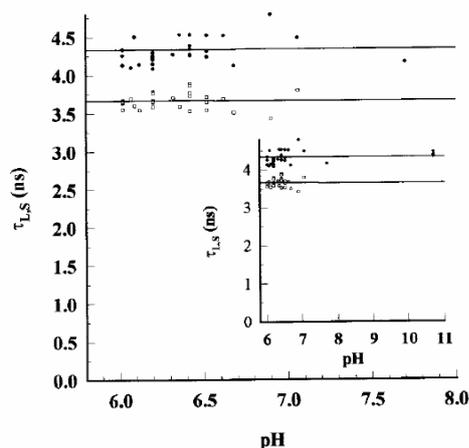
**Figura I-6.** Comparación de la dependencia de la fluorescencia con el pH de los fluoróforos Oregon Green 488 (●) y carboxifluoresceína (○). Las intensidades de fluorescencia se midieron a las mismas concentraciones de las dos moléculas con excitación a 490 nm y emisión a 520 nm (*Haugland, 2002*).

- El espectro de emisión de fluorescencia es relativamente ancho, lo que limita 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, ya que la cercana proximidad entre los fluoróforos origina un sensible *quenching* de fluorescencia (Zuk *et al.*, 1979; Chen y Knutson, 1988; Chapple *et al.*, 1990; Talavera *et al.*, 1997) (figura I-7).



**Figura I-7.** Fluorescencia relativa en función del número de fluoróforos unidos por proteína, preparados empleando ésteres succinimídicos de los ácidos carboxílicos del Oregon Green 514 (■), Oregon Green 488 (●), fluoresceína (○) e isotiocianato de fluoresceína (FITC, □) (Haugland, 2002).

- La fluoresceína presenta un decaimiento biexponencial en los alrededores del pH fisiológico (Álvarez *et al.*, 2001) (figura I-8), lo que dificulta su aplicación en las técnicas de fluorescencia basadas en la medida de los tiempos de vida de los colorantes, como es el caso de la microscopía de imágenes de tiempos de vida de fluorescencia (FLIM, por sus siglas en inglés).



**Figura I-8.** Tiempos de vida recuperados de la fluoresceína en un rango de valores de pH alrededor de 7.00, regulado con tampón de fosfatos 1 mM. En la gráfica insertada, se observa un rango de valores de pH más amplio. A partir de un valor de pH de 7.70 se recupera un único tiempo de vida (*Alvarez-Pez et al., 2001*).

El fotoblanqueamiento y la dependencia de la fluorescencia con el valor del pH hacen que las medidas cuantitativas sean a veces problemáticas. Como es lógico, la relativamente alta velocidad de fotoblanqueamiento limita la sensibilidad de los análisis, como así sucede por ejemplo en secuenciación de ADN, o en la detección de la hibridación de ADN en medios homogéneos (*Talavera et al., 2000*), etc. Sin embargo, como se ha indicado anteriormente, es posible utilizar estas características como una ventaja, ya que, el cambio producido en la emisión fluorescente permite utilizar a la fluoresceína como sensor de pH, o incluso como sensor de aquellos parámetros que alteren la proporción entre los estados prototrópicos implicados (*Alvarez-Pez et al., 2001*).

Con objeto de aprovechar al máximo estas propiedades, se ha generado un gran interés en el desarrollo de fluoróforos alternativos con mayor sensibilidad al medio. 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, ha motivado que se hayan buscado y se busquen, sustitutos con características espectrales similares.

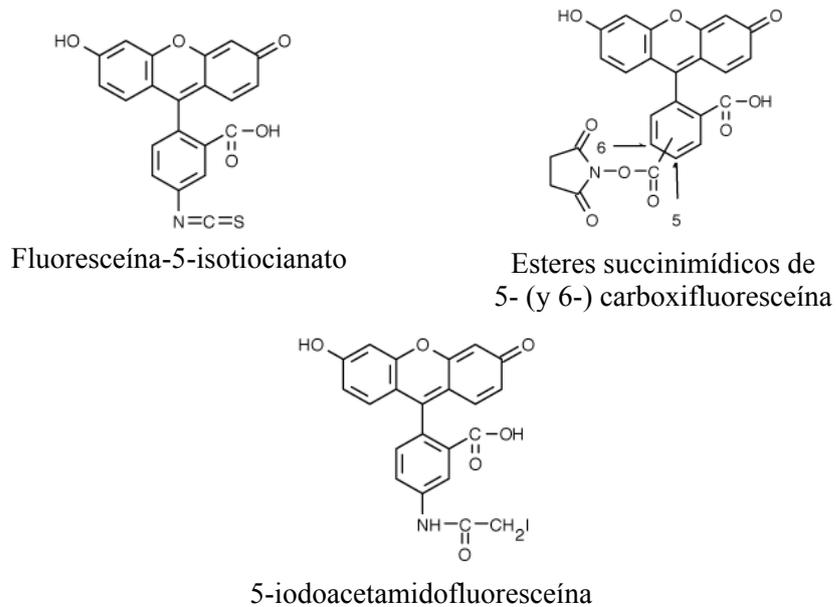
### I.2.3. Derivados de la fluoresceína.

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

Ejemplos de los más empleados 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 derivados 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 química de este grupo reactivo con otro específico de la estructura a etiquetar, con lo que la fluoresceína queda unida a la otra molécula. Por otro lado, los derivados que muestran diferentes isómeros (sustituciones en las posiciones 5 o 6) tras su síntesis pueden presentar ciertas complicaciones. Los espectros de ambos isómeros son prácticamente indistinguibles, tanto en longitud de onda como en intensidades. Pero 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.

Como ejemplos de las aplicaciones más comunes del isotiocianato de fluoresceína se puede citar su empleo en estudios de hibridación de ácidos nucleicos (*Dirks et al., 1990; Talavera et al., 1997, 2000, 2003*). Asimismo, se han separado péptidos y aminoácidos etiquetados con isotiocianato de

fluoresceína mediante electroforesis capilar, alcanzándose límites de detección de unas 1000 moléculas (*Wu y Dovichi, 1989*). También se ha empleado para detectar proteínas en gel (*Vera et al., 1988*) y en membranas de nitrocelulosa (*Houston y Peddie, 1989*). Por otra parte, se ha aprovechado la transferencia de energía entre moléculas de fluoresceína en el seguimiento del ensamblaje entre distintas subunidades de una proteína (*Sims, 1984*).



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

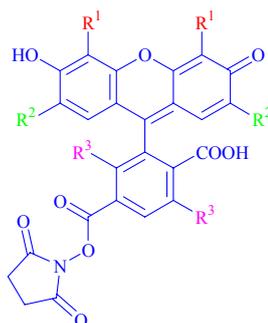
Los ésteres succinimídicos de fluoresceína permiten la introducción de brazos espaciadores hidrofóbicos que separan el fluoróforo de la macromolécula etiquetada. Esta separación reduce en gran medida el *quenching* usualmente observado en la conjugación biomolécula-fluoróforo. Además, los espaciadores 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*).

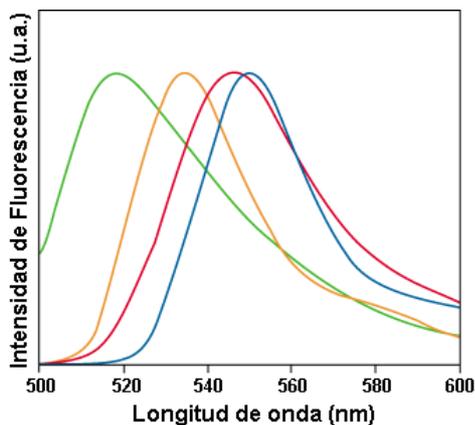
Una familia interesante de derivados de la fluoresceína son los halogenados. La halogenación confiere a las moléculas unas características especiales, presentando algunas diferencias con la fluoresceína. Ejemplos interesantes son la eosina (2',4',5',7'-tetrabromofluoresceína), eritrosina (2',4',5',7'-tetraiodofluoresceína) 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 de gran interés 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-9). Se han utilizado en secuenciado 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-9.** 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. Además, determinaron 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 se puede utilizar igualmente como marcador fluorescente de macromoléculas, a través de sus derivados reactivos, debido a su menor valor de  $pK_a$ . No obstante, su campo de aplicación es bastante más amplio. Así, se ha utilizado en la detección de los cambios en el  $H_2O_2$  intracelular (Royall e Ischiropoulos, 1993) que se producen por la generación endotelial de oxígeno activo, lo que se emplea como medida de varias alteraciones patológicas (Freeman et al., 1986; Brigham et al., 1987; Kvietyš et al., 1989). Esta aplicación se ha desarrollado ampliamente 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 estos temas 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 una revisión reciente y extensa, al respecto.

La medida del valor de pH de ciertos orgánulos celulares, cuyo pH es ácido, también es un uso 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. Debe resaltarse que el pH anormalmente bajo en lisosomas se ha relacionado con determinadas patologías, por ejemplo 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).

También se se ha empleado recientemente en química analítica. 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 ión 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 algunos 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, ya que los compuestos sobre los que versa esta Memoria, son los derivados de la fluoresceína 9-[1-(2-metoxi-5-metilfenil)-6-hidroxi-3-H-xantén-3-ona (**Tokyo Green I, TG-I**) y 9-[1-(2-metil-4-metoxifenil)-6-hidroxi-3-H-xantén-3-ona (**Tokyo Green II, TG-II**), la próxima sección se ocupará de la familia de los Tokyo Green, recientemente sintetizadas (Urano et al. 2005).

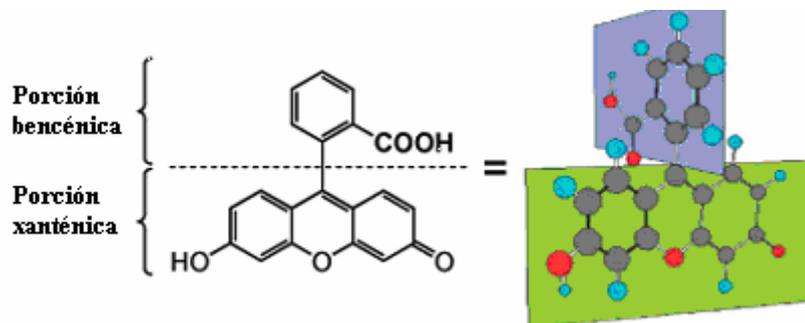
#### I.2.3.1. Familia Tokyo Green

Los denominados Tokyo Green son unos nuevos colorantes derivados de la fluoresceína que se han sintetizado recientemente con el objeto de mejorar las propiedades fotofísicas de aquella, para su empleo como sensores fluorescentes. La característica fundamental comúnmente buscada en las sondas fluorimétricas es que su fluorescencia antes de reaccionar o enlazarse a una biomolécula sea prácticamente nula, pero que resulte altamente fluorescente después de la reacción o enlace, aunque el hecho contrario también tiene un alto interés. Esto hace que continuamente se busquen colorantes fluorescentes “on/off”, es decir, que bajo determinadas condiciones posean una fluorescencia considerable, mientras que bajo otras circunstancias no presenten ninguna fluorescencia. Inicialmente, el mecanismo de la característica “on/off” de

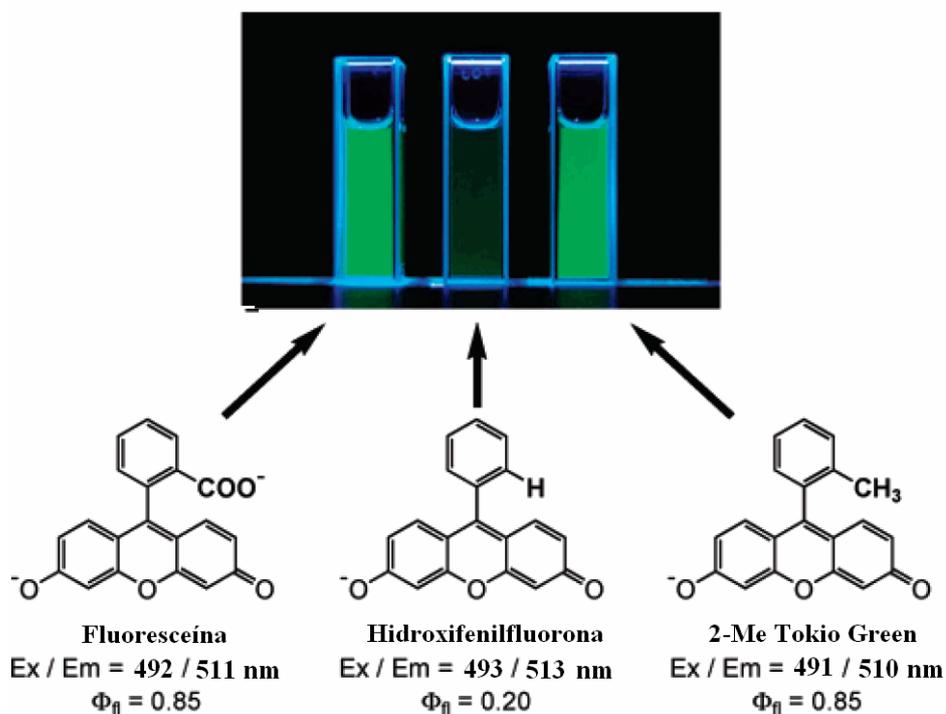
algunos derivados de la fluoresceína no era conocido, ya que solo era accesible una limitada información empírica de las propiedades fluorescentes de los derivados (*Munkholm et al., 1990*). Sin embargo, recientemente se demostró que en la fluoresceína enlazada a un sistema dador-aceptor, la transferencia electrónica fotoinducida determina los rendimientos cuánticos fluorescentes, (*Miura et al. 2003*), lo que ha servido de base para la síntesis de nuevos colorantes “on/off” pertenecientes a la familia de la fluoresceína.

La molécula de fluoresceína consta de dos partes bien diferenciadas, el grupo xanténico, que es el que se excita directamente con luz correspondiente a la zona del visible, y el grupo benzoico, que resulta excitado por luz ultravioleta. Ambas mitades son ortogonales entre sí (Ver figura I-10) y no existe ninguna interacción entre ellas ni en el estado fundamental ni en el excitado (*Orte et al., 2005*). Desde el trabajo de Linqvist y Lundeen (*Lindqvist y Lundeen, 1966; Fink y Willis, 1970*), se ha supuesto que la presencia del grupo carboxilo era indispensable para el alto rendimiento cuántico de la fluoresceína. Esta suposición ha sido recientemente rebatida por Urano y col. (*2005*) quienes han demostrado que el grupo carboxilo no juega un papel predominante en las propiedades fluorescentes de la molécula de fluoresceína, exceptuando el hecho de que mantiene ortogonales a las mitades bencénica y xanténica. En otras palabras, el grupo carboxilo puede reemplazarse por otro grupo funcional (Ver figura I-11). En su trabajo, los mencionados autores también calcularon los rendimientos cuánticos de algunos de los derivados de fluoresceína que carecen del grupo carboxilo, sus resultados indicaron que, cuando la mitad xanteno de los derivados está protonada (a pH ácido o neutro), el rendimiento cuántico de fluorescencia es igual o muy cercano a cero, mientras que a pH alcalino el rendimiento cuántico de la correspondiente forma aniónica es similar al de la fluoresceína (*Urano et al., 2005*). Como se ha indicado anteriormente y tal como se muestra en la figura I-11, el grupo carboxílico no es indispensable para la fluorescencia, y puede ser reemplazado por otros sustituyentes. Además, el

hecho de que, tanto la fluoresceína como el 2-MeTokyo Green tienen idénticos rendimientos cuánticos, sugiere que el pequeño grupo metilo es suficiente para mantener las porciones bencénica y xanténica ortogonales.



**Figura I-10.** Estructura de la fluoresceína dividida en dos partes: la porción bencénica y la porción xanténica.



**Figura I-11.** Características espectrales tras el reemplazo del grupo carboxílico de la fluoresceína por otros sustituyentes. (Urano *et al.*, 2005).

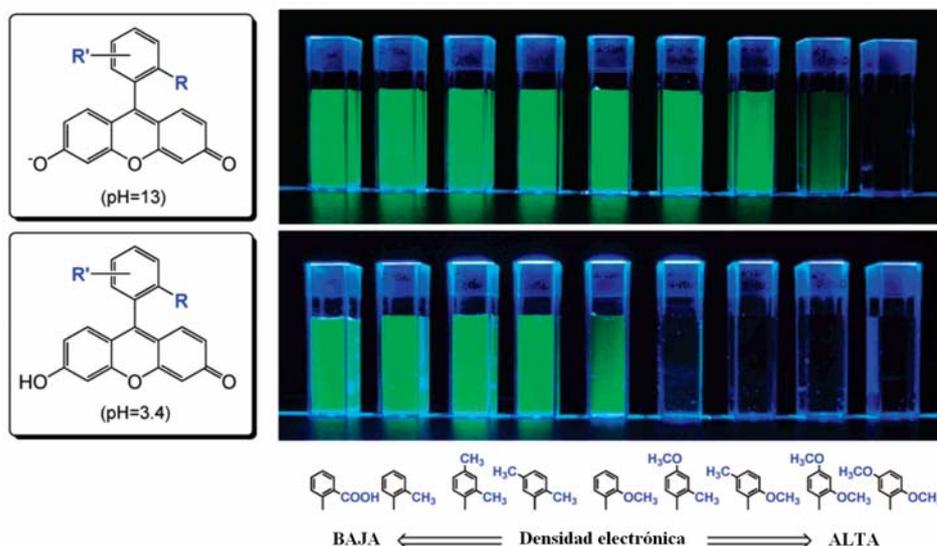
En base a estas consideraciones, *Urano et al. (2005)* sintetizaron varios derivados a los que denominaron como Tokyo Greens, en los que modificaron la densidad electrónica de la porción bencénica introduciendo grupos metilo y metoxi (Ver Tabla I-1). El hecho de que los máximos de absorción y emisión de los Tokyo Green y de la fluoresceína no estén casi alterados indica que las interacciones en el estado fundamental entre la porción bencénica y la xanténica es mínima en todos ellos. Por otro lado, el rendimiento cuántico se puede variar considerablemente, dependiendo del potencial de oxidación y el nivel de energía HOMO de la porción bencénica. (Ver Tabla I-1)

**Tabla I-1.** Propiedades fotofísicas de los Tokyo Greens. (*Urano et al., 2005*)

<b>R</b>	<b>Excitación máx.</b>	<b>Emisión máx.</b>	<b>Pot. de ox.</b>	<b>Energía HOMO</b>	<b><math>\phi</math> pH=13</b>	<b><math>\phi</math> pH=3.4</b>
2-Me	491	510	2.19	-0.2356	0.847	0.319
2,4-DiMe	491	510	2.08	-0.2304	0.865	0.307
2,5-DiMe	491	510	1.98	-0.2262	0.887	0.319
2-OMe	494	515	1.75	-0.2174	0.860	0.076
2-Me-4-OMe	492	509	1.66	-0.2141	0.840	0.010
2-OMe-5-Me	494	514	1.57	-0.2098	0.500	0.004
2,4-DiOMe	494	513	1.44	-0.2063	0.200	0.001
2,5-DiOMe	494	512	1.26	-0.1985	0.010	0.000
Fluoresceína	492	511	-	-0.2646	0.85	0.30

Por lo tanto, la posibilidad de reemplazar el grupo carboxílico de la fluoresceína por otros sustituyentes ha permitido desarrollar nuevos fluoróforos de utilidad. Examinando sus propiedades fluorescentes, se observa que poseen grandes cualidades para su utilización como sensores fluorescentes. De los nuevos Tokyo Greens, el 2-Me-4-OMeTokyo Green, el 2-OMe-4-MeTokyo Green y el 2,4-DiOMeTokyo Green pueden comportarse como sondas

fluorescentes “on/off” sensibles al valor de pH del medio en el que se encuentren.



**Figura I-12.** Comparación de la fluorescencia de los Tokyo Greens con distintos grupos en la porción bencénica. (Urano *et al.*, 2005)

### I.2.3.1.1. Tokyo Green-I y Tokyo Green-II

De la familia de los Tokyo Green, se han seleccionado para su estudio fotofísico aquellos que tienen las diferencias más acusadas en el rendimiento cuántico de las especies neutra y aniónica, ya que éstos deben proporcionar una mayor sensibilidad cuando se produzca el cambio de especie prototrópica, lo cual, a su vez, los hace muy atractivos como sensores fluorescentes en aplicaciones biológicas.

Según lo expuesto anteriormente, los colorantes más interesantes son el 9-[1-(2-metoxi-5metilfenil)]-6-hidroxi-3H-xantén-3-ona (**TG-I**) y el 9-[1-(2-metil-4-metoxifenil)]-6-hidroxi-3H-xanten-3-ona (**TG-II**). Ambos poseen un

rendimiento cuántico muy bajo para la especie neutra, mientras que mantienen rendimientos relativamente altos, similares a los de la fluoresceína, cuando están en su forma aniónica. Se debe resaltar que el **TG-II** presenta mayor rendimiento cuántico que el **TG-I**, en todos los casos.

#### I.2.3.1.1.1. Características fundamentales.

Al ser colorantes de reciente síntesis, la información básica existente sobre ambos es muy escasa. De hecho, toda la información se encuentra mencionada en el apartado anterior, y proviene de *Urano et al, (2005)*.

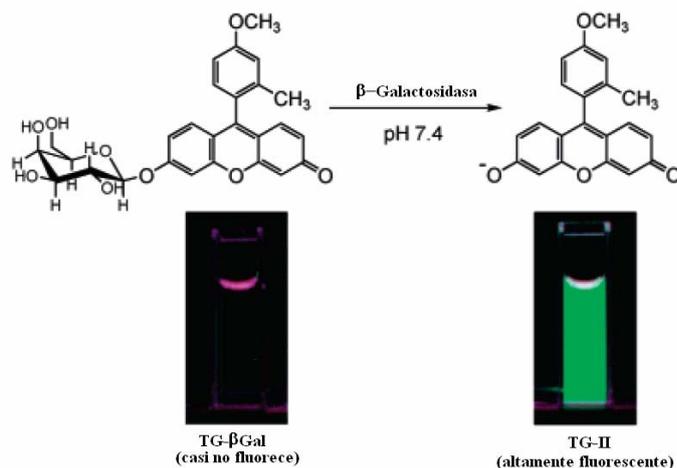
Ambos, TG-I y TG-II, se presentan como un polvo amarillo anaranjado, soluble en agua, solubilidad que aumenta con el incremento del pH. En la tabla I-1 se recoge la escasa información existente de estos colorantes, indicando los máximos de absorción y emisión. *Urano et al.* estimaron el valor del  $pK_a$  alrededor de 6.2, para ambos compuestos.

En cuanto a las características ácido-base en disolución acuosa de los TG-I y TG-II, al sustituirse el grupo ácido de la porción bencénica por grupos metoxi o metilo, respectivamente, se deben considerar únicamente tres especies prototrópicas diferentes en disolución acuosa, a saber: catiónica, neutra y aniónica. En la bibliografía, no existe ninguna información sobre las estructuras de las especies prototrópicas o tautoméricas presentes en disolución, salvo las referencias que ha originado esta Memoria. Asimismo, tampoco se ha encontrado información relativa a su fotoestabilidad, salvo la publicada por nosotros.

#### I.2.3.1.1.2. Aplicaciones.

Al ser tan reciente su síntesis, han sido pocas sus aplicaciones hasta la fecha, y ello a pesar de su gran potencial en su empleo como sensores

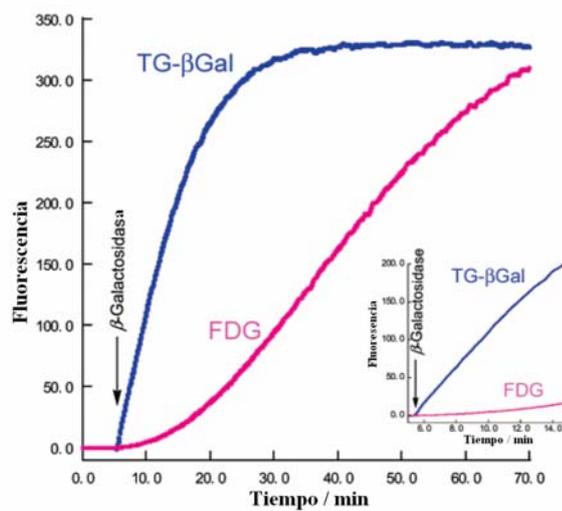
fluorescentes. *Urano et al. (2005)* han utilizado el TG-II como sensor de la actividad  $\beta$ -galactosidasa, uniendo el colorante a la galactosa y formando un TG- $\beta$ -gal, que tiene muy bajo rendimiento cuántico cuando el grupo alcoholico de la porción xanténica permanece unido sin disociar a la  $\beta$ -galactosa. Sin embargo, si la  $\beta$ -galactosidasa se encuentra en el medio rompe el enlace que une al fluoróforo con el azúcar, dejando libre el TG-II en su forma aniónica, que origina una fluorescencia muy intensa, según se describe en la figura I-13, en donde se muestra que el TG- $\beta$ -gal funciona como un sensor fluorescente de la actividad  $\beta$ -galactosidasa. Antes de la reacción, el rendimiento cuántico es muy bajo (correspondiente a la especie no disociada) y el colorante no fluoresce, sin embargo, una vez que la  $\beta$ -galactosidasa hidroliza el enlace con el azúcar, se forma TG-II libre que, a valores de pH alrededor del fisiológico, se encuentra en su forma aniónica, que es muy fluorescente.



**Figura I-13.** Esquema de la reacción del TG- $\beta$ -gal e imágenes antes y después de la reacción con  $\beta$ -galactosidasa. *Urano et al. (2005)*

El colorante proporciona así grandes ventajas sobre los sensores utilizados hasta el momento, especialmente en términos de sensibilidad y de imágenes en tiempo real en células vivas. Esta aseveración se comprende si se

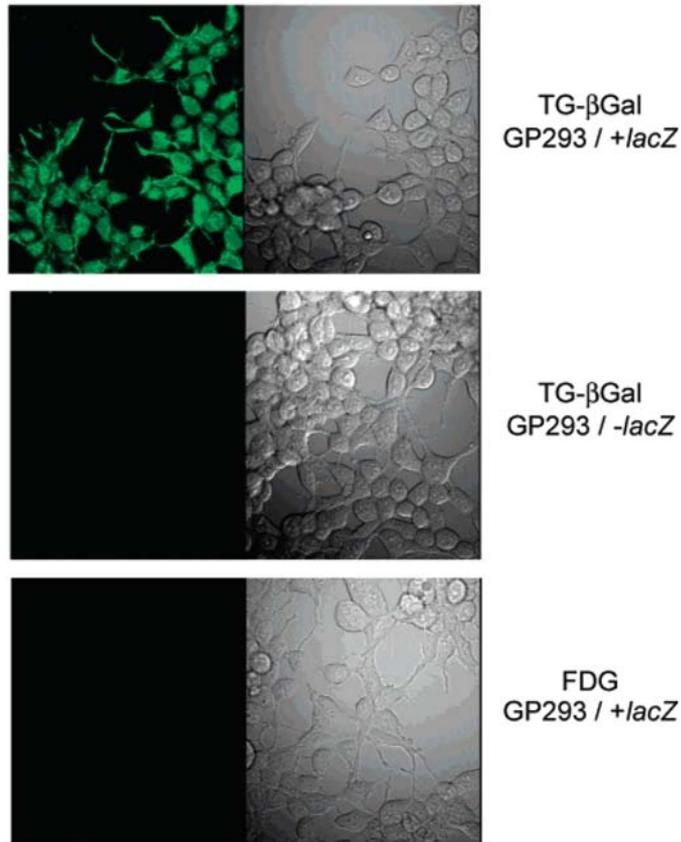
compara este nuevo fluoróforo con la di-O- $\beta$ -galactosa fluoresceína (FDG). La reacción de ésta ocurre en dos pasos: primero el FDG es transformado en la mono-O- $\beta$ -galactosa fluoresceína (FMG), de mediana fluorescencia, que finalmente pasa a fluoresceína (Hofmann *et al.*, 1983; Huang, 1991). Como se ha comentado, el TG- $\beta$ -gal actúa en un solo paso. Además, el incremento de la señal fluorescente es muy lento en el caso de la FDG, por lo que la sensibilidad es relativamente baja. Sin embargo, tanto la velocidad de aparición de la fluorescencia, como la intensidad de la señal, resultan muy altas.



**Figura I-14.** Comparación del incremento de la fluorescencia entre el TG- $\beta$ Gal (azul) y la FDG (rojo) con la adición de  $\beta$ -galactosidasa. La expansión inicial de la fluorescencia se muestra en la gráfica insertada. *Urano et al.* (2005)

Además, debido a su baja hidrofobicidad, el TG-II es permeable a las membranas celulares, lo que permite su uso en la captación de imágenes en células vivas, tal como realizaron *Urano et al.* con la actividad  $\beta$ -galactosidasa. La figura I-15 muestra la aplicación del TG- $\beta$ -gal y FDG a las células GP293 transducidas con o sin LNCX2-*lacZ* (células *lacZ*-positivas o negativas). Como se puede observar, se obtiene una imagen con fluorescencia muy nítida en

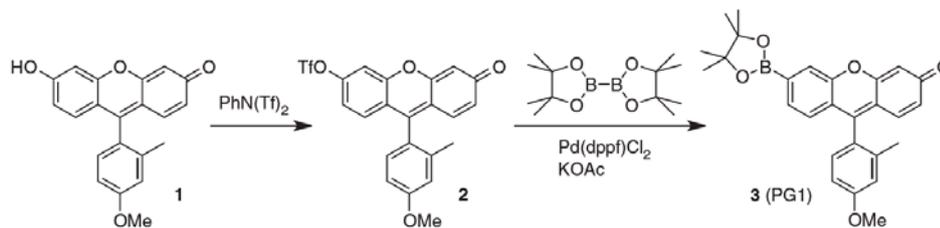
células *lacZ*-positivas, sin necesidad de ningún tipo de fijación, ni del empleo de técnicas complicadas para la introducción del colorante en la célula. Con la FDG, bajo las mismas condiciones, no aparece señal alguna.



**Figura I-15.** Imagen de microscopía de fluorescencia de la actividad  $\beta$ -galactosidasa con TG- $\beta$ -gal y FDG en células vivas *lacZ*-positiva y *lacZ*-negativas. El panel superior muestra las imágenes con TG- $\beta$ -gal en células *lacZ*-positivas, el panel intermedio muestra aquellas con TG- $\beta$ -gal en células *lacZ*-negativas, y el panel inferior, muestra aquellas con FDG en células *lacZ*-positivas. Las imágenes de fluorescencia se muestran en el lado izquierdo, mientras que en el derecho se muestran las imágenes en campo de luz. *Urano et al. (2005)*

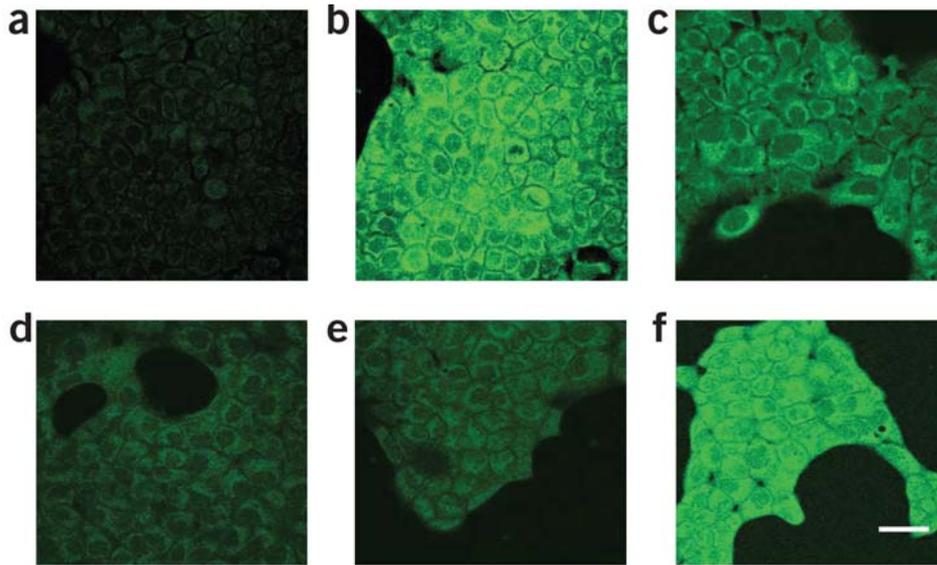
*Miller et al. (2007)* han modificado el TG-II (esquema I-3), para sintetizar el Peroxi Green-I (PG-I). Con este compuesto, la acción del  $H_2O_2$  celular ocasiona una desprotección del boronato, formándose TG-II en su forma

aniónica y provocando un aumento de aproximadamente diez veces de su intensidad de fluorescencia, lo que se utiliza para detectar la producción de  $H_2O_2$ .

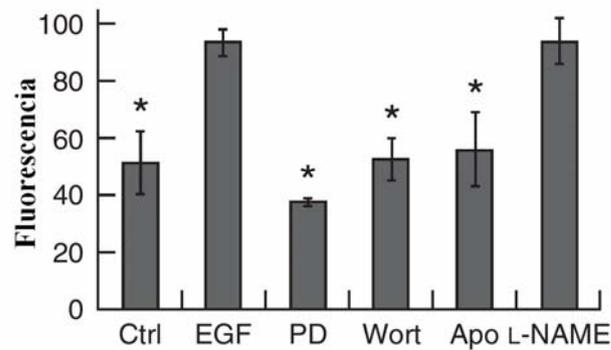


**Esquema I-3.** Síntesis del colorante Peroxi Green-I, derivado del Tokyo Green-II (Miller *et al.*, 2007)

La capacidad de detección de la producción natural de  $H_2O_2$  celular se realizó con células A431, elegidas por su alta expresión de receptores de factores de crecimiento epidérmico (EGFR). En la figura I-16a se observa la débil señal de fluorescencia obtenida con la adición de 5 mM de PG-I en células A431. Por el contrario, las mismas células activadas con ciertas dosis de factores de crecimiento fisiológico (500 ng/mL de EGF en 15 min. a 37° C) mostraron un sensible aumento de la fluorescencia relativa (figura I-16b). Los controles con EGF sin colorante, no mostraron ninguna señal fluorescente. Se puede concluir que PG-I es capaz de detectar  $H_2O_2$  intracelular producida por el factor de activación del crecimiento (EGF). En base a lo anterior, Miller *et al.* usaron a continuación el PG-I con EGF e inhibidores químicos, encontrándose que la generación de  $H_2O_2$  estimulada por EGF es atenuada por inhibidores de la EGFR-kinasa (PD153035, 100 mM, figura I-16c); inhibidores del fosfatidilinositol-3-OH kinasa, (wortmanina, 100 mM, figura I-16d) e inhibidores de Nox. (apocinina, 100 mM, figura I-16e). Además, la producción de  $H_2O_2$  no es afectada por los inhibidores de la NO sintasa (L-NAME, 100 mM, figura I-16f). La figura I-17 compara la intensidad relativa fluorescente de las células bajo los tratamientos realizados.

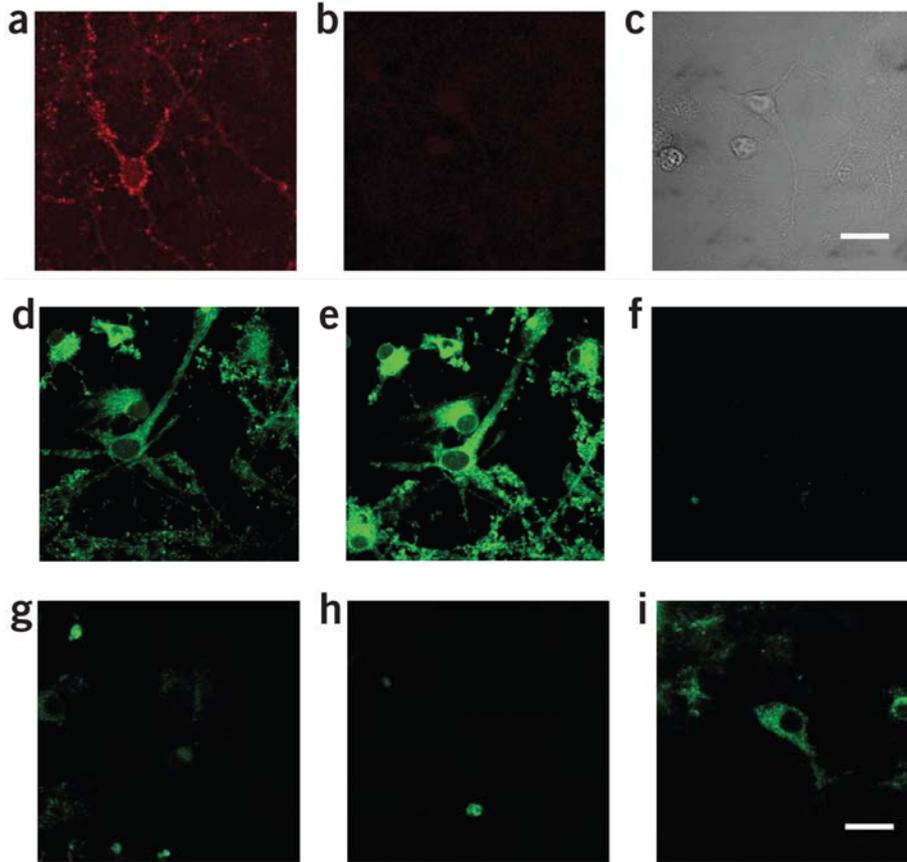


**Figura I-16.** Imagen molecular de  $H_2O_2$  producido por factores de crecimiento: (a) Imagen confocal fluorescente de células A431 incubadas con 5 mM de PG-I durante 15 min. A 37° C. (b) Señal fluorescente del PG-I de las células estimuladas con 500 ng/mL de EGF durante 15 min. a 37° C. (c) PG-I en células pretratadas con PD 153035 antes de la estimulación con EGF. (d) PG-I en células pretratadas con wortmanina antes de la estimulación con EGF. (e) PG-I en células pretratadas con apocinina antes de la estimulación con EGF. (f) PG-I en células pretratadas con L-NAME antes de la estimulación con EGF. (Miller et al., 2007)

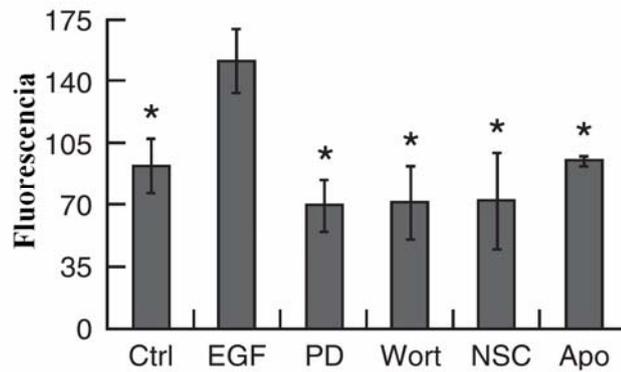


**Figura I-17.** Intensidades relativas de fluorescencia de los tratamientos utilizados por Miller et al. (2007) en la figura I-16. \* indica que  $P < 0.05$  cuando se compara con las células tratadas con EGF. Para todos los inhibidores, las células fueron pretratadas con 100 mM del inhibidor durante 25 minutos a 37° C antes de la estimulación con EGF. (Miller et al., 2007)

En base a los resultados obtenidos, *Miller et al. (2007)* han aplicado estos colorantes en diferentes sistemas biológicos. Dado que en el cerebro existe un alto estrés oxidativo, estudiaron la síntesis natural y estimulada de  $H_2O_2$  en neuronas, y la utilización de diferentes inhibidores enzimáticos de distinta naturaleza para testar su eficacia en la disminución de la producción final de  $H_2O_2$ . La figura I-18 muestra las imágenes recogidas después de diversos tratamientos con diferentes inhibidores. La eficacia de estas enzimas se refleja en la emisión recuperada, como se muestra en la figura I-19.

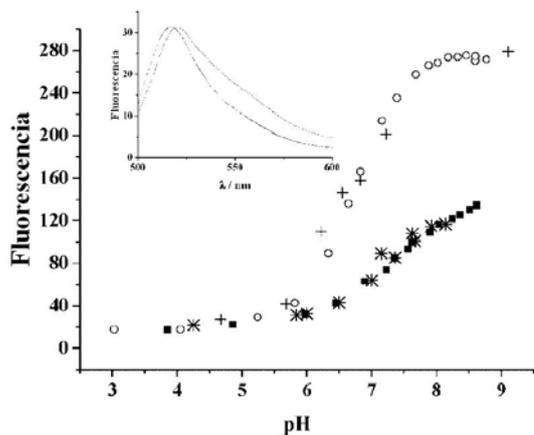


**Figura I-18.** (a) Imagen confocal fluorescente de neuronas de ratas postnatales (DIV 20) marcadas con anticuerpos primarios anti-EFGR (1:50); seguidas de la adición de anticuerpos secundarios Cy3 (1:400). (b) Neuronas control marcadas solo con anticuerpos secundarios (1:400). (c) Imagen en campo de luz de la figura (b). (d) Imagen confocal fluorescente de de neuronas del hipocampo de ratas postnatales (DIV 14) incubadas con 5  $\mu$ M PG-I durante 10 min. a 37° C. (e) Neuronas marcadas con PG-I de (d) estimuladas con 1  $\mu$ g/mL EGF durante 10 min. a 37° C. (f) Neuronas marcadas con PG-I, pretratadas con PD153035 antes de la estimulación con EGF. (g) Neuronas marcadas con PG-I, pretratadas con wortmanina antes de la estimulación con EGF. (h) Neuronas marcadas con PG-I, pretratadas con NSC23766 (inhibidor Rac1) antes de la estimulación con EGF. (i) Neuronas marcadas con PG-I, pretratadas con apocinina antes de la estimulación con EGF. (Miller *et al.*, 2007)

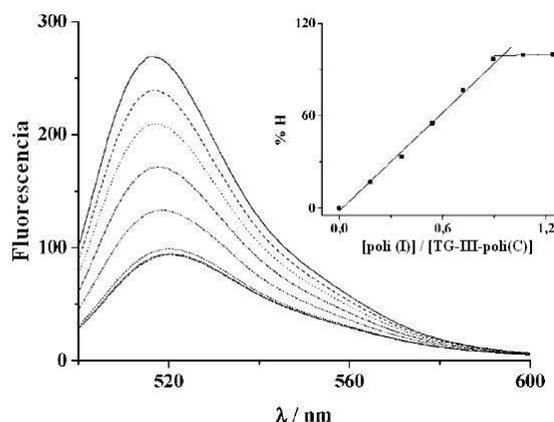


**Figura I-19.** Intensidades relativas de fluorescencia para los tratamientos utilizados en la figura anterior de (d) a (i). \* indica  $P < 0.05$ , comparado con las células tratadas con EGF. Para todos los experimentos, las células fueron pretratadas con 100 mM de inhibidores durante 25 min a 37° C antes de la estimulación con EGF. La longitud de onda de excitación fue de 488 nm. (Miller *et al.*, 2007)

Una aplicación más reciente con un colorante de la familia de los Tokyo Green fue la llevada a cabo por nuestro grupo de investigación. Así, se ha sintetizado el 2,5-dioxopirrolidin-1-il-4-(3-hidroxi-6-oxo-6H-xanten-9-il)-3-metilbenzoato (TG-III) (Crovetto *et al.*, 2008) como compuesto reactivo de aminas primarias, capaz de unirse covalentemente a biopolímeros. El nuevo derivado se utilizó para etiquetar el ácido polirribocitosínico (poli(C)). Tanto la intensidad de fluorescencia en estado estacionario, como el tiempo de vida de fluorescencia, son sensibles al valor de pH de la disolución. Esta dependencia se utilizó para detectar la hibridación de TG-III-Poli(C) con su homopolinucleótido complementario ácido poli-inosínico (poli(I)), en disolución. En concreto, se produce un decrecimiento en la emisión fluorescente en estado estacionario con la hibridación, que se ha justificado mediante una variación aparente del  $pK_a$  del colorante antes y después de la hibridación (tal como se muestra en la figura I-20), junto a un *quenching* estático. Los resultados obtenidos muestran la capacidad del TG-III como sensor fluorescente en la detección de la hibridación de ácidos nucleicos en medios homogéneos (figura I-21).



**Figura I-20.** Cambios pH-dependientes de la intensidad de fluorescencia en estado estacionario de (O) TG-III-Poli(C) y (■) TG-III-Poli(C)-Poli(I); ambos en 20 mM de Tris-HCl, 1mM de EDTA y 100 mM de NaCl (tampón de hibridación). (+) TG-III-Poli(C) y (\*) TG-III-Poli(C)-Poli(I); ambos en disoluciones no tamponadas (1mM de EDTA, 100 mM de NaCl).  $\lambda_{ex} = 490$  nm.  $\lambda_{em} = 515$  nm. La concentración de TG-III-Poli(C) es de  $4.68 \times 10^{-5}$  M. La gráfica insertada representa el espectro de emisión normalizado de (—) TG-III-Poli(C) y (.....) TG-III-Poli(C)-Poli(I) en tampón de hibridación.  $\lambda_{ex} = 440$  nm. (Crovetto *et al.*, 2008)



**Figura I-21.** Espectros de emisión ( $\lambda_{ex}=490$  nm) de una disolución de TG-III-Poli(C) en 20 mM de Tris-HCl, 1mM de EDTA y 100 mM de NaCl (tampón de hibridación) con una concentración inicial de  $4.68 \times 10^{-5}$  M y diferentes concentraciones de poli(I) en el rango de 0- $5.86 \times 10^{-5}$  M. La concentración de poli(I) se incrementó mediante la acción de  $10 \mu\text{L}$  de  $2.15 \times 10^{-3}$  M poli I a  $2500 \mu\text{L}$  de TG-III-Poli(C). La gráfica insertada muestra el porcentaje de TG-III-Poli(C) que hibrida con poli(I) en función de  $[\text{poli(I)}]/[\text{TG-III-Poli(C)}]$ . Los efectos de la dilución de TG-III-Poli(C) fueron corregidos durante la valoración. (Crovetto *et al.*, 2008)

### **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 la primera 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.

Sin embargo, la práctica totalidad de las medidas que se realizan actualmente, en cuanto a fluorimetría resuelta en el tiempo se refiere, emplean la técnica de conteo de fotones individuales correlacionados en el tiempo (time-correlated single photon counting: TCSPC), aunque se encuentran algunas aplicaciones 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 y la mayoría pertenecen al grupo de J. R. Lakowicz, quién propuso la teoría y diseñó el primer instrumento de medida. Ya que en esta Memoria se ha empleado exclusivamente la técnica TCSPC, a continuación sólo se desarrollará ésta brevemente:

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

La técnica del conteo 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 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 que se describirán 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 el 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 (suele ser usual recoger histogramas de al menos 10000 cuentas en el canal del máximo, aunque según las necesidades, puede ser necesario un número aún mayor).

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 de TAC, como se expondrá en la sección de *Materiales y Métodos*, es importante explicar brevemente su fundamento. En la modalidad reversa, el primer fotón emitido detectado proporciona la señal START y la señal de 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 0.5% de la radiación excitatriz produzca una señal sensible en el detector. Bajo estas condiciones, se puede asegurar que la señal recogida en el 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)* refinaron 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, obtuvieron 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 ello conlleva. La aparición durante la década de los noventa 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 en 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 de pulso 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.

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 emplear un tiempo bastante considerable.

### 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 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 Kesley, 1974; Spears et al., 1978; Turko et al., 1983*). Este láser proporciona pulsos de unos 70 ps de anchura a 514 nm (la longitud de onda de máxima intensidad de 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) 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 del 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 versátil. La introducción en TCSPC de los láseres de colorantes bombardeados

por el láser pulsado de argón (*Kinoshita et al., 1981; Small et al., 1984*) solucionó esto. El láser de rodamina 6G proporciona pulsos de 5 ps de anchura (más estrecho que los límites de detección de los detectores actuales) pudiendo considerarse como pulsos  $\delta$ . El principal problema de este láser es su longitud de onda de emisión y que también requiere 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 bastantes 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 segundos 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 ensancharlos 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 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 el 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 altas intensidades locales de luz (*Lakowicz, 1999*). Recientemente, se han estudiado mediante excitación multifotónica varios compuesto aromáticos (*Lakowicz et al., 1992*), sondas de ADN (*Lakowicz y Gryczynski, 1992*), residuos de triptófano y tiroxina en proteínas (*Gryczynski et al., 1996*). También ha encontrado aplicaciones en microscopía de fluorescencia (*Denk et al., 1990*), análisis de trazas (*Lytle 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. Otro ejemplo, es el llevado a cabo por *Montero et al., (2009)*; donde estudian distintos procesos de relajación dinámica del naftaleno mediante espectroscopía de masas a través de un sistema generador de oscilaciones de *Ti:Zafiro*, con una resolución de 17 fs.

### 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, 1986; 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 distorsionaría 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, 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 algo más tarde 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 ello, 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 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, ya que el área activa es de una superficie muy pequeña y es muy difícil focalizar la emisión fluorescente en esta área, lo que disminuye su sensibilidad. Otra desventaja es la aparición de largas colas en el perfil instrumental, dependientes de la longitud de onda, que crean problemas en el análisis de datos, puesto 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 del decaimiento), con la función de respuesta instrumental (función de la lámpara). 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 suspensión dispersora de luz, recogiendo la emisión a la misma longitud de onda que la excitación. Se pueden utilizar 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

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

- *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.

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

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 la 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 con resolución temporal (*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 una zona diferente de valores de pH, cuando los datos experimentales se recogían mediante emisión o por absorción. *Förster (1950)* investigó este fenómeno proponiendo un método, el ciclo de Förster, para estimar el valor de  $pK_a$  de una molécula en el estado excitado ( $pK_a^*$ ) basado en el  $pK_a$  del estado fundamental y de los espectros de absorción y/o emisión de la molécula. El ciclo de Förster, aunque sólo proporciona valores de  $pK_a^*$  exactos en determinadas condiciones, suele emplearse en la actualidad para obtener una estimación aproximada de esta constante en el estado excitado (*Balón et al., 1987, 1993; Draxler y Lippitsch, 1993; Wenska et al., 1997*). En la ecuación (I-6)  $\bar{\nu}_B$  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 salicilato de metilo un desplazamiento de Stokes inusualmente grande en el espectro de emisión. La protonación del grupo fenólico provoca que el espectro de emisión se convierta 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 extensamente estudiadas.

El propio *Weller (1961)* realizó en estas fechas una amplia revisión sobre las reacciones ESPT intramoleculares, y en la siguiente década se extendió el interés en el estudio de 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 estudió la influencia de diferentes entornos y cómo afectan 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 surgieron en estos años fueron las de *Ireland y Wyat (1976)* y *Klöppfer (1977)*, quienes revisaron las reacciones ESPT intramoleculares. Por su parte, *Martynov et al. (1977)* trataron con mayor profundidad la cinética de estas reacciones, recopilando valores de  $pK_a^*$  de varios fluoróforos, sobre todo naftoles y derivados, y trataron las ESPT

intermoleculares, tanto en disolventes próticos como apróticos, las 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; Mironczyk y Jankowski, 2002*). Sin embargo, no siempre la utilización de las ecuaciones de Weller lleva a valores verdaderos de  $pK_a^*$ , sino 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 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 comenzaron a utilizarse en los estudios al respecto (*Loken et al., 1972; Gafni et al., 1976*), suponiendo un extraordinario avance en la resolución 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 valor de pH inducidos por un 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 valor de pH de un medio. Estos saltos de valor de pH pueden emplearse como iniciadores de ciertas reacciones en el estado fundamental. La técnica de los saltos de valor 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*), equinelinas (*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 muy rápidas. *Webb et al., (1984, 1986)* analizaron la ESPT del 1-naftol, resultando ser bastante más rápida que la del 2-naftol, estudiada extensamente 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 también 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 este tipo de instrumentos, como el descrito por *Pouget et al., (1989)*, amplió y mejoró el desarrollo de la técnica.

Los procesos 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) también diseñaron láseres de colorantes. 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 con el tiempo y los decaimientos no exponenciales de fotoácidos, como el 8-hidroxipireno-1,3,6-trisulfonato, que fueron estudiados por *Pines y Huppert* (1986a, 1986b), *Agmon* (1988), *Pines et al.* (1988); o en el caso del 1-naftol-3,6-disulfonato descrito por *Massad y Huppert* (1991). Este método 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 apróticos (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. En otros trabajos se han propuesto las reacciones ESPT como sondas para estudiar el microambiente micelar, tal es el caso de los trabajos de *Politi et al. (1985)*, *Chattopadyay 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 de 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 la reacción ESPT, cuando el agua es el aceptor de protones, disminuyen 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  $\text{H}_3\text{O}^+$  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* (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  $\text{H}_9\text{O}_4^+$  tras la desprotonación. Mientras que sobre el mismo modelo de *clusters* de cuatro moléculas de agua como especie aceptor de protones, *Shizuka et al.*, (1986) establecieron que la hidratación de los iones del electrolito producía la ruptura de *clusters*  $\text{H}_8\text{O}_4$ , 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 ( $\text{pK}_a^* < 0$ ) se han propuesto especies dímeras de agua como los aceptores protónicos efectivos (*Tolbert y Haubrich*, 1994; *Htun et al.*, 1995). En este tipo de fotoácidos, la desprotonación y la reorientación del disolvente suceden a velocidades comparables, y lo que afecte a la estructura local del disolvente, como pueden ser los electrolitos, alterará la cinética de la ESPT.

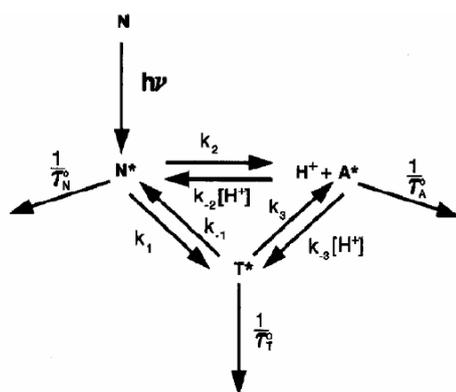
*Htun et al.*, (1997), basándose en el modelo de dímeros de agua como aceptores, encontraron que la presencia de  $\text{CaCl}_2$  en mezclas metanol:agua produce un incremento en la velocidad de la reacción ESPT del 4-hidroxi-1-naftalensulfonato hasta una concentración 0.1 M, mientras que disminuye 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*), sobre las características fotofísicas de algunas  $\beta$ -carbonilas (*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, junto con el naftol, suponen un ejemplo claro de la diversificación de los trabajos sobre ESPT en cuanto a número de derivados y diferentes condiciones estudiadas. 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 han permitido por ejemplo detectar decaimientos triexponenciales o discriminar entre tiempos de decaimiento similares. Así, comenzaron a plantearse esquemas cinéticos en 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-4), 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-4). 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 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-4.** 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 de tres y cuatro especies excitadas se intentaron resolver en estos años. *Dias et al. (1996)* plantearon un esquema cinético de tres estado 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 ha 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 decaimientos 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  $\beta$ -carbonilas, demostraron igualmente las carencias del tratamiento de *Draxler y Lippitsch (1993)*.

Nuevas y completas revisiones sobre cinéticas de ESPT han sido realizadas 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 siglo la mayor (hasta esa fecha) constante de desprotonación en el estado excitado hacia moléculas de agua como aceptoras, alcanzando un valor de  $1.4 \times 10^{11} \text{ s}^{-1}$  para el catión 7-hidroxi4-4metilflavilio. Los trabajos respecto a sales del ión flavilio (2-fenilbenzopirilio) tienen un gran interés por su relación con productos naturales como las antocianinas. Los citados autores emplearon para resolver la cinética de este proceso en estado excitado el hecho de que la emisión de la base en dicho estado, 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 el estado excitado, según la ecuación I-7.

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

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 ( $Y = k_A + k_p [H^+]$ ). 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  $[H^+]$  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 el 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. Más tarde, nuestro grupo de investigación conjuntamente con el grupo del Prof. Boens, establecieron las ecuaciones teóricas apropiadas y diseñaron un nuevo programa de cálculo que permitió aplicar la metodología del GCA a la reacción entre las especies monoaniónica y dianiónica de la fluoresceína cuando el ácido N-acetilsaspártico se añade como aceptor/dador protónico (*Crovetto et al., 2004*). Otras aplicaciones recientes del CGA en reacciones ESPT han sido los trabajos de *Orte et al. (2005a)* que estudia la reacción entre las distintas especies del 2',7'-difluorofluoresceína (OG488) resolviendo un sistema tricompartmental, y el de *Boens et al. (2006)* con la 2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5-(and-6)-carboxyfluoresceín (BCECF).

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, *Mironczyk y Jankowski (2002)* han tratado la influencia sobre la ESPT del 2-naftol con sustituyentes que atraen los 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. Otro ejemplo es el estudio de las ESPT en disoluciones de fenol y cianofenoles en agua, mostrando distintos comportamientos según el disolvente utilizado, así en orto- y meta-cianofenoles ocurre una rápida ESPT, mientras que en agua y para-cianofenol no se obtienen evidencias de que aparezca ESPT (*Kaneko et al., 2009*).

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 *Grofczik et al. (2000)*, o sobre los derivados de la salicialdimina (*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 “super-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 el 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 difusita 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. Otro ejemplo son los estudios de derivados “super-fotoácidos” fenólicos. En estos compuestos apareció un quenching debido a la transferencia hacia un estado no emisivo que ocurre incluso a bajas temperaturas (*Malval et al., 2008*).

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. Además, es un buen ejemplo el 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 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 de 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 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 es el descubrimiento de algunos “super-fotoácidos”, 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*). Más recientemente se han estudiado las ESPT de donadores quirales a aceptores quirales y aquirales, así como los efectos de fotorracemización para algunos fotoácidos quirales (como el 1,1'-bi-2-naftol y sus éteres) y aceptores protónicos (animas, animoalcoholes y agua) (*Solntsev et al., 2009*).

Finalmente, en una revisión reciente *Agmon (2005)* recopila todos los pasos implicados en las ESPT estudiados por técnicas teóricas y/o experimentales durante los últimos veinte años.

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 de protones 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 valor de 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 *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 estos autores constaba de dos especies excitadas ( $I^*$  y  $2^*$ ), considerando la existencia de la desprotonación en el estado excitado unimolecular de  $I^*$ , 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 denotada como  $k_{21}^b$ . 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 propuesto por *Laws y Brand (1979)* vienen dadas por:

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

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

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  $RH$ , que, a su vez, dependen 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:

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

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 valor de pH estudiado se hace  $C^{B_{uff}} = K_a + [H^+]$ , 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 se ha utilizado extensamente por nuestro grupo de investigación para describir la cinética de las reacciones ESPT en presencia de un aceptor/dador de protones (*Álvarez-Pez et al., 2001; Crovetto et al., 2004; Orte et al., 2005; Boens et al., 2006*).

Posteriormente a *Laws y Brand*, se continuó investigando otros sistemas de fluoróforos que presentan reacciones 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 dihidroequinelinam 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 ayudan a discernir la localización y comportamiento del fluoróforo en medios organizados. Estos autores encontraron 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 se encuentran 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 sustanciasceptoras 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.

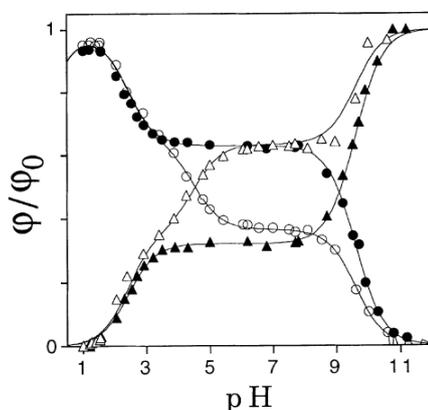
El efecto de las especies de un aceptor/dador protónico sobre las reacciones de transferencia protónica de un fluoróforo tan común y empleado en diversas aplicaciones como es la fluoresceína, ha sido objeto de estudio de nuestro grupo de investigación (*Yguerabide et al., 1994; Álvarez-Pez et al., 2001; Crovetto et al., 2002, 2004; Boens et al., 2004*), además de otros derivados de la misma como la 2',7'-difluorofluoresceína (*Orte et al., 2005, a, b, c*) y la BCECF (*Boens et al., 2006*), aunque de esto se tratará con mayor amplitud en el epígrafe siguiente.

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

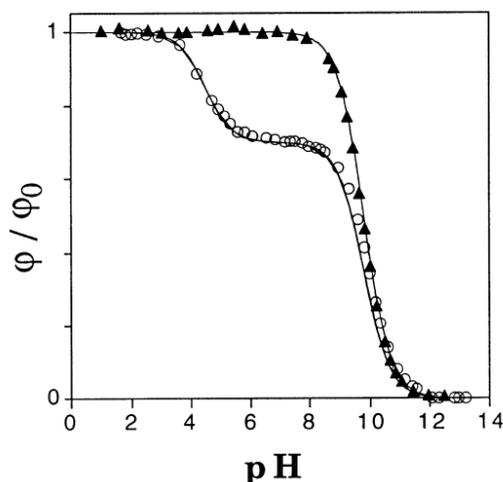
fotoácidos (1-naftol, 2-naftol y derivados, 8-hidroxipireno-1,3,6-trisulfonato, 1-hidroxipireno, etc.), empleando dos diferentes concentraciones de tampón acetato, 8 y 1 M. En este trabajo publican uno de los valores más altos de las constantes cinéticas bimoleculares en transferencias protónicas en 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 de protones también pueden influir en otro tipo de transferencias protónicas en el estado excitado como son las intramoleculares o las fototautomerizaciones (Koziolowa *et al.*, 1996; Sikorsa 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.

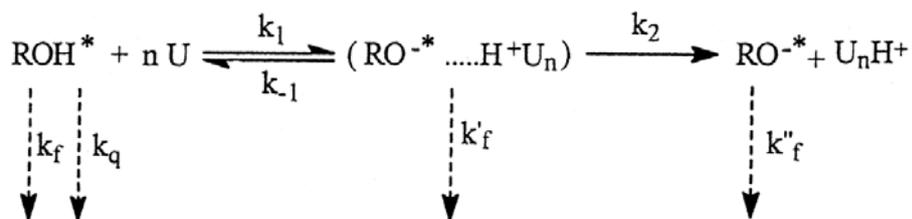


**Figura I-22.** Curvas de valoración normalizadas de emisión de fluorescencia del 2-naftol: (●) forma ácida en ausencia de tampón, (▲) forma básica en ausencia de tampón, (○) forma ácida en presencia de tampón acetato 0.1 M, (△) especie básica con tampón acetato 0.1 M (Pina *et al.*, 1999).



**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-5. *Htun* encontró la reversibilidad de la reacción ESPT debido a la recombinación del par iónico fluoróforo excitado-urea tras la desprotonación.



**Esquema I-5.** 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 en 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 los compuestos sobre los que trata esta Memoria, el 9-[1-(2-metoxi-5metilfenil)]-6-hidroxi-3H-xantén-3-ona (**Tokyo Green-I**) y el 9-[1-(2-metil-4-metoxifenil)]-6-hidroxi-3H-xanten-3-ona (**Tokyo Green-II**), las reacciones ESPT descritas en la bibliografía sobre la fluoresceína resultan de gran interés, ya que tanto los equilibrios prototrópicos, como las características espectroscópicas de ambas moléculas son muy similares.

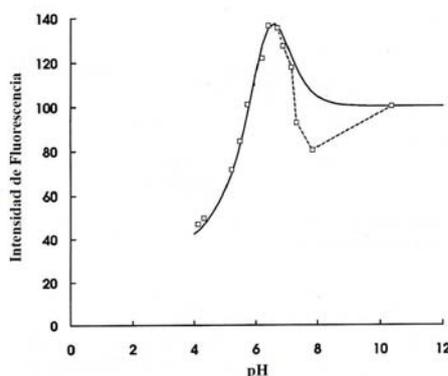
Los primeros estudios sistemáticos sobre el comportamiento de las diferentes formas prototrópicas de la fluoresceína en el estado excitado fueron realizadas por *Rozwadowski (1961)*, quién recogió los espectros de emisión de fluoresceína en disolución acuosa en función del pH. *Rozwadowski* también mostró una gráfica de tiempos de vida frente al pH que evidencia una transición alrededor de pH 6.5. Propuso que la transición es debida a la reacción de intercambio protónico entre el monoanión y dianión, pero no presentó datos convincentes que pudieran soportar su propuesta. Algo después *Leonhardt et al. (1971)* midieron el rendimiento cuántico de fluorescencia de las cuatro formas prototrópicas de la fluoresceína, proporcionando también los valores de  $pK_a^*$  de los tres equilibrios ácido-base que describen el comportamiento del colorante frente al pH. Propusieron un valor de 6.9 para el equilibrio entre el monoanión y el dianión, suponiendo que la reacción en el estado excitado entre ambas formas prototrópicas ocurre con rapidez y llega a alcanzar el equilibrio en un tiempo menor que los tiempos de vida de las dos especies excitadas. En 1975, *Guyot et*

*al.* (1975) cuantificaron el  $pK_a^*$  de los tres equilibrios mediante la aplicación del ciclo de Förster, obteniendo un valor de 5.7 para el equilibrio monoanión/dianión. Sin embargo, concluyeron que no se establecía el equilibrio prototrópico durante el tiempo de vida de los estados excitados, y a esta misma conclusión llegaron el mismo año *Martin y Lidqvist* (1975). Algo más tarde, *Shah et al.* (1983, 1984) y *Shah y Pant* (1985) analizaron con mayor rigor las reacciones ESPT de la fluoresceína en disolución acuosa a temperatura ambiente y muy baja temperatura. Sin embargo, el equilibrio más estudiado por ellos fue entre las especies catiónica y neutra, así como entre el catión y un dicatión propuesto por ellos. Plantearon un modelo simple en dos estados excitados y calcularon las constantes cinéticas a través de una simplificación de las ecuaciones de velocidad. Asimismo, los autores afirmaron que no es posible calcular el valor del  $pK_a^*$  del catión debido a la existencia de múltiples formas neutras, por lo que determinaron el  $pK_a^*$  a través del ciclo de Förster (ecuación I-6), obteniendo un valor de -1.3 (*Shah et al.*, 1983, 1984). Posteriormente, *Shah y Pant* (1985) 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 en dos estados excitados reversibles. 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 constante cinética de la reacción 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  $\text{pK}_a^*$  de -0.6, en contraste con el de -1.3 obtenido en el ciclo de Förster.

Dado el confusiónismo existente en la bibliografía sobre si las reacciones de intercambio protónico en el estado excitado se producen o no durante el tiempo de vida de los estados excitados de las distintas especies prototrópicas de la fluoresceína y en particular entre el monoanión y la especie dianiónica (que son las únicas relevantes en los alrededores del pH fisiológico), se abordó en nuestro grupo de investigación el estudio de las reacciones de transferencia protónica entre las mencionadas especies monoaniónica y dianiónica, tanto de la fluoresceína como de algunos de sus derivados. Debido a la relevancia de la fluoresceína como fluoróforo y a su extendida aplicación en bioquímica, el conocimiento exhaustivo de estas reacciones supone una inestimable ayuda en la interpretación de los resultados obtenidos con fluoresceína como etiqueta fluorescente. Así, *Yguerabide et al. (1994)* concluyeron 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 aplicarla a la reacción ESPT entre el dianión y el monoanión de fluoresceína 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  $\text{pK}_a^*$  de 6.31 (figura I-25). 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.

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



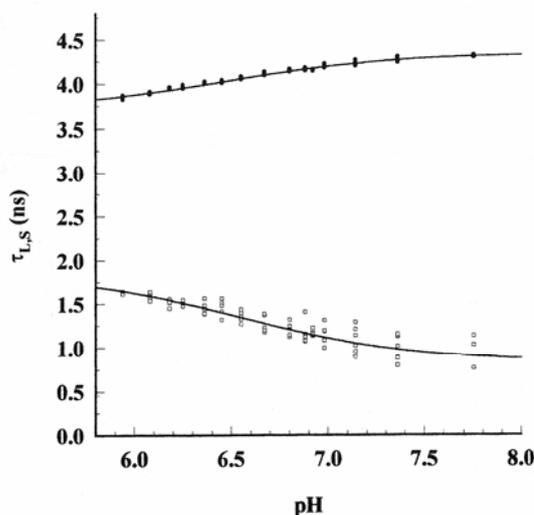
**Figura I-25.** Intensidad de fluorescencia ( $\square$ ) frente al valor de pH de disoluciones de fluoresceína a alta concentración de tampón de fosfatos (1 M). La concentración de fluoresceína fue de  $10^{-6}$  M y las longitudes de onda de excitación y emisión fueron 437 y 512 nm respectivamente. 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 1M. 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-2 recoge los resultados de las constantes cinéticas obtenidas, mientras que la figura I-26 muestra estos ajustes.

**Tabla I-2.** Constantes cinéticas para la ESPT entre el monoanión y el dianión de la fluoresceína en presencia de tampón de fosfatos 1M.<sup>a</sup>

$\tau_D$ (ns)	$\tau_M$ (ns)	$k_{DM}$ (ns <sup>-1</sup> )	$k_{MD}$ (ns <sup>-1</sup> )	$k_{DM}^b$ (M <sup>-1</sup> ns <sup>-1</sup> )	$k_{DM}^b$ (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>b</sup>	0.92 ± 0.04	0.304 ± 0.009
pK <sub>a</sub> <sup>*</sup> = 6.4 <sup>c</sup>					

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

**Figura I-26.** 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 sustancias que actúan como aceptores/dadores protónicos adecuados para mediar las 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) determinaron las constantes cinéticas de esta ESPT en presencia de ácido N-acetilaspártico 1M, empleando la metodología por fluorimetría en estado estacionario propuesta por Yguerabide *et al.* (1994) para

la fluoresceína, así como mediante fluorimetría con resolución temporal. La cinética de este proceso se resolvió empleando el análisis global compartimental, GCA, siendo la primera vez que se aplicó esta metodología en la resolución de la cinética de reacciones ESPT con adición de tampón como aceptor/dador protónico. Debido a que nunca se había resuelto con la metodología del GCA un sistema cuyas reacciones en estado excitado fueran promovidas por la presencia de las especies de un regulador del pH, se propusieron también las condiciones experimentales necesarias para que los parámetros recuperados en el GCA fueran identificables de forma única (Boens *et al.*, 2004). Los valores de las constantes cinéticas obtenidas por Crovetto *et al.* (2004) se muestran en la tabla-3.

**Tabla I-3.** Constantes cinéticas para la ESPT entre el monoanión y el dianión de la fluoresceína en presencia de ácido N-acetilaspártico 1M<sup>a</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>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0.0336 ± 0.0015	0.0120 ± 0.0015
<sup>a</sup> Crovetto <i>et al.</i> , 2004				
<sup>b</sup> Mantenidas fijas durante el proceso de ajuste.				

De entre los derivados de fluoresceína resistentes a la fotodegradación, uno de los de mayor rendimiento cuántico es el OG488 que, además, presenta valores de pK<sub>a</sub> en el estado fundamental muy próximos entre sí, lo que permite desarrollar modelos cinéticos en tres estados y su aplicación a las reacciones ESPT del citado colorante en disolución acuosa. La extensión del modelo cinético a un sistema en tres estados excitados sucesivos fue realizada por Orte *et al.* (2005, a, b) con disoluciones ácidas de OG488. El modelo en tres estados excitados se resolvió mediante la aplicación del análisis global tricompartmental, siendo este uno de los pocos sistemas en tres estados resueltos con esa metodología. Los modelos propuestos junto a los parámetros

recuperados, poseen un gran poder de predicción y permiten calcular el tiempo que tarda el sistema en alcanzar el acoplamiento en el estado excitado en los decaimientos de las especies reactivas, o predecir los tiempos de vida correspondientes a disoluciones de colorante en distintas condiciones experimentales. También permite el cálculo de la señal de fluorescencia en estado estacionario que se obtendría a partir de disoluciones con distintos valores de pH (Orte *et al.*, 2005, *c*). Los valores de las constantes cinéticas obtenidas por Orte *et al.* (2005, *a*) se muestran en la tabla-4.

**Tabla I-4.** Constantes cinéticas para la ESPT entre el monoanión y el dianión del OG488 en presencia de tampón acetato 1M<sup>a</sup>.

$k_{OM} + k_{DM}$ (ns <sup>-1</sup> )	$k_{OD}$ (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> )
0.297 ± 0.001	0.247 ± 0.001	0 <sup>b</sup>	0.970 ± 0.002	0.179 ± 0.001
<sup>a</sup> Orte <i>et al.</i> , 2005a				
<sup>b</sup> Mantenido fija durante el proceso de ajuste.				

En lo que se refiere a la sensibilidad de la emisión fluorescente frente al pH, más que una desventaja, en ciertas ocasiones se convierte en una propiedad fundamental de estos derivados que se aplica con ventaja utilizándolos como indicadores del pH. Con este objeto, se han sintetizado derivados como la [2',7'-bis-(2-carboxietil)-5-(y-6)-carboxifluoresceína] (BCECF), el indicador intracelular más usado para valores de pH cercanos a la neutralidad (Szmackinski *et al.*, 1993). Recientemente, se ha publicado un estudio sobre la fotofísica de BCECF en donde se aplicó el CGA para la obtención de los parámetros cinéticos y espectrales de la reacción ESTP entre el tetra- y penta-anión del mencionado derivado (Boens *et al.*, 2006). Este artículo arrojó serias dudas sobre la mayoría de datos publicados y que fueron obtenidos utilizando este compuesto como sonda intracelular de pH.

#### I.4.4. Identificabilidad del sistema compartimental.

Las reacciones de transferencia protónica promovidas por la presencia de un aceptor/dador protónico adecuado han sido analizadas recientemente bajo el entorno del análisis global compartimental. Algunos de los pocos de estos sistemas resueltos hasta ahora son: el de la fluoresceína en presencia de ácido N-acetilaspártico (*Crovetto et al. 2004*), o el del derivado de la fluoresceína, el 2',7'-difluorofluoresceína en presencia de ácido acético y acetato (*Orte et al. 2005a, c*), mencionados en el apartado anterior.

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 denomina *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:

- 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), no es posible 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 amortiguador con diferentes eficacias de amortiguación 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.
- *Kowalczyk et al (1995)* llevaron a cabo un estudio de identificabilidad en un modelo de tres especies, investigando 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 equívoco a las constantes cinéticas.
- *Boens y Kowalczyk (1996)* realizaron el estudio de identificabilidad de un proceso intermolecular competitivo en tres estados excitados (la especie  $I^*$  reacciona 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 de 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.

- Se realizó un estudio de identificabilidad para el sistema de reacción de transferencia de protones en el estado excitado promovida por las especies de un aceptor/dador protónico (*Boens et al., 2004*), donde se concluyó que la identificabilidad global del sistema puede asegurarse siempre en términos de  $k_{ij}$ ,  $\tilde{b}$  y  $\tilde{c}$ , 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 concentraciones de tampón correspondientes a cada valor de pH tendrán que estar recogidos bajo las mismas condiciones de  $\lambda^{em}$  y  $\lambda^{ex}$ , para asegurar la determinación de  $\tilde{b}$  y  $\tilde{c}$ . Puede conseguirse identificabilidad global con tan sólo una concentración de tampón 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. El trabajo de *Boens et al. (2004)* es imprescindible para la presente Memoria, ya que el sistema cinético empleado para el estudio de las ESPT es precisamente el descrito en el artículo.
- En 2005, *Boens y De Schryver* realizaron un estudio de la identificabilidad de un sistema intramolecular con tres estados excitados. Demostraron que las medidas cinéticas en este tipo de modelo, con reacciones reversibles entre los tres estados, no son suficientes para resolverlo, y por tanto, se trata de un sistema no identificable. Sin embargo, los autores proponen una solución usando un decaimiento monoexponencial con un compuesto de referencia y asumir que la constante de desactivación  $k_{0(ref)}$  es equivalente a una constante de velocidad de desactivación del modelo intramolecular  $k_{0i}$ . Es necesario indicar que los resultados obtenidos de esta manera, se

basan en la presunción de que el valor  $k_{0(\text{ref})}$  es transferible al proceso estudiado.

- *Boens et al. (2007)* realizaron un estudio de identificabilidad de dos modelos utilizados para describir la amortiguación de los tiempos de vida de fluorescencia de colorantes en micelas. El primer modelo asume que el paso del amortiguador a las micelas es menor que el tiempo de fluorescencia del colorante, en este caso, las velocidades de desactivación  $k_0$  y de amortiguación  $k_q$  de la molécula excitada, son identificables conjuntamente en función del número de moléculas de amortiguador por micela. El segundo modelo estudiado asume que el paso entre la micela y el exterior del amortiguador es más rápido que el tiempo de vida del colorante, bajo estas condiciones las constantes de velocidad de desactivación del colorante  $k_0$  y del amortiguador  $k_q$ , son identificables a través de las constantes de entrada  $k_+$  y salida  $k_-$  del amortiguador en la micela y el número de agregación micelar.

## **I.5. MÉTODOS DE ANÁLISIS.**

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

En la actualidad, el ajuste no lineal por mínimos cuadrados (NLLS) es una herramienta 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 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. (Cuando el ruido es fundamentalmente aleatorio, suele definirse  $w_k = 1/y_k$  (Gil y Rodríguez, 2003).

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

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 conteo 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 de 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 es. Sin embargo,  $\chi^2$  depende del número de puntos (Bevington y Robinson, 1993), así que suele utilizarse el valor de  $\chi^2$  reducido ( $\chi_v^2$ ):

$$\chi_v^2 = \frac{\chi^2}{n-p} = \frac{\chi^2}{\nu} \quad (1-19)$$

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 ser 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):

$$r^2 = \frac{S_t^2 - \chi_v^2}{S_t^2} \quad (1-20)$$

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:

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

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 estos aspectos 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 debe ser al azar en torno a cero, para un modelo correcto y ausencia de errores sistemáticos. 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 (las repeticiones de experimentos individuales no deben promediarse, es conveniente emplear simultáneamente todos los datos (*Johnson y Frasier, 1985*) 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 valor de pH. En el caso de las medidas de absorción 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 son parámetros no comunes, ya que dependen de la longitud de onda.

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 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)*, *Brownellet al. (1968)*, *Jacquez (1972)* y más recientemente *Anderson (1983)*. Sin embargo,

aun cuando el término compartimento no estaba siendo utilizado explícitamente, ya se trabajó con modelos compartimentales anteriormente. El primer modelo compartimental fue utilizado para la descripción de los decaimientos radiactivos. Después de que Becquerel descubriera la radiactividad (*Becquerel, 1896*), *Rutherford y Soddy (1902)* encontraron experimentalmente que el *Th* 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, 1937b)* 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 fisicoquímicas 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 se ocupa 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-catión en estado fundamental. Los sistemas que se han estudiado han sido el indicador PBFI 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, 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).

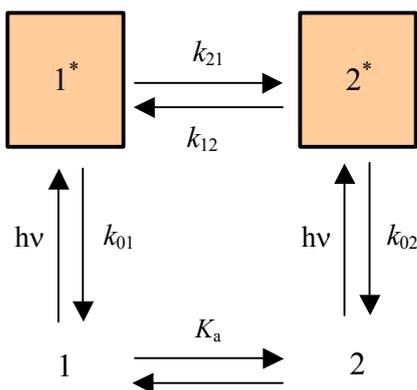
También se ha aplicado en fotofísica el análisis global tricompartmental (tres compartimentos implicados). El primer sistema fotofísico tricompartmental resuelto fue el estudiado por Khalil *et al.* (1993), quienes describieron la formación del excímero del 1-cianopireno, simultáneamente con el exciplejo 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 la 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. Un sistema que resultó muy complejo por el fuerte solapamiento de los espectros de excitación y de emisión de las especies neutra y monoaniónica, fue el resuelto mediante análisis global tricompartmental por *Orte et al. (2005, c)*.

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-6.** 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-6. 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 en el estado fundamental, descrito por la constante  $K$ , que puede ser cualquier tipo de equilibrio (ácido–base, complejación, etc.). La excitación por la luz genera en el estado excitado las especies  $1^*$  y  $2^*$ , que pueden desactivarse a través de emisión de fluorescencia (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  $2^* \rightarrow 1^*$ . Las constantes  $k_{21}$  y  $k_{12}$  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:

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

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

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

La derivada en el tiempo del vector de concentraciones viene expresada como  $\dot{\mathbf{x}}(t)$ , mientras que  $\mathbf{A}$  es la matriz compartimental  $2 \times 2$ : (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  $1^* + H^+ \rightleftharpoons 2^*$ , la matriz  $\mathbf{A}$  de la ecuación I-27 se modificará, de forma que donde aparece  $k_{21}$ , debería encontrarse  $k_{21}[H^+]$ ).

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

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  $t \geq 0$ ):

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

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:

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

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):

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

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:

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

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

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  $t \geq 0$ ):

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

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:

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

y vienen dados por:

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

Con:

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

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  $\tilde{c}_i(\lambda^{em})$ :

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

siendo:

$$\begin{aligned} \beta_{11} &= \frac{[\tilde{b}_1(X + \gamma_2) - \tilde{b}_2k_{12}]}{(\gamma_2 - \gamma_1)} \\ \beta_{12} &= -\frac{[\tilde{b}_1(X + \gamma_1) - \tilde{b}_2k_{12}]}{(\gamma_2 - \gamma_1)} \\ \beta_{21} &= \frac{[\tilde{b}_2(Y + \gamma_2) - \tilde{b}_1k_{21}]}{(\gamma_2 - \gamma_1)} \\ \beta_{22} &= -\frac{[\tilde{b}_2(Y + \gamma_1) - \tilde{b}_1k_{21}]}{(\gamma_2 - \gamma_1)} \end{aligned} \quad (\text{I-38})$$

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.

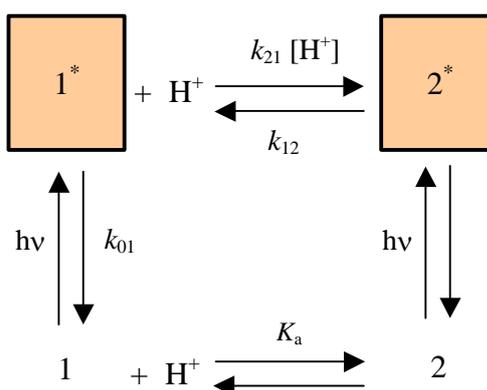
Consideremos ahora una reacción de transferencia protónica en el estado excitado, según el esquema I-7, ya que éste es el tipo de reacciones sobre las que versará esta Memoria, se enunciarán las modificaciones sobre el tratamiento general anterior. Así, la matriz  $\mathbf{A}$  se verá alterada según lo expuesto con anterioridad. 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:

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

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:

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

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



**Esquema I-7.** Sistema compartimental 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.

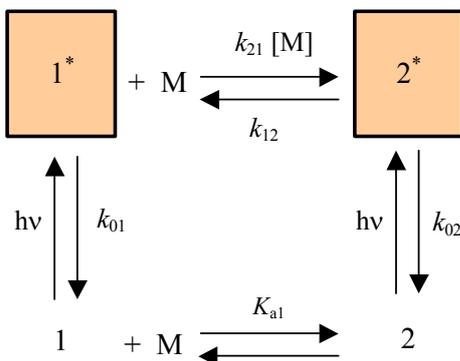
Ya en la década de los 80 se desarrolló el análisis simultáneo o global en el que se relacionan los distintos decaimientos (*Knutson y Beechem, 1983; Boens et al., 1989; Janssens et al., 1990; Beechem et al., 1991*), aprovechando los parámetros comunes que aparecen en ellos (sección I.5.1.4), con lo 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 parámetros 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-8, 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  $H^+$ . Para este sistema, la matriz compartimental viene dada por:

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



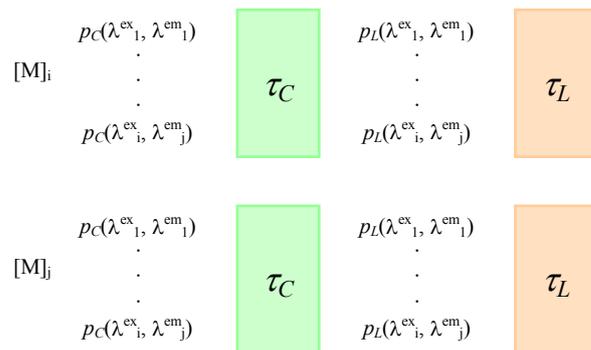
**Esquema I-8.** Sistema bicompartimental de una reacción en estado excitado reversible con el co-reactante M.

Como se ve en el esquema I-8, 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.

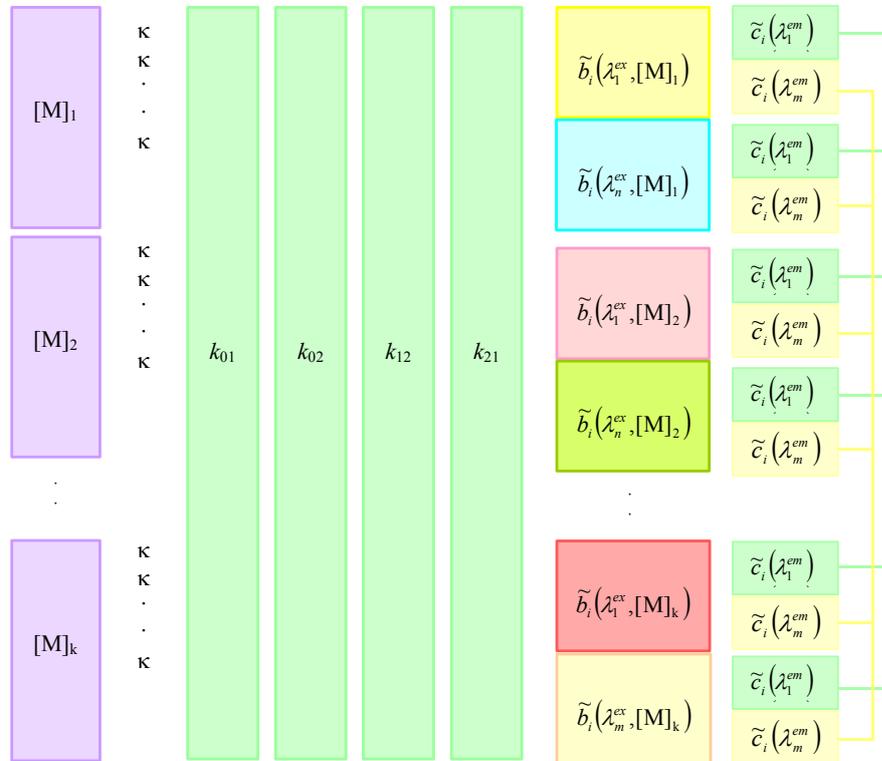
Mediante análisis global biexponencial los parámetros estimados son los tiempos de decaimiento, corto ( $\tau_C$ ) y largo ( $\tau_L$ ), y sus amplitudes asociadas  $p_{C,L}$ . El esquema de ligado de parámetros mediante análisis global en esta situación, se muestra en el esquema I-9. En este esquema los tiempos de vida,  $\tau_{C,L}$ , 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 pueden ser analizados conjuntamente.



**Esquema I-9.** Esquema de ligado de parámetros en un análisis global sobre la superficie de decaimientos de fluorescencia obtenidos del sistema del esquema I-7.

En contraste, el esquema I-10 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-10.** Esquema de ligado de parámetros en un análisis global compartimental sobre la superficie de decaimientos de fluorescencia obtenidos del sistema del esquema I-7.

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. Cuando los factores pre-exponenciales de los dos tiempos de decaimiento son muy parecidos, la estimación del tiempo de vida corto también 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.6. ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA DE MOLÉCULAS INDIVIDUALES.**

La disponibilidad de detectores ultrasensibles y fuentes de excitación láser, combinados con microscopios con ópticas de gran calidad han permitido en la última década la detección de fluorescencia con sensibilidad última, es decir, han llegado a detectar moléculas individuales bajo condiciones adecuadas. Esto ha abierto un campo de exploración novedoso e importante, haciendo accesibles ciertos experimentos que eran impensables hace tan solo una década. Por un lado, la alta sensibilidad de esta técnica puede ser la llave para superar los desafíos contemporáneos de estudio y desarrollo de nano-dispositivos y posteriormente, la interacción con ellos. Así también, por ejemplo, la gran sensibilidad de las medidas de detección de moléculas individuales puede aportar información acerca del ambiente local donde se encuentre un sensor fluorescente, con alta resolución espacial. Esto permitiría, por ejemplo, la utilización en patología y medicina diagnóstica en donde se podría detectar en el interior de una célula una proteína o gen indicativos de una enfermedad.

Además de la alta sensibilidad y resolución, la espectroscopia a nivel de moléculas individuales posee otras características de gran interés, ya que permite una visión del comportamiento de cada molécula de forma individual, en lugar de la observación de las propiedades promedio de un conjunto de moléculas. De hecho, la metodología de moléculas a nivel individual permite la investigación de las fluctuaciones de un sistema bajo condiciones de equilibrio sin la necesidad de sincronización. Por ejemplo, en un experimento típico que permita observar la cinética del plegamiento de proteínas, el plegamiento de la mayoría de moléculas debe estar sincronizado por algún evento, como puede ser un rápido incremento de la temperatura (*Dimitriadis et al., 2004*), alteraciones

del valor de pH (*Rami y Udgaonkar, 2001*) o cambios en las condiciones químicas al mezclar dos disoluciones (*Roder et al., 2004*). Si la cinética de cada molécula no se sincroniza en los experimentos a nivel de conjunto, entonces la velocidad no se puede medir. Por otra parte, la sincronización crea un tiempo muerto que hace imposible observar eventos cinéticos muy rápidos. Sin embargo, el estudio de las moléculas una a una permite investigar estas rápidas reacciones, ya que no es necesario que el equilibrio esté alterado para observar las fluctuaciones infinitesimales alrededor del propio equilibrio.

Finalmente, debe destacarse que las medidas de detección de moléculas individuales pueden proporcionar una comparación directa con experimentos teóricos y cálculos obtenidos mediante simulaciones informáticas. Muchas aproximaciones teóricas y simulaciones informáticas se basan en unas pocas o una única molécula con lo que pueden permitir comparación directa con aquellas propiedades obtenidas en experimentos de moléculas individuales.

Posiblemente, la primera medida espectroscópica a nivel de moléculas individuales la realizó Rotman en la década de los 60 (*Rotman, 1961*), detectando una enzima indirectamente a través de los productos de su reacción. Sin embargo, el primero en realizar detecciones directas con sensibilidad molecular fue *Hirschfeld (1976a, 1976b)*, quien detectó la presencia de un anticuerpo individual, aunque estaba marcado con aproximadamente 100 fluoróforos. Aunque en este trabajo es discutible la detección de moléculas individuales, la contribución de Hirschfeld fue significativa, ya que, reconoce la necesidad de reducir la excitación y el volumen de detección, y concluyó que el fotoblanqueamiento es una de las limitaciones en la espectroscopia de moléculas individuales.

*Moerner y Kador (1989a, 1989b)* demostraron la detección de una molécula individual usando medidas de absorción a bajas temperaturas. Desde

entonces ha habido un rápido crecimiento en el número de trabajos en espectroscopia de moléculas individuales centrados principalmente en estudios fluorescentes. Un importante paso adelante fue el desarrollo instrumental y metodológico de la técnica para aplicarse a moléculas individuales en disolución y a temperatura ambiente, como las contribuciones de *Dovich* *et al.* (1983), *Nguyen et al.* (1987) y *Shera et al.* (1990). Sus trabajos tuvieron una gran influencia en el cada vez más creciente interés de las medidas de fluorescencia de moléculas individuales en ensayos biológicos bajo condiciones fisiológicas.

*Betzig* y *Chichester* (1993) realizaron experimentos con sensores de fibra óptica para detectar moléculas fluorescentes inmovilizadas en superficies, mostrando que la orientación de sus momentos dipolares se puede representar en un mapa de intensidades de fluorescencia usando esta técnica. Sin embargo, el mayor desarrollo llegó cuando se incorporó la microscopía óptica confocal a las medidas de moléculas individuales (*Bian et al.*, 1995; *Macklin et al.*, 1996; *Riglers y Mets*, 1992). Su simplicidad y el relativo bajo coste han facilitado que, en la última década haya crecido exponencialmente el número de trabajos publicados que emplean la espectroscopia de fluorescencia de moléculas individuales aplicada a la química, la física y la biofísica.

La mayoría de las aplicaciones realizadas en microscopía de moléculas individuales se basan en medidas de colorantes que pueden estar inmovilizados en superficies o difundiendo libremente en un volumen determinado de la muestra. Los experimentos en disolución tienen la ventaja de que permiten la detección de un gran número de moléculas durante el tiempo de medida, pero la desventaja de que el tiempo de observación de cada molécula está limitado por el paso por difusión a través del volumen de excitación, típicamente alrededor de un milisegundo. De otro lado, los estudios en moléculas inmovilizadas permiten tiempos de observación de cada molécula

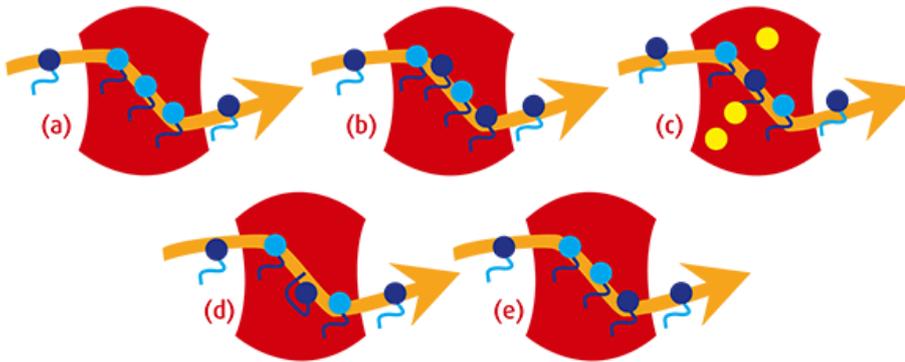
mucho más largos, que pueden llegar al minuto y limitados por la fotodestrucción del fluoróforo, pero se realizan sobre un limitado número de moléculas. Ambos tipos de experimentos requieren de instrumentaciones ligeramente diferentes. Los experimentos en disolución suelen realizarse empleando un microscopio confocal que focaliza el láser de excitación en un volumen muy pequeño de muestra. En cambio, el estudio de moléculas inmovilizadas puede también realizarse en una configuración confocal, o adicionalmente empleando una combinación de iluminación por reflexión interna total (TIR) y recogida de imágenes con cámaras basadas en detectores de carga acoplada (CCD). En la iluminación por TIR el láser de excitación entra al objetivo del microscopio en cierto ángulo que produce reflexión total del haz en la interfase. Esto genera un campo electromagnético evanescente que penetra hasta 100 nm dentro de la muestra, permitiendo la excitación específica de las moléculas que se encuentran cercanas a la superficie de la interfase objetivo – muestra. Esta característica hace también que sea la metodología preferida en el estudio de sistemas biológicos y moléculas individuales en el interior de células (*Mashanov et al., 2003, 2004*).

En esta Memoria se han estudiado exclusivamente las moléculas difundiéndose libremente en un volumen confocal. En cuanto al tratamiento de datos, se ha empleado la espectroscopía de correlación de fluorescencia, es por tanto que esta técnica se comenta con más detalle a continuación.

I.6.1. Espectroscopía de correlación de fluorescencia.

I.6.1.1. Fundamentos

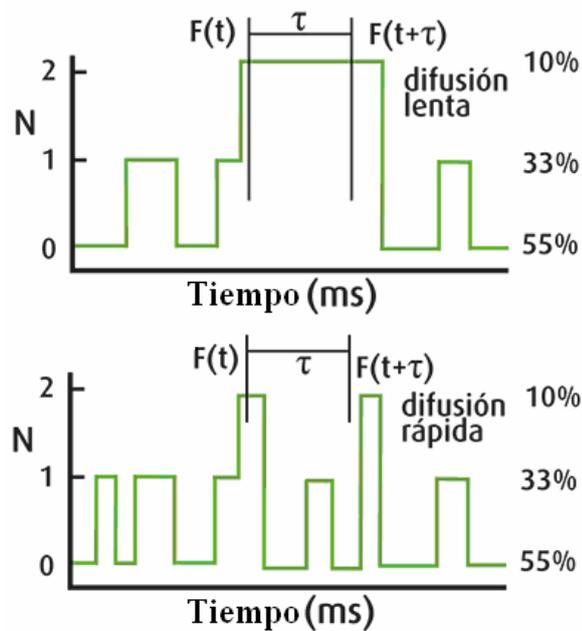
La espectroscopía de correlación de fluorescencia (FCS) está basada en el análisis estadístico de las fluctuaciones de la intensidad de fluorescencia dependientes del tiempo sufridas por un fluoróforo difundiendo por un volumen pequeño de excitación y que son el resultado de algún proceso dinámico. La figura I-27 representa de forma esquemática y general, algunos de los procesos que pueden originar fluctuaciones de la intensidad de fluorescencia y que, por lo tanto, se pueden monitorizar por FCS.



**Figura I-27.** Esquema que muestra algunos de los procesos que conducen a las fluctuaciones en un experimento de difusión de moléculas individuales. **a)** Difusión de una molécula en un volumen de excitación. **b)** Cruce entre sistemas ocasionando una fluorescencia intermitente. **c)** Unión reversible a una segunda molécula no fluorescente, pero que amortigua la fluorescencia del fluoróforo. **d)** Modificación conformacional que induce cambios en la emisión fluorescente. **e)** Fotoblanqueamiento.

Por ejemplo, en una muestra compuesta por fluoróforos en disolución se monitoriza el número efectivo de fluctuaciones de la especie fluorescente en un volumen definido por un microscopio de fluorescencia. La intensidad de fluorescencia emitida desde este volumen fluctuará según los fluoróforos

difundan dentro y fuera del volumen de observación. Los cambios en el número de moléculas en dicho volumen repercutirá en la intensidad de fluorescencia detectada en cada momento; si la difusión es lenta, los fluoróforos saldrán lentamente del volumen de detección, por el contrario si la difusión es rápida, la ocupación numérica variará más rápidamente y, por tanto, también lo hará la intensidad de fluorescencia. Tal y como se observa en la figura I-28, esta intensidad es dependiente del tiempo y se analiza estadísticamente para determinar la distribución de la amplitud y frecuencia de las fluctuaciones. La intensidad a un tiempo dado  $F(t)$  se compara con la intensidad a un tiempo ligeramente posterior  $F(t + \tau)$ . Si la difusión es lenta  $F(t)$  y  $F(t + \tau)$  serán probablemente similares (ver imagen superior), mientras que si es rápida, probablemente serán diferentes (imagen inferior).



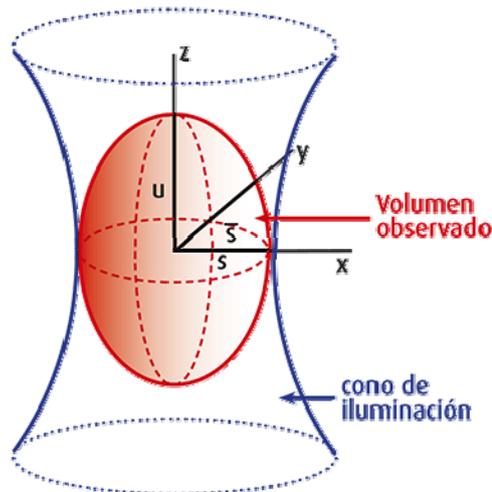
**Figura I-28.** Fluctuaciones en el número de fluoróforos (N) en el volumen observado de 1 fL con concentración 1 nM de fluoróforo.

En un experimento de FCS se calcula la función de autocorrelación  $G(\tau)$ , es decir la correlación entre  $F(t)$  y  $F(t + \tau)$  para un determinado de tiempo de retardo,  $\tau$ . La función  $G(\tau)$  contiene información sobre el coeficiente de difusión y el número de fluoróforos que ocupan el volumen observado. Asimismo, permite estudiar otro tipo de fluctuaciones originadas por otros procesos tales como desactivaciones fotofísicas, determinadas reacciones químicas, cambios estructurales en una molécula, etc.

La teoría de la FCS está basada en la estadística de Poisson. Para eventos discretos al azar, el número de fluoróforos en el volumen de observación se puede describir por la distribución de Poisson:

$$P(n, N) = \frac{N^n}{n!} e^{-N} \quad (\text{I-42})$$

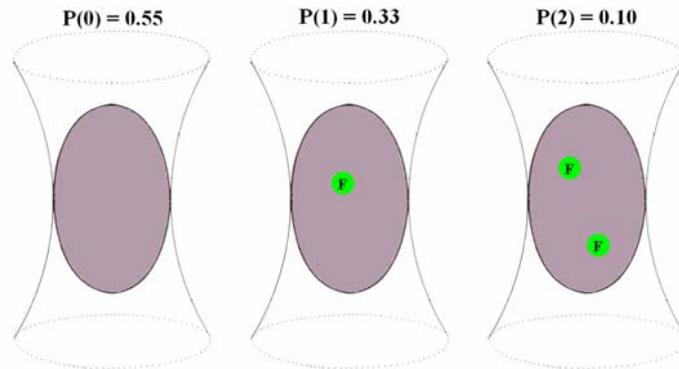
en esta expresión  $P(n, N)$  es la probabilidad de que  $n$  fluoróforos estén presentes en un volumen cuando el número medio de moléculas en ese volumen es  $N$ .



**Figura I-29.** Volumen de observación típico en un experimento FCS.

En un volumen de detección de 1 fL y a una concentración de fluoróforo de 1 nM se observará un número medio de 0.6 moléculas ( $N$ ). Mediante la ecuación

II-19 se calcula que bajo estas condiciones, se encontrarán un 55% de probabilidad de que el volumen no contenga ningún fluoróforo, un 33% de que el volumen contenga 1 fluoróforo y un 10% de que el volumen contenga 2 fluoróforos, tal como se esquematiza en la figura I-30.



**Figura I-30.** Distribución de Poisson de una disolución 1nM fluoróforo en un volumen de 1 fL.

Al estar regido el número de moléculas contenidas en el volumen de observación a un tiempo dado por una distribución Poissoniana, la raíz cuadrada de las fluctuaciones medias del número de partículas  $\delta N$  está dada por:

$$\frac{\sqrt{\langle(\delta N)^2\rangle}}{\langle N\rangle} = \frac{\sqrt{\langle(N - \langle N\rangle)^2\rangle}}{\langle N\rangle} = \frac{1}{\sqrt{\langle N\rangle}} \quad (\text{I-43})$$

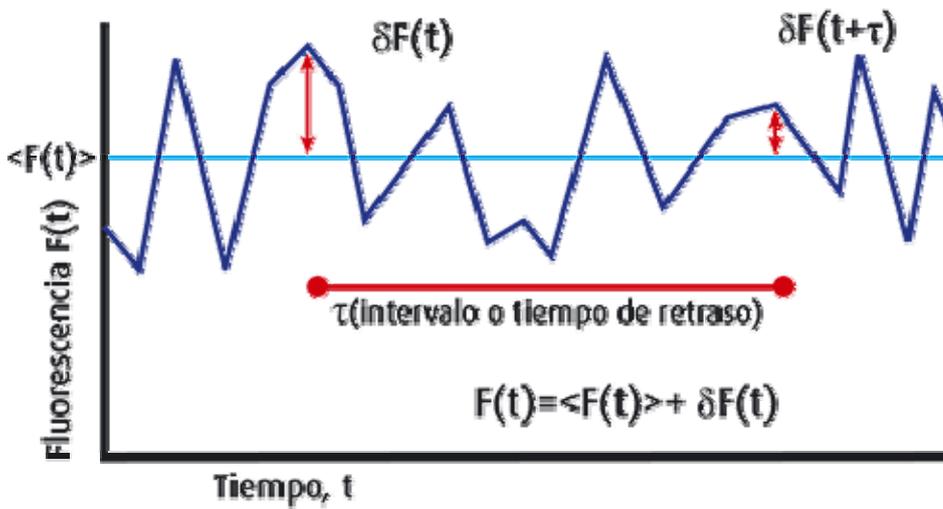
Dado que las fluctuaciones relativas se vuelven más pequeñas con el incremento del número de partículas medidas, es importante minimizar el número de moléculas en el volumen observado. Sin embargo, la señal fluorescente debe ser, a pesar de ello, más alta que la señal residual de fondo. Aproximadamente, el número medio de partículas debería estar entre 0.1 y 1000. Siendo el volumen de observación alrededor de un femtolitro, esto correspondería a concentraciones por debajo de nanomolar ( $< 10^{-9}\text{M}$ ) hasta micromolar ( $10^{-6}\text{M}$ ).

Asumiendo una intensidad de excitación constante, las fluctuaciones de la señal de fluorescencia  $\delta F(t)$  se definen como desviaciones del valor medio de la señal, tal como se representa en la figura I-31.

$$\delta F(t) = \langle F \rangle - F(t) \quad (I-44)$$

Donde:

$$\langle F(t) \rangle = \frac{1}{T} \int_0^T F(t) dt \quad (I-45)$$



**Figura I-31.** Ilustración que muestra una fluctuaciones en la señal de fluorescencia, junto a las definiciones de los parámetros usados en la ecuación II-20.

Si todas las fluctuaciones surgen de los cambios en la concentración local,  $\delta C$ , dentro del volumen efectivo,  $V^{ef}$ , estas variaciones pueden escribirse como:

$$\delta F(t) = \kappa \int_V I_{ex}(r) \cdot S(r) \cdot \delta(\sigma \cdot q \cdot C(r,t)) \cdot dV \quad (I-46)$$

donde:

-  $\kappa$  es la eficiencia de detección total.

-  $I_{ex}(r)$  es la distribución espacial de la energía de excitación en el máximo de amplitud  $I_0$ .

-  $S(r)$  es la función de transferencia óptica de la combinación objetivo-  
rendija, esto determina, la eficiencia de la configuración espacial y es  
adimensional.

-  $\delta(\sigma \cdot q \cdot C(r, t))$  son los procesos dinámicos del fluoróforo a nivel  
de moléculas individuales.  $\delta\sigma$  representa las fluctuaciones en la absorción  
molecular de las secciones transversales,  $\delta q$  las fluctuaciones en el rendimiento  
cuántico y  $\delta C(r, t)$  las fluctuaciones en la concentración local a tiempo  $t$ .

La determinación de todos estos parámetros es extremadamente difícil,  
a menudo imposible. Con el objeto de simplificar la ecuación I-47, el factor de  
convolución de las dos funciones de transferencia óptica espacial  
adimensionales  $I_{ex}(r)/I_0 \cdot S(r)$  se combina en una función  $W(r)$ , la cual  
describe la distribución espacial de la luz emitida. A menudo, esta función se  
aproxima a un modelo Gaussiano tridimensional, que decae a  $1/e^2$  a  $r_0$  en  
dirección lateral y para  $z = z_0$  para dirección axial:

$$W(r) = e^{-2\frac{x^2+y^2}{r_0^2}} \cdot e^{-2\frac{z^2}{z_0^2}} \quad (I-47)$$

Los parámetros restantes:  $\kappa$ ,  $\sigma$  y  $q$  pueden combinarse con la amplitud  
de intensidad de excitación  $I_0$ , para dar un parámetro que determina el número  
de fotones detectados por molécula y por segundo:  $\eta_0 = I_0 \cdot \kappa \cdot \sigma \cdot q$ . Este  
parámetro puede ser determinado por la relación señal/ruido de la medida y, por  
tanto, usado para comprobar la calidad de los datos. Con esta información, la  
ecuación I-46 quedaría como:

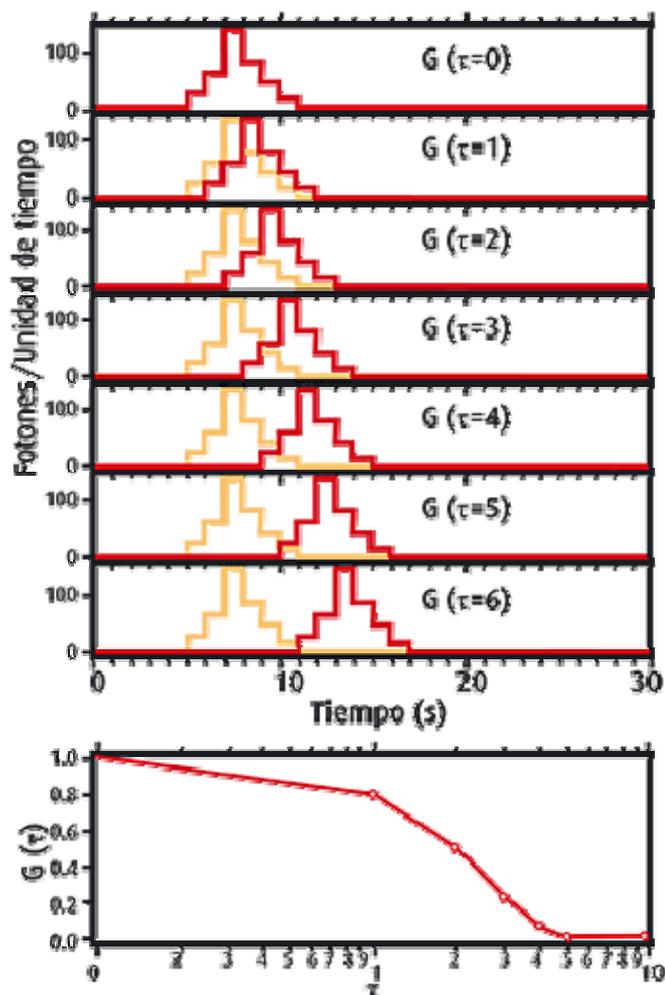
$$\delta F(t) = \int_V W(r) \delta(\eta C(r, t)) dV \quad (I-48)$$

La función de autocorrelación de intensidad de fluorescencia viene dada por el producto de la intensidad al tiempo  $t$ ,  $F(t)$  por la intensidad después de un tiempo de retardo  $\tau$ ,  $F(t + \tau)$ , promediado sobre un largo número de medidas. El tiempo de retardo  $\tau$  es la diferencia en tiempo real entre las medidas de  $F(t)$  y  $F(t + \tau)$ , típicamente en un intervalo que cubre varios órdenes de magnitud, entre unos pocos nanosegundos hasta varios segundos. Las cantidades de interés son las fluctuaciones en  $F(t)$  alrededor del valor medio,  $\delta F(t) = \langle F \rangle - F(t)$ . La función de autocorrelación de la intensidad de fluorescencia normalizada por el cuadrado de la intensidad de fluorescencia media,  $\langle F(t) \rangle$ , se escribe como:

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) \times \delta F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} \quad (I-49)$$

En la figura I-31 se observan las amplitudes de las fluctuaciones,  $\delta F(t)$  y  $\delta F(t + \tau)$ , respecto del valor medio de la señal,  $\langle F(t) \rangle$ , a los tiempos  $t$  y  $t + \tau$ , respectivamente. Así, la autocorrelación es la media normalizada del producto de la fluctuación de una señal (desde la media) a un tiempo,  $t$ , con la fluctuación (desde la media) a un tiempo posterior,  $t + \tau$ . La función de autocorrelación calculada para una señal  $F(t)$  es el valor de este producto normalizado como una función del tiempo de retardo. La amplitud de la función de autocorrelación a un tiempo de retardo dado,  $\tau$ , está por lo tanto relacionada con la persistencia relativa de fluctuaciones en los datos medidos en la escala temporal  $\tau$ . La descripción de la autocorrelación se representa esquemáticamente en la figura I-32 que muestra como ese cálculo puede proporcionar información de la persistencia de fluctuaciones que pueden estar presentes en un experimento de moléculas individuales. Las curvas de autocorrelación se presentan

generalmente mediante una representación semi-logarítmica ya que el intervalo de tiempos de retraso se expande sobre varios órdenes de magnitud.

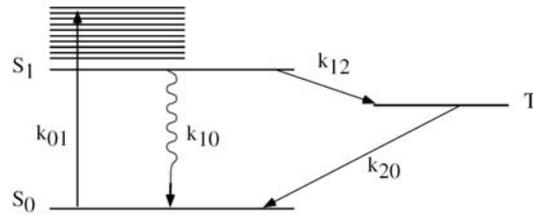


**Figura I-32.** Representación esquemática del principio del cálculo de autocorrelación de un conjunto de una molécula individual. Un destello de fluorescencia  $F(t)$ , es desplazado por el tiempo de integración  $\tau$ . Las trazas original y desplazada se multiplican entre ellas,  $F(t) \times F(t + \tau)$ , y el área integrada se almacena como el valor de la función de autocorrelación al tiempo de retardo  $\tau$ .

Las fluctuaciones de fluorescencia más típicas en un experimento de FCS son:

- Difusión translacional: siendo ésta, probablemente la medida más sencilla que se puede realizar en FCS. Consiste en el propio desplazamiento del fluoróforo a través del volumen de observación.
- Difusión rotacional: La probabilidad de excitación de un colorante depende del ángulo formado entre el momento dipolar de la molécula y la polarización de la luz de excitación. De esta manera, si un colorante puede rotar libremente, su velocidad de excitación y por lo tanto su emisión presentará fluctuaciones. En la mayoría de los casos, el tiempo de difusión rotacional es difícil de detectar, ya que tiene poca contribución y coincide temporalmente con otros fenómenos.
- Conversión al estado triplete: Para que se produzca la excitación de los fluoróforos, se debe asegurar la excitación de las moléculas de tal manera que los electrones pasen del estado fundamental  $S_0$  al estado excitado  $S_1$ , y regresen al estado fundamental emitiendo un fotón. La velocidad de la transición  $S_0 \rightarrow S_1$  está controlada por la intensidad de excitación y el coeficiente de absorción molar, sin embargo, la velocidad de relajación  $S_1 \rightarrow S_0$  es la inversa del tiempo de vida del estado excitado, y se vuelve el factor limitante a altas intensidades de excitación. Bajo estas condiciones, se produce una alta población en el estado excitado  $S_1$  y es entonces cuando ocurre el intercambio de sistemas entre el estado  $S_1$  al estado triplete,

T, y de ahí al estado fundamental  $S_0$ . La vuelta al estado fundamental desde T es un proceso lento, al ser una transición prohibida.

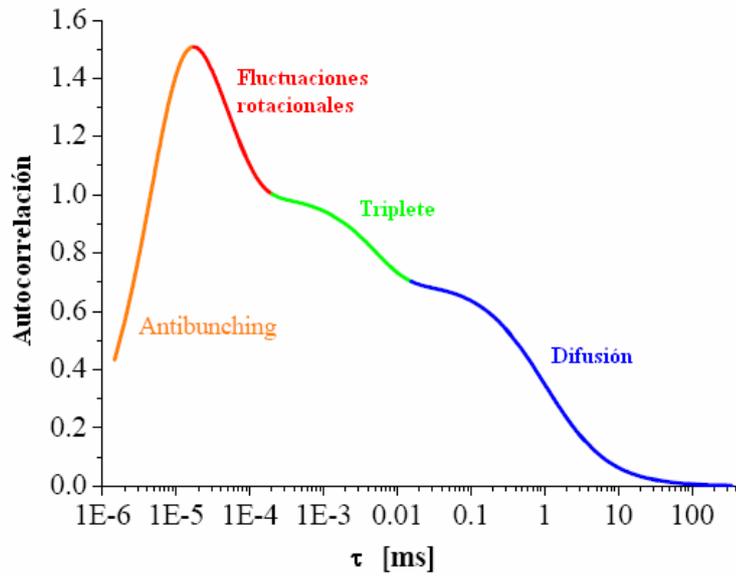


**Figura I-33.** Diagrama de Jablonski simplificado.  $S_0$ , estado fundamental (singlete);  $S_1$ , estado excitado singlete; T, estado triplete.

- *Antibunching*: Es el proceso mas rápido que es capaz de detectar la FCS. Describe la probabilidad finita de un cromóforo de emitir un fotón a un tiempo  $t$  teniendo en cuenta que la última fue emitida a  $t = 0$ . Este proceso muestra una subida inicial de la curva de autocorrelación, en el rango del tiempo del tiempo de fluorescencia del colorante.

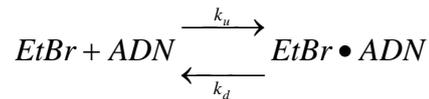
$$G_{antibunching}(\tau) = -\frac{9}{5} \cdot e^{-\frac{\tau}{\tau_{fluorescencia}}} \quad (\text{I-50})$$

En la figura I-34 se muestran los intervalos temporales de los principales procesos de una FCS que pueden afectar a la función de autocorrelación. Sin embargo, uno necesita tener cuidado en la interpretación de las primeras fluctuaciones aparecidas en cualquier FCS, porque es cuando pueden aparecer artefactos, como por ejemplo, señales residuales del detector.



**Figura I-34.** Intervalo temporal de varios procesos seguidos por análisis de autocorrelación.

*Magde, Elson y Webb (1972)* fueron los primeros en sugerir el método de obtener las propiedades moleculares de una muestra a través de las fluctuaciones, los cuales monitorizaron las fluctuaciones del equilibrio químico de la unión del bromuro de etidio a la cadena doble de ADN. El bromuro de etidio (EtBr) es un pequeño colorante intercalador, cuyo rendimiento cuántico aumenta veinte veces cuando se introduce entre las bases del ADN. Así, *Magde et al.*, (1972) estudiaron el equilibrio de la unión:



a través de la monitorización de las fluctuaciones de fluorescencia del colorante. La implementación original de la función de correlación de fluorescencia utilizó un láser de excitación de  $6 \text{ kW cm}^{-2}$  a  $514.5 \text{ nm}$ . La fluorescencia se recogió por un reflector parabólico, filtrando la luz dispersa de excitación con una solución

de  $K_2Cr_2O_7$ , y detectada con un tubo fotomultiplicador. La señal fluorescente fue analizada con dos correlacionadores de 100 canales. Las concentraciones típicas fueron de  $5 \mu M$  para el bromuro de etidio, y  $5 nM$  para el DNA sonificado de timo de ternero de  $20 kDa$ . Las dimensiones del volumen de recogida fue de  $5 \mu m$  transversalmente y  $150 \mu m$  longitudinalmente: por lo tanto se encontraban sobre  $10^4$  moléculas en el campo de visión. Las escalas de tiempo obtenidas de la relajación para la función de autocorrelación de la fluorescencia comprendían un rango entre 10-100 ms. En este experimento existen dos fluctuaciones fluorescentes distintas: por un lado, la difusión de las moléculas entrando y saliendo del volumen de medida, y por el otro; las fluctuaciones químicas asociadas a la unión y disociación del EtBr.

La velocidad de relajación  $R$ , caracteriza la unión/disociación, se deduce de los ajustes a la función de autocorrelación de fluorescencia y depende linealmente de la concentración de EtBr.

$$R = k_u([EtBr] + [ADN]) + k_d \approx k_u([EtBr] + k_d)$$

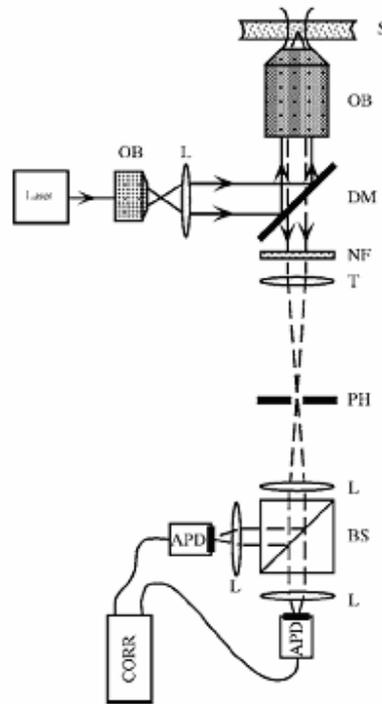
Esta dependencia fue medida por *Magde et al. (1972)* obteniendo:  $k_u = 1.5 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$  y  $k_d = 27 s^{-1}$ .

Este experimento demostró la capacidad de evaluación de los parámetros de las cinéticas químicas a través del análisis de las fluctuaciones del equilibrio químico. Asimismo, fijó las bases para la implementación de la FCS y otras técnicas relacionadas.

### I.6.1.2. Instrumentación.

Sin embargo, fue en 1993 cuando esta técnica tuvo un resurgimiento espectacular con la implementación de la microscopía confocal por *Rigler et al. (1993)*. Las medidas de FCS requieren un volumen de detección muy pequeño, al objeto de asegurar la presencia de pocas moléculas. Por lo tanto, requieren una amplitud grande de la función de correlación, así como una alta eficiencia en la detección de los fotones y la disminución eficaz del ruido de fondo. Como se ha indicado anteriormente, la construcción por parte de *Rigler et al. (1992, 1993)* de un esquema basado en un sistema confocal se ajusta perfectamente a los requerimientos antes citados.

En la disposición confocal (ver figura I-35) la excitación láser es dirigida por medio de un espejo dicróico hacia un objetivo, el cual enfoca la luz en la muestra. La emisión fluorescente es recogida a través del mismo objetivo y enfocada hacia una abertura, de manera que el haz de fotones emitidos pasa a través de la apertura de dicha abertura, delimitando el volumen de detección. La suma del objetivo y de la abertura crea un filtro espacial que delimita el volumen de la muestra a un pequeño tamaño, siempre limitado por la difracción. Después de la abertura, la señal fluorescente se recoge directamente por un detector contador de fotones y es procesada para generar la función de autocorrelación.



**Figura I-35.** Esquema de una configuración confocal estándar para FCS. Abreviaciones: *S*: Muestra; *OB*: Objetivo; *L*: Lente; *DM*: Espejo dicróico; *NF*: Filtro; *T*: Tubo con lente; *PH*: Abertura; *BS*: Divisor de haz; *APD*: Fotodiodo en avalancha; *CORR*: Correlacionador.

Como se ve en la figura I-35, usualmente se emplean no uno si no dos detectores (APD) tras un divisor del haz de fluorescencia. Empleando un único detector, la función de autocorrelación queda muy distorsionada a tiempos de retardo menores de 1  $\mu$ s debido al fenómeno de “afterpulsing” en el detector. Este fenómeno tiene como efecto un pico en la función de autocorrelación, originado por la probabilidad de que un fotón genere dos pulsos electrónicos en el detector. Para evitar este fenómeno, se divide la luz de la muestra y se hace incidir en dos fotodetectores, correlacionando la señal entre ellos. En este caso, la función de correlación cruzada es semejante a la función de autocorrelación y está libre del fenómeno de “afterpulsing”.

### I.6.1.3. Modificaciones.

Además, existen algunas otras variaciones de la técnica estándar de FCS, que presentan mejoras en los resultados obtenidos:

- FCS de dos colores. La utilización de dos detectores permite además realizar el análisis de correlación cruzada separando la fluorescencia de dos fluoróforos de espectros diferentes (*Schwille et al., 1997*). El principio de esta técnica consiste en que la luz que llega a los detectores ha sido separada previamente por un espejo dicróico y filtros adecuados que dividen la emisión fluorescente de dos colorantes, de tal manera que a cada detector le llegue la emisión de cada una de las especies. Cuando estos dos fluoróforos se encuentran etiquetando moléculas distintas la función de correlación cruzada generada es sensible solo a la señal de las moléculas que incluyen ambos componentes, es decir, la señal de los productos doblemente marcados procedentes de la interacción entre las dos moléculas etiquetadas. Es, por tanto, una técnica especialmente adecuada para estudiar las interacciones entre biomoléculas, interacciones proteína – proteína, interacciones proteína – ligando, complejos riboproteicos, etc. Además, es habitual el uso de diferentes láseres para excitar simultáneamente a los colorantes. Para esto, la fuente de excitación se opera en modo multi-línea (*Winkler et al., 1999*), o bien se añade el segundo láser a la disposición usual (*Schwille et al., 1997*).

- Fenómeno de transferencia resonante de energía de fluorescencia (FRET): una transferencia de energía entre dos fluoróforos diferentes (dador y aceptor), donde se superponen los espectros de emisión del dador con el de excitación del aceptor. La eficiencia de la transferencia de energía depende fundamentalmente de la distancia entre el dador y el aceptor, lo que permite que este proceso sea utilizado como “regla molecular” (en el rango

entre 10 y 100 Å) (Lakowicz, 1999). La unión de la FRET con experimentos de fluorescencia de moléculas individuales está abriendo en los últimos años un amplio campo de estudio y proporcionando información sin precedentes sobre los sistemas biológicos (Selvin, 2000; Deniz *et al.*, 1999), ya que permite tanto seguir la asociación de dos moléculas (Ha *et al.*, 1996) como monitorizar la distancia entre dos sitios en una macromolécula marcada con dos colorantes adecuados (Hillisch *et al.*, 2001). Esto está siendo de gran relevancia en el estudio de cambios conformacionales dinámicos en biomoléculas (Weiss, 2000; Sugawa *et al.*, 2007), como por ejemplo los que suceden en los mecanismos de acción de enzimas (Ha *et al.*, 1999), o en el estudio del plegamiento de proteínas (Jia *et al.*, 1999) o ARN (Zhuang *et al.*, 2000).

- Espectroscopia de correlación de imagen y escaneo. La FCS estándar es altamente sensible a las fluctuaciones de las partículas fluorescentes que pasan rápidamente por el volumen de detección, sin embargo, es relativamente insensible a las partículas inmovilizadas o agregados que difunden muy lentamente (p. ej. proteínas ancladas en membranas). Esto puede evitarse bien por el paso de la muestra por el haz del láser, o bien por el paso del láser a través de la muestra (Petersen, 1986; Petersen *et al.*, 1986; Berland *et al.*, 1996). En ambos casos, los agregados fluorescentes atraviesan el volumen de detección y la intensidad de emisión fluctúa. De forma análoga a la FCS estándar, se puede deducir el número de partículas fluorescentes a partir de la amplitud de la función de correlación de las fluctuaciones. La misma idea fue usada en la espectroscopia de correlación de imagen (Petersen *et al.*, 1993; Huang y Thompson, 1996; Srivastava y Petersen, 1998; Wiseman y Petersen, 1999), en donde la correlación espacial sustituye a la correlación temporal.

- FCS con ventana temporal. Lamb *et al.* (2000) mejoraron la técnica FCS estándar, aprovechando el hecho de que los distintos colorantes poseen diferentes tiempos de vida de fluorescencia y que éstos se pueden

modificar al unirse a otras moléculas. Por tanto, cuando se utiliza una iluminación pulsada se puede suprimir selectivamente el contaje de los fotones a tiempos de fluorescencia determinados, lo cual elimina interferencias y mejora la contribución de las especies relevantes, mejorando la función de correlación calculada.

- Reflexión interna total (TIR) en FCS. En este tipo, la FCS se combina con la iluminación por TIR utilizada en la microscopía de fluorescencia, y citada anteriormente. El haz de láser se introduce en un medio de densidad óptica menor, reflejándose totalmente en la interfaz sólido/líquido y produciendo excitación únicamente en las moléculas adsorbidas a la superficie. Esta técnica se utilizó en algunos de los primeros experimentos de FCS (*Thompson et al., 1981; Thompson y Axelrod, 1983*), y aunque no se implantó en estudios posteriores, las interesantes alternativas en la investigación sobre superficies ha permitido extender su estudio a aplicaciones biológicas en medidas de difusión lateral de proteínas insertadas en membranas celulares. (*Ohsugi et al. 2006*)

- FCS-inversa. *Wennmalm et al. (2009)* innovaron con una versión alternativa de FCS en la que se pueden detectar partículas no fluorescentes de tamaño comprendido entre 100 y 800 nm de diámetro. La metodología consiste en saturar el volumen de excitación con un gran número de moléculas fluorescentes, creando un medio brillante con una intensidad de fluorescencia constante. Cuando las grandes partículas no fluorescentes penetran en este volumen, éstas producirán una disminución en la señal de fluorescencia al desplazar parte de los fluoróforos. En la formación de la FCS-inversa se correlaciona la disminución de fluorescencia cuando una partícula atraviesa el volumen de detección. La gran ventaja que presenta la FCS-inversa es permitir el análisis del tamaño y concentración de partículas mayores de 100 nm de diámetro, sin necesidad de marcarlas con colorantes.

#### I.6.1.4. Aplicaciones y futuro

La FCS es esencialmente una herramienta espectroscópica, cuya versatilidad y fácil implementación ha abierto nuevas posibilidades en física estadística experimental, biofísica y química analítica. El formalismo analítico desarrollado por *Magde et al. (1972)*, con la incorporación de la geometría confocal y las mejoras en la detección de fotones, abre nuevas posibilidades de aplicación de la FCS. De esta manera, desde su resurgimiento, la FCS ha sido utilizada en medidas de movilidad rotacional y translacional de moléculas en disolución, por ejemplo en la determinación de coeficientes de difusión de distintos fluoróforos (*Petrásek y Schwille, 2008*), en experimentos *in vivo* con la obtención del coeficiente de difusión de colorantes en el interior del citoplasma celular (*Petrásek y Schwille, 2008*) o en el estudio de la polaridad de proteínas en el citosol y córtex antes de la división celular (*Petrásek et al., 2008*), en la caracterización fotodinámica de moléculas fluorescentes, tales como las proteínas fluorescentes verde (GFP) (*Widengren et al., 1999a*) o roja (RFP) (*Schenk et al., 2004*), así como en monitorización de las fluctuaciones de proteínas fluorescentes (GFP) (*Widengren et al., 1999b*) y ácidos nucleicos (*Bonnet et al., 1998*).

El resurgimiento de la FCS coincide con la introducción de nuevos paradigmas en las ciencias biológicas. Durante largo tiempo se han obviado la relevancia de las fluctuaciones termales en la dinámica de las proteínas, así como la importancia de las variaciones estocásticas en sistemas biológicos. Sin embargo, los nuevos experimentos sobre el plegamiento proteico y dinámica enzimática, están comenzando a mostrar que las fluctuaciones conformacionales son determinantes para la viabilidad en los sistemas biológicos.

Por ejemplo, en el estudio de la cinética de la polimerización de la proteína RecA en ADN, *Leger et al. (1998)* llegaron a la conclusión de que los monómeros de RecA se unen a las conformaciones extendidas de ADN originando fluctuaciones espontáneas. En el mismo modelo que el anterior, *Volkman et al. (2001)* mostraron que la excitación térmica, produce cambios alostéricos que originan una fosforilación que produce la activación de la proteína NtrC. Más ejemplos de la inter-relación entre las fluctuaciones biomoleculares y sus respectivas funciones han sido descritas por *Frauenfelder y McMahon (1998)* y *Kumar et al. (2000)*.

Uno de los potenciales de la FCS es que, precisamente, corrige las deficiencias que presentan otras técnicas precursoras en este sentido, tal como la monitorización de la relajación de las fluctuaciones alrededor del equilibrio. Por ellos, puede implementarse satisfactoriamente en el estudio de interacciones biomoleculares a través de las fluctuaciones conformacionales. Es destacable que el análisis estadístico de las fluctuaciones fluorescentes a través de la FCS es un método no invasivo, con grandes perspectivas en física biológica.

En el futuro, los avances en instrumentación, informática y marcadores fluorescentes permitirán la expansión de las aplicaciones en FCS en biología y química. Las combinaciones de la FCS con la excitación mejorada de superficie (*Kawata et al., 1999*) o el confinamiento de muestras en nanoestructuras ópticas (*Levene et al., 2000*) podrían proporcionar la capacidad de utilizar concentraciones más altas ( $>1\mu\text{M}$ ) en FCS y mejorar la resolución en estructuras subcelulares. Las nanoestructuras han demostrado su utilidad en experimentos de interés biológico, como son los plegamientos de proteínas (*Pollack et al. 1999*). En combinación con FRET, la FCS podría incluso seguir la investigación de procesos dinámicos intra-moleculares (*Gurunathan y Levitus, 2010*). Los detectores con una eficiencia mejorada y bajo ruido de fondo deben de proporcionar mejoras en los estudios de moléculas individuales.

Actualmente, los sistemas microscópicos en FCS, detectan menos del 5% de la fluorescencia emitida, con una significativa pérdida debida a la apertura confocal requerida. La optimización de esta geometría, significaría una mejora en la eficiencia de la detección.

## *II. Material 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 del valor 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:  $10^{-5}$  q  $10^{-1}$  (ppm o g/L). Para su calibración se han utilizado tampones estándar de pH 4.00 y 7.02 (casa Crison), con un error de medida de  $\leq 0.01$  para el valor de pH,  $\leq 0.5$  mV y  $\leq 0.3$  °C.

### **II.1.2. Balanza**

Se ha utilizado 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.1.3. Espectrofotómetro de absorción.**

Para las medidas de absorbancia y espectros de absorción se ha empleado un espectrofotómetro UV-Visible, GBC-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, tanto por ciento de

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 software que acompaña al instrumento. Se completa con un equipo de termostatación para los compartimentos de celda, tanto de referencia como de muestra.

### II.1.4. Espectrofluorímetro en estado estacionario.

Los espectros de fluorescencia en estado estacionario se han registrado utilizando un espectrofluorímetro Jasco FP-6500. Se trata de un instrumento de cuarta generación, con control externo desde un ordenador, mediante el software *Spectra Manager*. 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 Xenón, equivalente a 150 W. El detector es un fotomultiplicador R3788-01. Los monocromadores son rejillas holográficas con 1800 ranuras/nm y cubren los intervalos entre 220 y 750 nm.

La sincronización de los espectros es posible con una longitud de onda o diferencia de energía constante. La sensibilidad de las medidas es de  $\pm 0.1$  nm y la reproductibilidad de  $\pm 0.3$  nm. El paso de banda de las rendijas se puede seleccionar entre 1, 3, 5, 10, 20, L5 y L10 nm para la de excitación y emisión. La velocidad de barrido es también un parámetro controlable, con velocidades que pueden ir entre 20 y 5000 nm/min, dependiendo de la respuesta y sensibilidad utilizada. Asimismo es posible seleccionar filtros para diversas longitudes de onda o atenuador de la transmitancia. La sensibilidad posee una

relación señal-ruido de  $>200:1$  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 por un PELTIER y capacidad para cubetas de  $10 \times 10$  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 por el software corrigen la emisión.

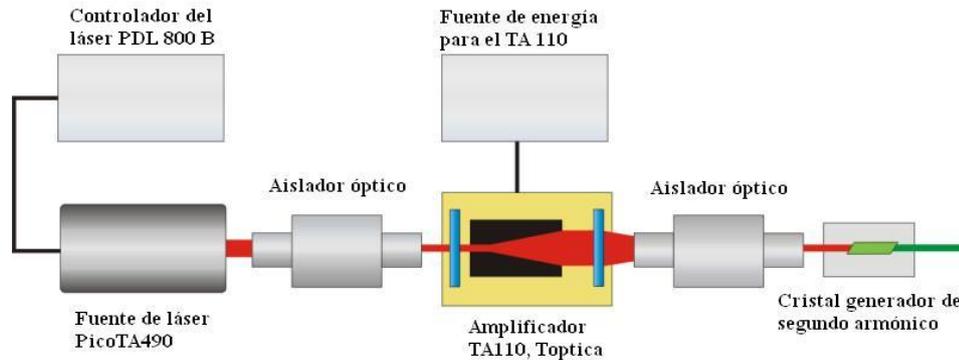
#### II.1.5. Fluorímetro con resolución temporal y excitación láser.

En las medidas de fluorescencia resuelta en el tiempo se empleó un espectrofluorímetro con resolución temporal Fluotime 200 (PicoQuant GmbH) basado en la metodología de conteo de fotones individuales correlacionados en el tiempo (time correlated single photon counting; TCSPC) y provisto de un sistema de excitación láser. Describiremos a continuación, por una parte, la fuente de excitación láser, y por otra, el sistema completo de TCSPC.

##### II.1.5.1. Fuente de excitación láser.

La fuente de excitación consiste en un láser pulsado de diodos de picosegundo de alta potencia (modelo PicoTA 490, PicoQuant GmbH). La fuente láser proporciona un tren de pulsos de hasta 40 MHz y una anchura de pulsos con una amplitud mínima de 54 ps. La longitud de onda de emisión del láser es de 488 nm gracias a la generación del segundo armónico de la fuente láser primaria. La fuente de excitación va acompañada de un sistema

controlador PDL 800 B (PicoQant GmbH), que cuenta con un oscilador de cristal que genera fluctuaciones mas bajas que la frecuencia madre, y por lo tanto permite dividir entre factores binarios (1, 2, 4, 8 ó 16) la frecuencia de repetición del pulso láser, es decir, se podrá generar un rango de frecuencias de pulsos de: 40, 20, 10, 5 y 2.5 MHz.



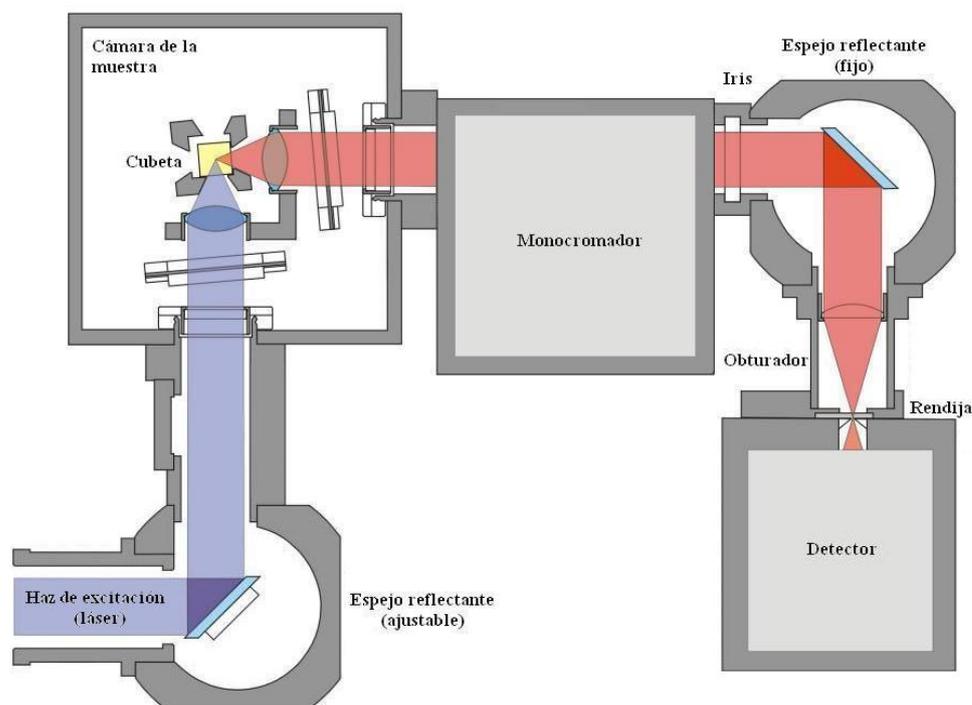
**Figura II-1.** Sistema PicoTA: un láser PicoTA490 de pulso de diodo de picosegundo usado como fuente de luz para un amplificador TA110. Adicionalmente, se ha añadido un cristal SHG para doblar la frecuencia de emisión.  $\lambda^{em}$  láser = 488 nm.

Asociado al sistema antes descrito, y por motivos de la alta demanda de estabilidad, se encuentra el controlador de la temperatura DTC 110 que mantiene en todo momento una temperatura de 24.2 ° C en la fuente de láser.

#### II.1.5.2. Sistema TCSPC.

Mediante la técnica de conteo de fotones individuales correlacionados en el tiempo (TCSPC) se adquieren curvas de decaimiento de fluorescencia realizando un histograma de los tiempos de llegada de fotones individuales a lo largo de muchos ciclos de excitación/emisión. Los tiempos de llegada se van

registrando en el histograma a través de tiempos relativos entre la generación del pulso láser de excitación y la llegada de los fotones de emisión correspondientes a dicha excitación. Esta técnica se ha llevado a cabo en un espectrofotómetro de fluorescencia en tiempo resuelto, *Fluotime 200*, basado en una geometría en *L*, y controlado mediante un ordenador equipado con la tarjeta de adquisición de datos de TCSPC TimeHarp 200 (PicoQuant GmbH).



**Figura II-2.** Disposición del fluorímetro de resolución temporal *Fluotime 200*, *PicoQuant Inc.*

La radiación de excitación pulsante del láser es dirigida a la cámara de la muestra a través de una fibra óptica, allí, por medio de una lente el haz es enfocado hacia la muestra. La emisión de la muestra excitada se recoge y es

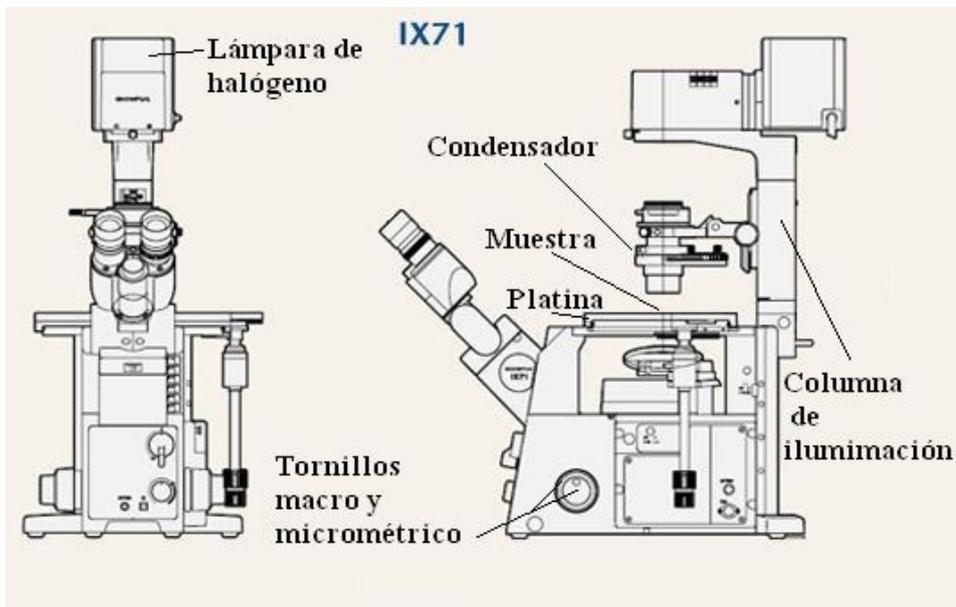
colimada a través de unas lentes en ángulo recto con respecto a la excitación. La luz emitida pasa a través de un polarizador laminar en un ángulo de 54.7° con respecto a la dirección de polarización de la luz excitatriz., para eliminar los efectos de la difusión rotacional de los fluoróforos en los decaimientos de fluorescencia; posteriormente, la luz emitida se focaliza hacia un monocromador (Science Tech Modelo 9030, f/3.5, red de difracción holográfica cóncava de 1200 líneas/mm, 8 nm/mm de dispersión angular y un intervalo espectral de 350 a 800 nm). Tras pasar por dos rendijas de anchura controlable, la detección de los fotones emitidos se realiza en un fotomultiplicador de plato de microcanales. Esta señal sirve como pulso START, y está conectado, junto al pulso STOP procedente del oscilador PDL 800 B activado por el pulso de excitación, a un ordenador equipado con la tarjeta TimeHarp 200 y el software de control, que posee integrados los dos módulos de discriminación de fracción constante (CFD), el convertidor tiempo-amplitud (TAC) y el convertidor analógico-digital (ADC). Los histogramas de decaimientos de fluorescencia se recogen a lo largo de 1036 canales.

### II.1.6. Microscopio invertido de fluorescencia en tiempo resuelto.

El sistema utilizado para realizar medidas de espectroscopía de correlación de fluorescencia (FCS) está basado en un microscopio confocal con excitación láser pulsada (*MicroTime 200*, Picoquant GmbH), con capacidad de medidas de tiempo de vida de fluorescencia, imágenes de tiempos de vida de fluorescencia, espectroscopía de correlación de fluorescencia, y sensibilidad de detección de moléculas individuales.

El sistema *MicroTime 200* está formado por cuatro partes:

- **Microscopio Olympus IX71**, se trata de un microscopio invertido que incluye el sistema óptico de corrección a infinito (UIS), que permite no comprometer la ruta de la visión cuando se adicionan accesorios intermedios. Está equipado con lentes ópticas WHN10x y objetivos: Plan-N-x40 , Plan-N-x60, y de inmersión U-Plan-S-Apo-x100, siendo este último el utilizado en la realización de las medidas, con aceite de inmersión tipo DF con índice de refracción 1.515. Las características generales del microscopio pueden observarse en el Figura II-3.



**Figura II-3.** Partes del microscopio invertido *Olympus IX71*.

- **Sistema de excitación;** descrito anteriormente en el apartado II.1.5.1.

- **Unidad óptica principal**, se trata de un conjunto de sub-unidades.

Donde encontramos:

- Segmento de excitación; es por donde entra el haz de luz del láser, procedente del sistema de excitación, a la unidad óptica principal. Se incorpora a través de una fibra óptica por medio de un conector FC/APC y después de reflejarse en espejo, pasa por el obturador de excitación (que puede controlarse bien por software, bien manualmente). Una vez el haz atraviesa el obturador, un 10-20 % de la intensidad se dirige al fotodiodo que mide la intensidad de excitación.
- Unidad confocal básica; una vez atravesado el segmento de excitación, el haz de luz pasa por el dicroico en una geometría de 45° que redirige la luz hacia el microscopio *Olympus IX7*, descrito anteriormente, donde es enfocada a la muestra a través del objetivo. La emisión fluorescente así como la luz de excitación reflejada son recogidas de nuevo por el objetivo y redireccionadas de nuevo al filtro dicroico, optimizado para dejar pasar principalmente la radiación de emisión de fluorescencia. La luz transmitida en el dicroico se dirige hacia una lente acromática que la enfoca en una abertura de 50  $\mu\text{m}$  de diámetro. La distancia entre la lente y la abertura es fácilmente controlable para optimizar el plano confocal. Después de la abertura, el haz es re-colimado por una segunda lente y guiado hacia los detectores, que veremos mas adelante. Por otro lado, la luz de excitación reflejada y redirigida al dicroico es a su vez reflejada por éste hacia el segmento de diagnóstico del plano focal.

- Diagnóstico del plano focal; el diseño óptico del *MicroTime 200* permite un análisis continuo de la luz de excitación, lo que posibilita el control de la posición y la calidad del plano focal y del volumen de excitación en la muestra. La herramienta que permite el diagnóstico es una cámara CCD (GANZ ZC-F10C2, con 500 x 582 pixel (1/3")), la cual permanentemente monitoriza la imagen vista por el objetivo. Las imágenes capturadas se visualizan en el ordenador. La luz de llegada a la cámara puede ser regulada por filtros de distinta densidad óptica.
- Canales de detección; el haz colimado de la emisión fluorescente, llega a los detectores a través de la unidad confocal básica. Un separador de radiación 50/50 en geometría de 45° separa la emisión fluorescente en dos canales de detección equivalentes. Cada canal de detección cuenta con un obturador mecánico y una lente para focalizar la radiación incidente en la sección sensible de los detectores. Los detectores utilizados son diodos de avalancha de fotones individuales (SPAD) SPCM-AQR-14 (*PerkinElmer*). Poseen un rango de longitudes de onda de detección de 400 a 1100 nm, y tienen una alta eficiencia de detección (mas del 70 % a 630 nm).

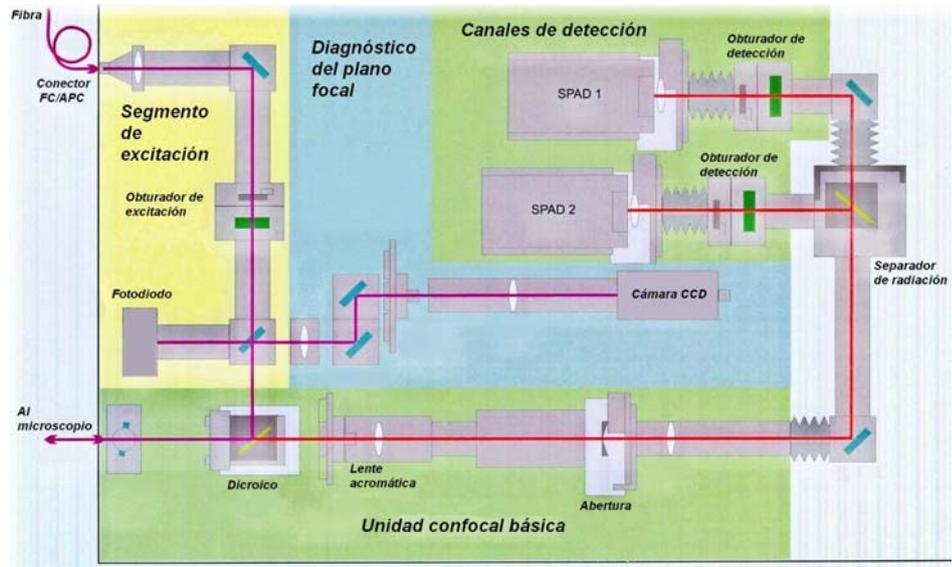


Figura II-4. Esquema de la unidad óptica principal

- **Adquisición de datos y control electrónico;** donde se encuentran dos tarjetas de colección de datos TimeHarp 200 (una para cada canal de detección), que se trata de un sistema TCSPC, que puede operar de varias maneras, siendo la mas importante la llamada *Time-Tagged Time-Resolved* (TTTR), descrita en la sección de Metodología III.2.8

### II.1.7. Espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear.

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

## II.2.- REACTIVOS

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

- Agua bidestilada y desionizada con un aparato MilliPore (Mili-Q, resistividad: 18 M $\Omega$ .cm).
- Dihidrógeno fosfato monosódico (Fluka, purísimo p.a).
- Hidrógeno fosfato disódico (Fluka, purísimo p.a).
- Hidróxido sódico (Aldrich, lentejas).
- Ácido perclórico (Aldrich; disolución acuosa al 70-72 %).
- Cloruro potásico (Panreac).
- Glicerol (Panreac).
- 9-[1-(2-metoxi-5-metilfenil)-6-hidroxi-3-H-xantén-3-ona (**Tokyo Green I**).
- 9-[1-(2-metil-4-metoxifenil)-6-hidroxi-3-H-xantén-3-ona (**Tokyo Green II**).
- HEPES. (Ácido *N*-2-Hidroxiethylpiperacina-*N'*-2'-Etanesulfónico) (Merck)
- Tris(hidroximetil)aminometano. (Prolabo, ultra-puro)
- Tris hidrocloreuro (Fluka, ultra-puro)
- Ácido acético glacial (Panreac; químicamente puro)
- Acetato sódico anhidro (Panreac)

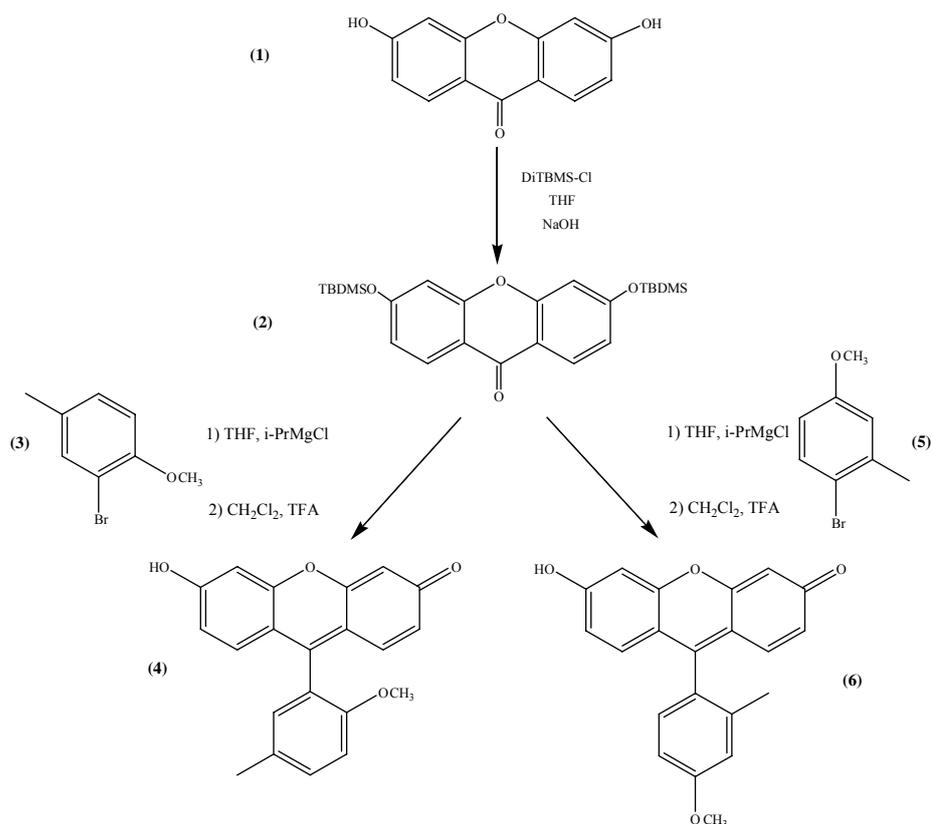
Los productos fluorescentes TG-I y TG-II fueron purificados mediante columna cromatográfica de silicagel. Todos los restantes reactivos se emplearon sin purificación adicional, tras comprobar la ausencia de emisión fluorescente debida a impurezas.

### II.3. METODOLOGÍA

#### II.3.1. Síntesis de los colorantes Tokyo Green I y Tokyo Green II.

Los colorantes fluorescentes 9-[1-(2-metoxi-5-metilfenil)]-6-hidroxi-3-H-xantén-3-ona (**4**) (**Tokyo Green I**) (**TG-I**) y 9-[1-(2-metil-4-metoxifenil)]-6-hidroxi-3-H-xantén-3-ona (**6**) (**Tokyo Green II**) (**TG-II**) se sintetiza a través del siguiente procedimiento general: A partir de xantona (**1**), se prepara el éter de xantona diterbutildimetilsilil (TBDMS) (**2**) acorde a la literatura (*Minta et al., 1989*).

El magnesio (10 equiv.) se seca con Argón. Después de enfriarlo a temperatura ambiente, para la síntesis de TG-I se añade una disolución de 1-bromo-2-metoxi-5-metilbenceno (**3**), mientras que para el TG-II se añade una disolución de 1-bromo-4-,metoxi-2-metilbenceno (**5**). Estas disoluciones adicionadas deben estar preparados en tetrahidrofurano (THF) con isopropilmagnesio (i-PrMgCl). La mezcla se agita a 60 °C hasta convertirse en derivados de fenil-magnesio. La disolución se enfría a 0 °C, y es cuando se añade la disolución de éter de xantona diTBDMS (**2**) en THF recién destilado, agitando la mezcla durante diez minutos. La reacción se detiene añadiendo una disolución acuosa de ácido perclórico 2 N. En cada caso se forman precipitados amarillos (**4**) y (**6**) que fueron recogidos por filtración, lavados con una pequeña cantidad de THF y secados en vacío para producir la mayor cantidad posible de producto puro. Finalmente se realizó una purificación por columna cromatográfica de silica gel. El rendimiento final de la reacción fue del 87 % para el TG-I y del 89% para el TG-II.



**Figura II-5.** Síntesis de los colorantes xanténicos TG-I (4) y TG-II (6).

### II.3.2. Preparación de las disoluciones.

Para la preparación de las disoluciones de tampón fosfato ( $pK_a^B = 6.80$  a 20 °C) se utilizaron  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  y  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . Para ajustar el valor de pH a las disoluciones acuosas (sin tampón) se usaron disoluciones de 0.01 M de NaOH y HClO<sub>4</sub>. Estos productos fueron de calidad de grado espectroscópico. Todas las disoluciones se prepararon con agua bidestilada y desionizada como solvente.

Para las muestras con tampón fosfato empleadas, tanto para medidas de absorción como de fluorescencia, se prepararon concentraciones madres de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  y  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1.2 M, añadiendo luego la cantidad necesaria de cada una en la proporción adecuada para alcanzar la concentración de tampón deseada y el valor de pH requerido, según la ecuación de Henderson-Hasselbalch (ecuación II-1). En los casos en los que fue necesario ajustar el valor de pH a uno más concreto, se realizó añadiendo pequeñas cantidades de NaOH o  $\text{HClO}_4$  diluidos antes de enrasar las muestras hasta su volumen final.

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

#### II.3.3.1. Experimentación con el Tokyo Green-I

Para las disoluciones acuosas de TG-I se preparó una disolución madre inicial de concentración de  $10^{-4}$  M en  $1.27 \times 10^{-3}$  M de NaOH en agua Milli-Q. A partir de esta disolución madre se prepararon las concentraciones requeridas de TG-I en las concentraciones adecuadas de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  y  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ . Se mezclaron volúmenes de estas dos disoluciones en distinta proporción para obtener las muestras a los distintos valores de pH requeridos para los experimentos. Las disoluciones de TG-I para medidas de fluorescencia se prepararon teniendo en cuenta que la absorbancia de las disoluciones finales fuera menor que 0.1.

Para el estudio de la influencia de la fuerza iónica del TG-I sobre el  $pK_a$  se prepararon las disoluciones con fuerzas iónicas comprendidas entre 0.02 y 0.90, con la adición de concentraciones apropiadas de KCl a 0.01 M de tampón fosfato. Para el cálculo del  $pK_a^*$  a través de la metodología de fluorescencia en

estado estacionario se prepararon siete disoluciones en presencia de 1.0 M de tampón fosfato y diferentes valores de pH. Para las medidas en tiempo resuelto se prepararon cinco disoluciones de TG-I en ausencia de tampón, ajustadas a los valores de pH de 4.85, 5.09, 6.00, 6.40 y 9.88. En presencia de tampón fosfato ( $C^B = 0.02, 0.10$  y  $0.25$  M), se prepararon 21 disoluciones comprendidas en el rango de valores de pH de 5.00-9.00. Las curvas de decaimiento se registraron con 20000 cuentas en el máximo para cada longitud de onda de emisión y para cada muestra.

### II.3.3.2. Experimentación con el Tokyo Green-II

Para las disoluciones acuosas de TG-II se preparó una disolución madre de  $10^{-4}$  M en  $1.27 \times 10^{-3}$  M de NaOH en agua Milli-Q como solvente. A partir de esta disolución madre se prepararon las concentraciones requeridas de TG-II en las concentraciones apropiadas de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  y  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ . Finalmente, se mezclaron volúmenes de estas dos disoluciones en distinta proporción para obtener las muestras a los distintos valores de pH requeridos para los experimentos. Igualmente, para las medidas de fluorescencia en tiempo resuelto las disoluciones se prepararon teniendo en cuenta que la absorbancia final a la longitud de onda de excitación fuera menor que 0.1. Para los experimentos de absorbancia a diferente fuerza iónica se prepararon nueve disoluciones a concentraciones de 0.03, 0.05 y 0.1 M de tampón fosfato y la adición de KCl de concentraciones entre 0.0 y 0.8 M. Para el cálculo de los valores del  $\text{pK}_a^{\text{app}}$  a diferentes fuerzas iónicas a través de medidas de fluorescencia en estado estacionario se prepararon nueve disoluciones de concentración 0.01 M de tampón fosfato, con la adición de concentraciones entre 0.00 y 1.20 M de KCl. Para el cálculo del valor del  $\text{pK}_a^*$  a través de la metodología de fluorescencia en estado estacionario, fueron nueve disoluciones las preparadas en presencia de

1.0 M de tampón fosfato y diferentes valores de pH. Para los experimentos de fluorescencia en tiempo resuelto a nivel de conjunto se prepararon doce disoluciones en ausencia de tampón fosfato, comprendidas entre el rango de valores de pH de 4.50 y 10.26. Se prepararon en presencia de tampón fosfato ( $C^B = 0.02, 0.05, 0.10, 0.20, 0.30$  y  $0.40$  M) veinticuatro disoluciones comprendidas entre los valores de pH de 4.50 y 10.50. Las curvas de decaimiento se registraron con 20000 cuentas en el máximo del decaimiento para cada longitud de onda de emisión y para cada muestra. Para los experimentos de fluorescencia en tiempo resuelto a nivel molecular se prepararon nueve disoluciones en presencia de tampón fosfato a concentraciones comprendidas entre 0.00 y 0.30 M y con el mismo valor de pH.

Tanto las disoluciones madre como las de trabajo se prepararon en condiciones de oscuridad. Asimismo, fueron almacenadas en oscuridad y a  $5^\circ\text{C}$  para evitar cualquier posible deterioro ocasionado por la luz o el calor.

#### II.3.4. Procedimientos experimentales.

Todas las medidas, tanto de espectroscopía de absorción como de fluorescencia se han realizado a temperatura ambiente.

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

Las medidas de los valores de pH se realizaron tras la preparación de las mismas.

#### II.3.4.1. Medidas de absorción.

Las medidas de absorción se realizaron en el espectrofotómetro GBC Cintra 10e UV-Visible descrito en el apartado II.1.3 Se empleó una velocidad de barrido de 240 nm/min y una rendija de 1.5 nm. El intervalo de longitudes de onda registrado fue de un máximo de 240-600 nm. Las cubetas utilizadas, tanto para la muestra como para la referencia, fueron de cuarzo, de la casa Hellma, y sus dimensiones (10 × 10 mm) proporcionan un paso óptico de 1 cm. Para la referencia se han utilizado disoluciones con los mismos componentes que la disolución de trabajo, y en iguales concentraciones, excepto en el fluoróforo estudiado.

#### II.3.4.2. Medidas de fluorescencia en estado estacionario.

Las medidas de fluorescencia en estado estacionario se registraron en el fluorímetro Jasco FP-6500 descrito en el punto II.1.4, utilizando una cubeta de cuarzo de la casa Hellma, de dimensiones internas de 10 × 10 mm, que proporcionan un paso óptico de 1 cm. La velocidad de barrido se seleccionó de manera que se consiguiera una buena relación señal:ruido, por lo que no fue necesario un posterior “suavizado” de los espectros. La abertura de las rendijas de excitación y emisión se modificó también según la serie de espectros en el intervalo de 1-3 nm, llegando a un compromiso entre resolución espectral y señal. Los espectros se corrigieron según lo expuesto en la descripción del instrumento.

II.3.4.3. Fluorescencia resuelta en el tiempo a nivel de conjunto.

Las medidas de tiempo resuelto se llevaron a cabo con el instrumento que se describe en el apartado II.1.5. Las cubetas utilizadas fueron de cuarzo, de la casa Hellma, de dimensiones  $10 \times 10$  mm. Los decaimientos de fluorescencia se recogieron en histogramas a lo largo de 1036 canales. El valor de tiempo por canal empleado fue de 36.7 ps / canal, abarcando una escala temporal de 38 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). Los histogramas se recogieron hasta conseguir 20000 cuentas en el máximo. El iris del instrumento se ajustó para no detectar mas del 0.5 % de la frecuencia utilizada (20 MHz).

La longitud de onda de excitación utilizada fue de 488 nm, con la que se excita preferentemente la especie aniónica del TG-I y del TG-II. Los decaimientos se recogieron a las longitudes de onda de emisión de 500, 515 y 535 nm.

Para obtener la función de respuesta del instrumento (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 a la longitud de onda de excitación. 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.3.4.4. Medidas de fluorescencia a nivel molecular.

Las medidas llevadas a cabo a nivel molecular se realizaron en el instrumento descrito en el apartado II.1.6. Los decaimientos de fluorescencia a nivel molecular se analizaron a través del programa informático *SymPhoTime* (*PicoQuant, Inc.*) aplicando el Método de Estimación de Máxima Verosimilitud (MLE) descrito en la sección I.5.5, el cual obtiene los parámetros correctos a partir de los decaimientos con número de cuentas bajas (*Maus et al., 2001; Edel et al., 2007*). Puesto que el decaimiento de fluorescencia es más largo que la resolución temporal del sistema, se trataron los datos obtenidos usando el análisis con ventana temporal, que elimina el ruido ocasionado por la señal instrumental (*Krämer et al., 2006*).

Los decaimientos se recogieron a lo largo de 1666 canales. El valor del tiempo por canal empleado fue de 29.06 ps/canal, abarcando una escala temporal de 48.4 ns. Para la medición de la muestra se utilizó un volumen de 0.1 mL, que es lo suficientemente grande como para asegurar la renovación de las moléculas, en caso de que éstas sufrieran blanqueamiento debido a la intensidad del láser. Con estas condiciones se recogieron todos los datos de las muestras. La duración de las medidas varió de 10 minutos hasta 1 hora, para obtener la mejor relación señal:ruido. La frecuencia utilizada en estas medidas fue de 20 MHz.

#### II.3.4.5. Espectroscopia de RMN.

Se han obtenido los espectros de RMN a temperatura ambiente en el instrumento de 300 MHz de campo magnético descrito anteriormente en el apartado I.3.7, empleando como disolventes dimetilsulfóxido (DMSO) y metanol deuterados. La referencia para la definición de escalas de desplazamientos químicos fue el tetrametilsilano.

- Los datos consultados en bibliografía (Urano *et al.*, 2005) para el espectro de RMN del TG-I fueron:
  - RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  2.40 (s, 3H), 3.70 (s, 3H), 7.17 (d, 1H,  $J = 1.8 \text{ Hz}$ ), 7.24 (dd, 2H,  $J = 2.2, 9.2 \text{ Hz}$ ), 7.25 (d, 1H,  $J = 8.6 \text{ Hz}$ ), 7.35 (d, 2H,  $J = 2.2 \text{ Hz}$ ), 7.54 (dd, 1H,  $J = 2.2, 8.6 \text{ Hz}$ ), 7.72 (d, 2H,  $J = 9.2 \text{ Hz}$ ).
  - RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  20.39, 56.36, 103.29, 113.07, 118.36, 121.03, 121.23, 131.86, 132.07, 134.57, 135.05, 155.93, 161.11, 166.65, 172.77.
  - Espectroscopía de masas ( $\text{EI}^+$ ):  $m/z$  calculado para  $(\text{M} + \text{H})^+$ : 333.11268; encontrado: 333.10945.
- Los datos consultados en bibliografía (Urano *et al.*, 2005) para el espectro de RMN del TG-II fueron:
  - RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  2.03 (s, 3H), 3.93 (s, 3H), 7.06 (dd, 1H,  $J = 2.2, 8.4 \text{ Hz}$ ), 7.11 (d, 1H,  $J = 2.0 \text{ Hz}$ ), 7.21 (dd, 2H,  $J = 2.2, 9.9 \text{ Hz}$ ), 7.24 (d, 1H,  $J = 7.5 \text{ Hz}$ ), 7.32 (d, 2H,  $J = 2.2 \text{ Hz}$ ), 7.61 (d, 2H,  $J = 9.3 \text{ Hz}$ ).
  - RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  20.16, 56.02, 103.56, 112.97, 117.38, 118.49, 121.49, 121.54, 124.60, 131.90, 134.61, 139.24, 161.07, 163.19, 167.58, 173.20.
  - Espectrometría de masas ( $\text{EI}^+$ ):  $m/z$  calculado para  $(\text{M} + \text{H})^+$ : 333.11268; encontrado: 333.10856.

Los resultados de los espectros RMN de los productos obtenidos en las síntesis anteriormente descritas fueron concordantes con la bibliografía

consultada. Las figuras II-6 y II-7 corresponden, respectivamente, a los espectros de RMN del TG-I y del TG-II.

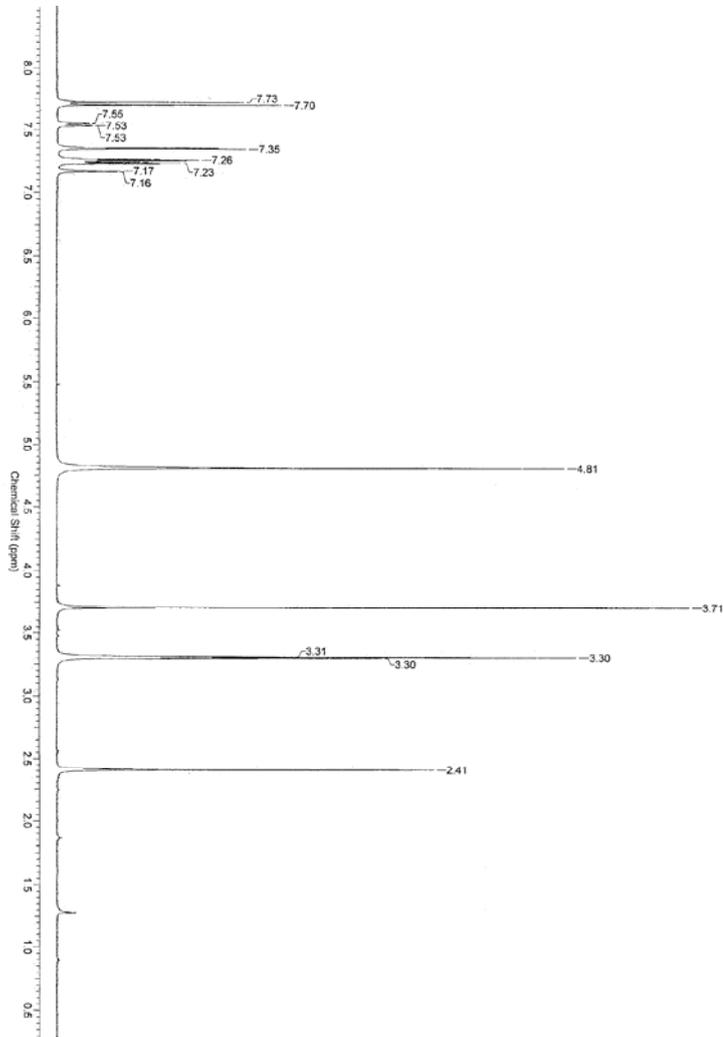


Figura II-6. Espectro de RMN del colorante TG-I

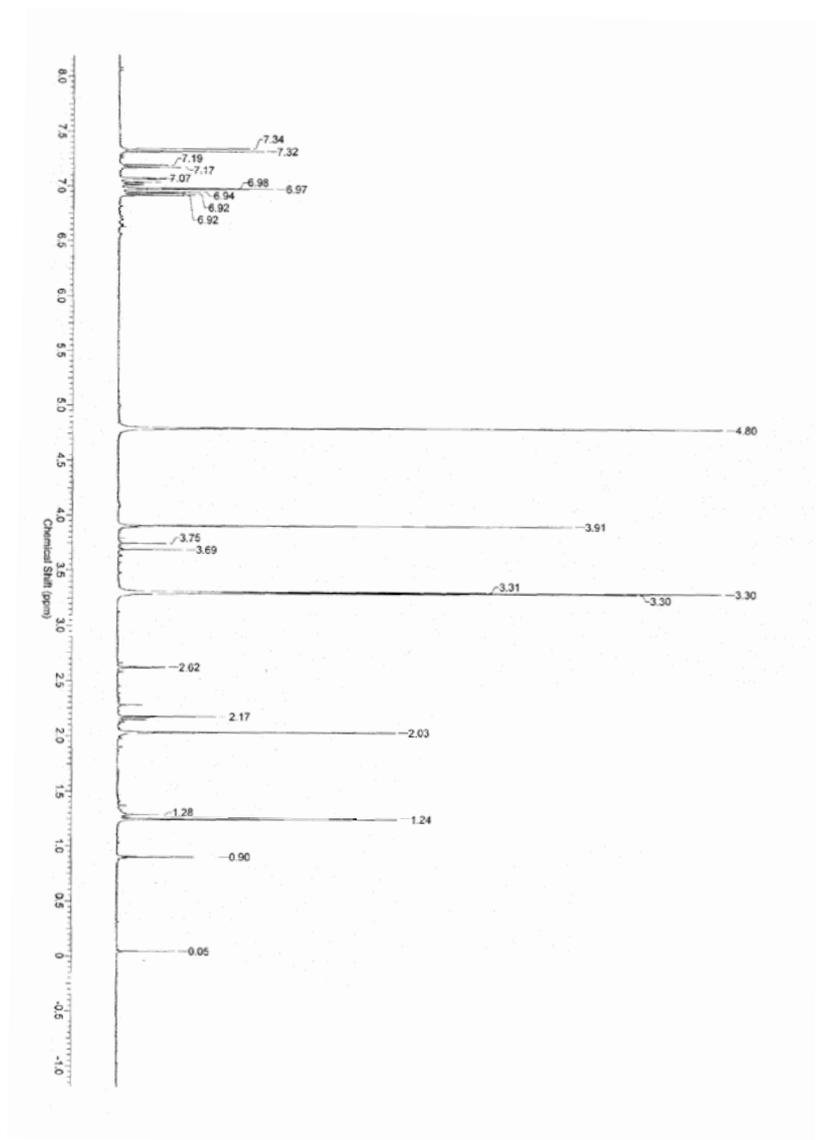


Figura II-7. Espectro de RMN del TG-II

### II.3.5. Tratamiento de los datos y métodos de análisis.

Tanto el tratamiento, representación, así como los análisis no lineales por mínimos cuadrados, se realizaron con el programa informático *Origin 7.0 Professional*.

El análisis de reconvolución y ajustes multiexponenciales individuales y globales se realizaron con el programa informático *FluoFit (PicoQuant Inc.)*. Finalmente, los análisis compartimentales se calcularon con el *software* de análisis global *TRFA (Ameloot et al., 1992)*. Este programa 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,  $I(t)$  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  $D(t')$  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)*.

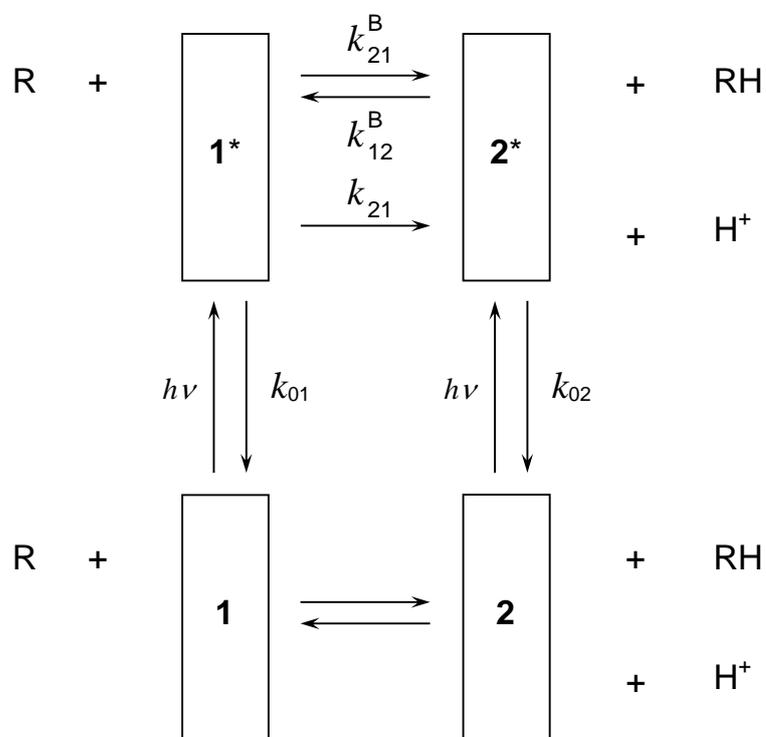
El análisis de la fluorescencia recogida a nivel molecular se realizó con el programa informático *MicroTime 200 (PicoQuant Inc.)*, usando la metodología *Time-Tagged Time Resolved (TTTR)*, la cual permite obtener trazas de decaimiento fluorescente en el volumen confocal.

### II.3.6. Modelo compartimental.

Nos encontramos con un sistema bicompartimental de la reacción de transferencia protónica en el estado excitado favorecida por las especies de un

aceptor/dador protónico. A continuación se describirán las generalidades y teoría de dicho sistema.

La introducción de un aceptor/dador protónico en el esquema cinético general de una reacción de transferencia protónica en el estado excitado supone transformaciones de considerable importancia en las ecuaciones generales. El empleo de este modelo compartimental es muy reciente, aplicándose por primera vez al sistema fluoresceína/ácido N-acetilaspártico (Crovetto *et al.*, 2004), y posteriormente al sistema Oregon Green 488/ácido acético (Orte *et al.*, 2005a,c). El sistema cinético general considerado es el que se muestra a continuación:



**Esquema II-1.** Sistema compartimental para una reacción ESPT en dos estados promovida por las especies de un aceptor/dador de protones.

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  $I^*$  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  $I^* \rightarrow 2^* + H^+$ , mientras que  $k_{12}$  es la constante de segundo orden para la asociación  $2^* + H^+ \rightarrow I^*$ .  $k_{21}^B$  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  $I^* + R \rightarrow 2^* + RH$  y  $k_{12}^B$  es la constante de segundo orden para la reacción inversa  $2^* + RH \rightarrow I^* + R$ . Todas estas constantes  $k_{ij}$  son positivas. Las formas ácida y básica del aceptor/dador protónico se representan por  $RH$  y  $R$  respectivamente. Además, tal y como se muestra el esquema II-1, las especies  $R$  y  $RH$  no afectan el equilibrio del estado fundamental de las formas del fluoróforo  $I$  y  $2$ .

Si el sistema se excita por 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  $I^*$  y  $2^*$  viene expresada por la ecuación diferencial de primer orden:

$$\dot{x}(t) = Ax(t) \quad \text{con } t \geq 0 \quad (\text{II-3})$$

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

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

La derivada temporal del vector de las concentraciones en el estado excitado es  $\dot{x}(t)$ . Por su parte, A es la matriz compartimental 2x2:

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

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  $t \geq 0$ ):

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

En esta expresión  $U = [U_1, U_2]$  es la matriz de los dos vectores propios  $U_i$  de la matriz compartimental A.  $\gamma_1$  y  $\gamma_2$  son los autovalores de A correspondientes a los autovectores  $U_1$  y  $U_2$  respectivamente, de forma que:

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

$\tilde{b}$  es el vector 2 x 1 con los elementos  $\tilde{b}_i = \frac{b_i}{\sum_i b_i}$ , donde  $b_i$  es la

concentración de la especie  $i^*$  a tiempo cero ( $b_i = x_i(0)$ ). Este vector  $\tilde{b}$  depende, por lo tanto, de las características de absorción de las diferentes especies en el estado fundamental, así como de las concentraciones iniciales de cada especie, y con el valor de 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 III-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,  $\tilde{c}$  es el vector  $1 \times 2$  de elementos  $\tilde{c}_i(\lambda^{em}) = \frac{c_i}{\sum_i c_i}$  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 dado por (Ameloot *et al.*, 1991):

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

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

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

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

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  $A$  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  $A$  (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 valor de 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  $\tilde{c}_i$ :

$$p_i = \kappa(\tilde{c}_1\beta_{11} + \tilde{c}_2\beta_{21}) \quad p_i = \kappa(\tilde{c}_1\beta_{12} + \tilde{c}_2\beta_{22}) \quad (\text{II-15})$$

siendo:

$$\beta_{11} = \frac{[\tilde{b}_1(a_{11} + \gamma_2) - \tilde{b}_2a_{12}]}{(\gamma_2 - \gamma_1)}$$

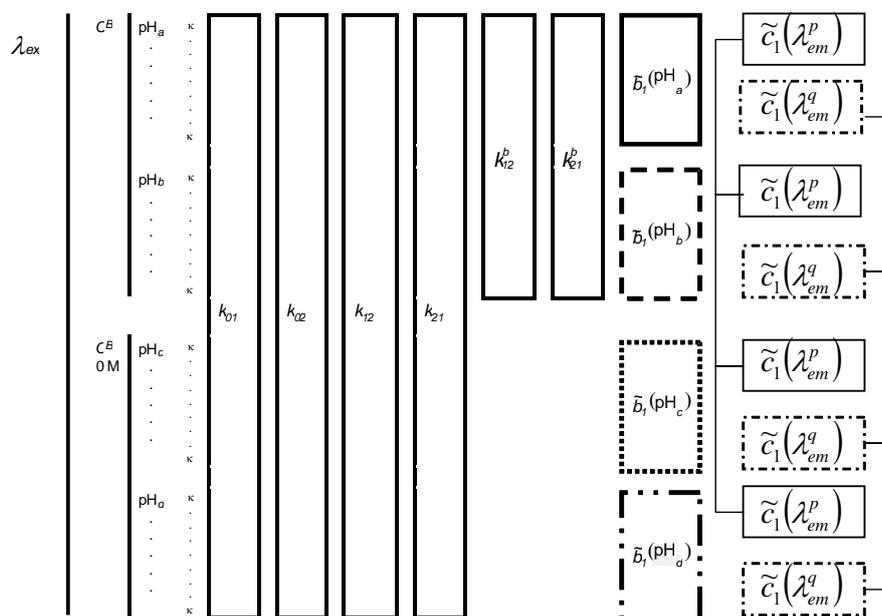
$$\beta_{12} = \frac{-[\tilde{b}_1(a_{11} + \gamma_1) - \tilde{b}_2a_{12}]}{(\gamma_2 - \gamma_1)}$$

$$\beta_{21} = \frac{[\tilde{b}_2(a_{22} + \gamma_2) - \tilde{b}_1a_{21}]}{(\gamma_2 - \gamma_1)} \quad (\text{II-16})$$

$$\beta_{22} = \frac{-[\tilde{b}_2(a_{22} + \gamma_1) - \tilde{b}_1a_{21}]}{(\gamma_2 - \gamma_1)}$$

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 valor de pH, la concentración total de aceptor/dador protónico  $C^{buff}$  y su constante de acidez  $K_a^{buff}$  que rige el equilibrio  $RH \rightleftharpoons R$ . Como ya se citó anteriormente en la Introducción, el análisis global compartimental es un análisis de 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  $\tilde{c}_i$  normalizados permite aprovechar las relaciones entre decaimientos a la misma longitud de onda de excitación y valor

de 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  $I^*$ ,  $\tilde{b}_1$ , a cada valor de pH y longitud de onda de excitación, y el parámetro de emisión normalizado de la especie  $I^*$ ,  $\tilde{c}_1(\lambda^{em})$ . Así, en el esquema II-2 se muestra la organización del ligado de los diferentes parámetros a lo largo de la superficie de decaimientos de fluorescencia completa.



**Esquema II-2.** Esquema de ligado de parámetros ajustables en un análisis global compartimental de ESPT.

Finalmente, es también interesante especificar que la relación entre los valores del  $pK_a^*$  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.

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

Igualmente, las constantes cinéticas de las reacciones mediadas por las especies del aceptor/dador de protones se relaciona con el valor del  $pK_a^*$  y del  $pK_a^{\text{buff}}$  del aceptor/dador protónico a través de la ley de acción de masas, resultando la ecuación II-18.

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

II.3.7. Time-Tagged Time-Resolved (TTTR).

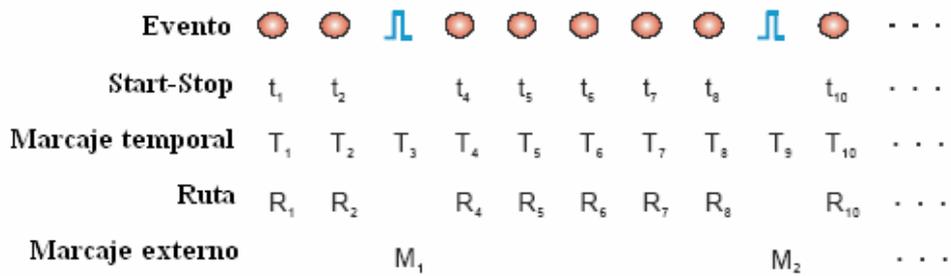
La metodología *Time-Tagged Time-Resolved* (TTTR por sus siglas en inglés) se realiza en el análisis de moléculas individuales, con la instrumentación descrita en la sección II.1.6.

Este método permite el registro de los tiempos de llegada a los detectores de fotones individuales. Por un lado, se determinan los tiempos START-STOP de cada fotón con resolución de picosegundos, es decir, el tiempo transcurrido entre el pulso excitatriz (START) y la llegada del fotón (señal STOP), al igual que se realiza en fluorescencia con resolución temporal en modo TCSPC. Por otro lado, la llegada de los fotones se registra en un reloj independiente que mide el tiempo total de cada experimento, etiquetando cada fotón a su tiempo global de llegada al detector. Ésto permite identificar fotones que provienen de la misma molécula, y discriminar destellos de fluorescencia, una característica de los experimentos de fluorescencia de moléculas individuales. Por tanto, las aplicaciones más destacadas son: la detección de moléculas individuales en difusión, la espectroscopía de correlación de fluorescencia (FCS) o la obtención por integración de tiempos de vida de fluorescencia de los destellos de moléculas individuales.

En el modo TTTR no se realizan histogramas, en vez de eso, el tiempo START-STOP de cada evento se registra siempre con una etiqueta temporal de un reloj independiente, asignado en el momento de llegada del fotón de STOP. Como resultado, las grabaciones realizadas en modo TTTR ocupan 12 bits para el tiempo START-STOP y 16 bits para la etiqueta temporal. Estos 16 bits con el reloj a 100 ns cubrirá un rango máximo de 6.5536 ms. Hay que remarcar que no es posible combinar el tiempo de START-STOP de picosegundos y el marcaje temporal en una misma figura, ya que los dos tiempos no están sincronizados. El objetivo de estos dos tiempos es, más bien, para examinar los procesos

físicos con dos escalas y referencias temporales muy diferentes. No obstante, los sofisticados métodos de análisis usan ambos tiempos para extraer la máxima información posible de dichos procesos físicos, por ejemplo, la difusión de las moléculas individuales en una medida.

A menudo, es deseable sincronizar las medidas TCSPC con otra información o con otros registros. Con el fin de realizar por ejemplo, imágenes de tiempos de fluorescencia, es necesario grabar también la ubicación espacial de los fotones. Para lograrlo es entonces necesario un mecanismo que asigne la información de sincronización externa a los datos TCSPC recogidos independientemente. Para resolver este problema, el conjunto de datos generados por el *TimeHarp 200* puede contener marcadores para la información de sincronización derivada de las imágenes captadas. La figura II-8 muestra como la señal de marcaje externo se graba en la sucesión de datos.



**Figura II-8.** Secuencia de la grabación de los datos por el modo TTTR.

En la figura II-8; los círculos representan a los fotones y los pulsos azules un marcador de la señal, que puede ser el pulso excitatriz. Los marcadores externos son tratados casi como si fueran fotones. Una señal especial permite distinguir a los fotones reales de las marcas. El software filtra

los marcadores haciendo posible la reconstrucción de la imagen en 2D de la secuencia de grabación. La información generada de esta manera está libre de redundancia, por lo que puede ser transferida en tiempo real.

#### II.3.8. Espectroscopía de correlación de fluorescencia. (FCS)

La espectroscopía de correlación de fluorescencia (FCS) es una técnica experimental desarrollada para estudiar los procesos cinéticos a través del análisis estadístico de las fluctuaciones de fluorescencia en equilibrio de un sistema. Esta técnica está descrita en el apartado I.6.1.

La FCS se lleva a cabo con moléculas fluorescentes difundiendo libremente en disolución que cruzan un láser focalizado en un pequeño volumen de excitación. La instrumentación utilizada se describe en el apartado II.1.6. La fluorescencia emitida es seleccionada con un filtro dicróico y se enfoca mediante el objetivo del microscopio en un punto de tamaño muy pequeño, donde se sitúa una barrera con un pequeño orificio confocal que solo deja pasar la señal que proviene del volumen de muestra deseado. En los experimentos realizados en esta Memoria, se contemplan únicamente tres procesos en las funciones de correlación calculadas: la difusión del fluoróforo libre en el volumen de medida, el parpadeo debido al paso del estado singlete al estado triplete y el parpadeo debido al intercambio protónico y a la presencia de la especie neutra en el equilibrio químico  $N \rightleftharpoons A$  del TG-II.

II.3.8.1. Difusión.

La aplicación más común de la FCS es medir la difusión en el movimiento de translación de moléculas individuales. Para especies que simplemente difunden, las fluctuaciones de la fluorescencia al atravesar el volumen de excitación son causadas por la difusión de las moléculas a través de este volumen.

Para encontrar la función de autocorrelación para especies que difunden libremente en el volumen de medida, sustituimos la ecuación (I-48) en la (I-49) descritas en la sección I.6.1 obteniendo:

$$G(\tau) = \frac{\int \int W(r) W(r') \langle \delta(\eta \cdot C(r, t)) \delta(\eta \cdot C(r', t + \tau)) \rangle dV dV'}{(\int W(r) \langle \delta(\eta \cdot C(r, t)) \rangle dV)^2} \quad (\text{II-19})$$

Es entonces cuando se puede separar los términos de las fluctuaciones.

$$\delta(\eta \cdot C(r, t)) = C \delta\eta + \eta \delta C \quad (\text{II-20})$$

Obviamente, la ecuación II-20 puede simplificarse en gran medida si la concentración o el parámetro  $\eta$  son constantes para un sistema dado. Asumiendo primero que las propiedades fluorescentes del colorante no cambian dentro del tiempo de observación  $\delta\eta = 0$ , la ecuación II-20 puede reescribirse como:

$$G(\tau) = \frac{\int \int W(r) W(r') \langle \delta C(r, 0) \delta C(r', \tau) \rangle dV dV'}{(\langle C \rangle \int W(r) dV)^2} \quad (\text{II-21})$$

Considerando solo las partículas que difunden libremente en el volumen de detección con un coeficiente de difusión  $D$ , el término  $\langle \delta C(r,0) \delta C(r',\tau) \rangle$  puede calcularse como:

$$\langle \delta C(r,0) \delta C(r',\tau) \rangle = \langle C \rangle \frac{1}{(4\pi D\tau)^{\frac{3}{2}}} \cdot e^{-\frac{(r-r')^2}{4D\tau}} \quad (\text{II-22})$$

Sustituyendo:

$$G(\tau) = \frac{\iint W(r)W(r') \langle C \rangle \frac{1}{(4\pi D\tau)^{\frac{3}{2}}} \cdot e^{-\frac{(r-r')^2}{4D\tau}} dVdV'}{(\langle C \rangle \int W(r)dV)^2} \quad (\text{II-23})$$

$$G(\tau) = \frac{1}{\langle C \rangle (4\pi D\tau)^{\frac{3}{2}}} \frac{\iint W(r)W(r') \langle C \rangle \cdot e^{-\frac{(r-r')^2}{4D\tau}} dVdV'}{(\int W(r)dV)^2} \quad (\text{II-24})$$

Ahora, consideramos la relación entre el tiempo de difusión lateral que está una molécula en el volumen de detección, y el coeficiente de difusión  $D$ , que es independiente de la condición particular usada:

$$\tau_D = \frac{r_0^2}{4D} \quad (\text{II-25})$$

La definición del volumen efectivo viene dado por:

$$V_{eff} = \frac{(\int W(r) dV)^2}{\int W^2(r) dV} \stackrel{\text{Ecuación II-24}}{=} \frac{\left( \int e^{-\frac{2x^2+y^2}{r_0^2}} \cdot e^{-\frac{2z^2}{z_0^2}} dV \right)^2}{\int e^{-\frac{4x^2+y^2}{r_0^2}} \cdot e^{-\frac{4z^2}{z_0^2}} dV} \stackrel{\text{Integración en el espacio}}{=} \pi^{\frac{3}{2}} \cdot r_0^2 \cdot z_0 \quad \text{(II-26)}$$

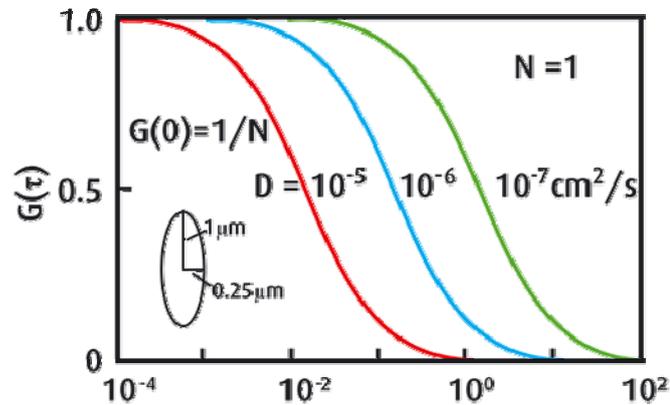
Finalmente, uno puede calcular la función de autocorrelación para la difusión libre de las moléculas:

$$G_D(\tau) = \frac{I}{\langle N \rangle} \left( I + \frac{\tau}{\tau_D} \right)^{-1} \left( I + \frac{\tau}{\tau_D \omega^2} \right)^{-1/2} \quad \text{(II-27)}$$

en donde  $\tau$  es el tiempo de autocorrelación o de retardo,  $\omega = u/s$  es la razón entre el radio focal efectivo a lo largo del eje óptico,  $u$ , y el radio focal lateral,  $s$ , ambos a intensidad  $1/e^2$ .  $[\langle N \rangle]^{-1} = G(0)$  es la función de correlación al tiempo cero, donde  $\langle N \rangle$  es el número medio de moléculas coexistiendo en el volumen de excitación, y  $\tau_D$  representa el tiempo de difusión, que se relaciona con el coeficiente de difusión  $D$  por medio de:  $\tau_D = s^2/4D$

Como ejemplo de un proceso de difusión libre, en la figura II-9 se muestra la función de correlación esperada para una sola especie difusora, con coeficientes de difusión entre  $10^{-5}$  y  $10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ . Como ya se ha indicado, la función de correlación se representa sobre un eje logarítmico de  $\tau$ . Conforme el coeficiente de difusión decrece, la función de correlación se desplaza hacia mayores valores de  $\tau$ , lo que refleja unas fluctuaciones de intensidad más lentas, ya que el fluoróforo difunde más lentamente a través del volumen de observación. Un cambio de dos órdenes de magnitud en el coeficiente de

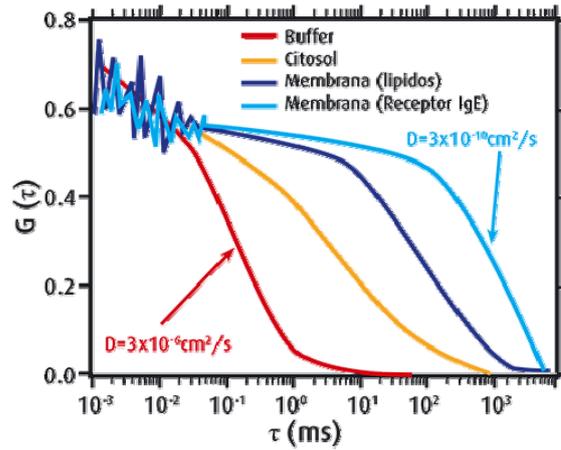
difusión requiere un cambio de 10,000 en la masa molar, por lo que las curvas de la figura II-9 están más desplazadas que en un experimento típico de FCS.



**Figura II-9.** Funciones de autocorrelación simuladas para difusión tridimensional con coeficientes de difusión de  $10^{-5}$  a  $10^{-7}$   $\text{cm}^2/\text{s}$ . El volumen observado se consideró como una elipsoide con  $s = 0.25 \mu\text{m}$  y  $u = 1 \mu\text{m}$

El coeficiente de difusión  $D$  es una propiedad molecular con un valor definido e independiente de cualquier parámetro experimental. Sin embargo  $\tau_D$  depende del radio del volumen de observación. Por esta razón, los instrumentos de FCS se suelen calibrar con fluoróforos de coeficientes de difusión conocidos.

Aunque la difusión del colorante en volúmenes tridimensionales ha sido la única aplicación de la FCS en esta Memoria, también se puede utilizar en estudios de membrana, en donde la difusión está limitada a dos dimensiones. Además, la naturaleza viscosa de las membranas proporciona un amplio intervalo de tiempos de difusión, lo que facilita la interpretación del experimento, tal como se muestra en la figura II-10.



**Figura II-10.** Funciones de autocorrelación medidas en diferentes ambientes moleculares; en tampón, citosol celular, en un lípido de membrana y en una proteína difundiendo en una membrana.

Además, también puede haber reacciones que influyan en la movilidad de la partícula de alguna manera. En este caso, la ecuación II-24 debe generalizarse, para tener en cuenta todas las posibilidades de movimiento:

$$G_{\text{movimiento}}(\tau) = \frac{1}{V_{\text{ef}}} \frac{\sum_i \eta_i \langle C_i \rangle M_i(\tau)}{\left( \sum_i \eta_i \langle C_i \rangle \right)^2} \quad (\text{II-28})$$

El término de movilidad  $M_i(\tau)$ , debe adaptarse al caso particular estudiado. Además de la difusión libre tridimensional discutida anteriormente, existen otras posibilidades numerosas tales como:

- Difusión tridimensional libre:

$$M_i(\tau) = \frac{I}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_{d,i}}\right) \cdot \sqrt{1 + \left(\frac{r_0}{z_0}\right)^2 \cdot \frac{\tau}{\tau_{d,i}}}} \quad (\text{II-29})$$

- Difusión libre bidimensional (en membranas):

$$M_i(\tau) = \frac{I}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_{D,i}}\right)} \quad (\text{II-30})$$

- Transporte activo con velocidad  $v_i$ :

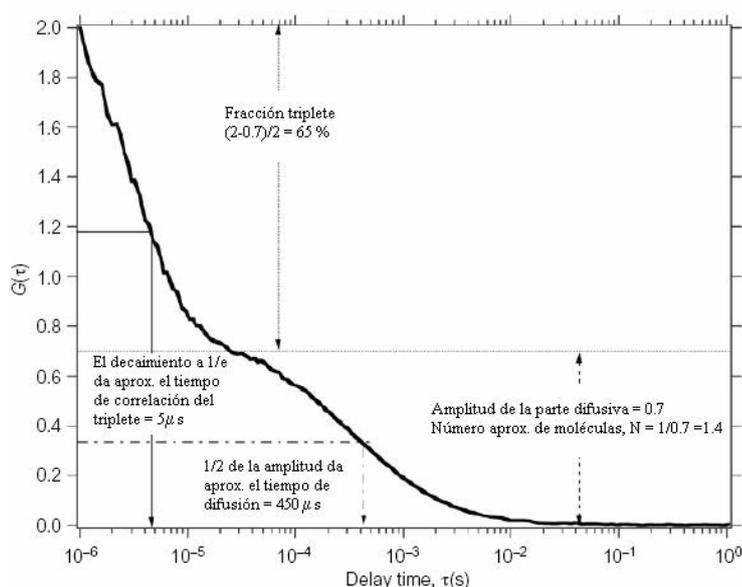
$$M_i(\tau) = e^{-\left(\frac{\tau \cdot v_i}{r_0}\right)^2} \quad (\text{II-31})$$

En algunas situaciones, como en el interior de membranas o en células vivas, el concepto ideal de difusión Browniana no se aplica, debido a que el movimiento de las partículas está restringido debido a grandes cambios locales (Schwille *et al.*, 1999; Wachsmuth *et al.*, 2000). Estas desviaciones suelen ser debidas a los confinamientos de las partículas en compartimentos celulares o en lípidos de las membranas.

### II.3.8.2. Cruce entre sistemas.

Hasta ahora se ha supuesto que las propiedades fluorescentes del fluoróforo no cambian mientras atraviesa el volumen de observación ( $\delta\mu = 0$ ). Sin embargo, esta suposición no siempre se cumple en los colorantes reales a las intensidades de excitación usadas en FCS. La causa más común por la que la

intensidad de fluorescencia puede fluctuar es la transición del colorante desde el estado singlete excitado,  $S_1$ , al estado triplete. Como la relajación desde el estado triplete hasta el estado fundamental es una transición prohibida, el cromóforo necesita un tiempo más largo que el de decaimiento desde  $S_1$  para alcanzar el estado fundamental, por lo que durante ese intervalo de tiempo el fluoróforo no puede emitir fotones. Así, se puede imaginar el cruce entre sistemas como una serie de intervalos oscuros interrumpiendo la, de otra forma, continua emisión de fluorescencia de la molécula en su paso a través del volumen de medida.



**Figura II-11.** Función de autocorrelación de una molécula fluorescente que sufre cruce entre sistemas. La función muestra dos componentes: una parte difusiva en escalas de tiempo del orden de ms, y una parte a tiempos de retardo más cortos, debida a un fuerte cruce entre sistemas. El tiempo de vida del decaimiento del estado triplete, da una idea de la velocidad cruce entre sistemas y su amplitud proporciona la probabilidad o facilidad del cruce entre sistemas. La amplitud de la parte difusiva, provee el número de moléculas estimado observados en cualquier momento, mientras que la mitad del máximo de la amplitud de la parte difusiva proporciona el tiempo de difusión a través del volumen de observación.

El parpadeo debido al triplete se puede generalizar a cualquier fenómeno fotofísico rápido que proporcione como resultado transiciones reversibles entre un estado brillante (fluorescente) y otro oscuro desde el que no se emiten fotones. Así, las fluctuaciones de fluorescencia pueden atribuirse a reacciones químicas entre dos especies con distintas propiedades fluorescentes, como en nuestro caso, el equilibrio químico de las especies del TG-II  $N \rightleftharpoons A$ . Estos procesos ocasionan las fluctuaciones de fluorescencia a escalas temporales más rápidas que aquellas ocasionadas por el mero movimiento de sus partículas, ello nos posibilita el separar los distintos procesos dinámicos:

$$G_{total}(\tau) = G_{movimiento}(\tau) \cdot X_{cinéticos}(\tau) \quad (II-32)$$

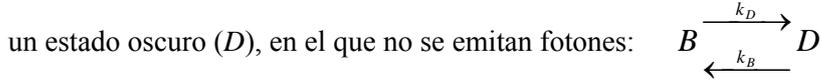
Esta hipótesis, se mantiene solamente en las situaciones en las que el coeficiente de difusión se mantiene inalterable en la reacción (*Palmer y Thompson, 1987; Widengren y Rigler, 1998*). El oscurecimiento ocasionado por el estado triplete, puede describirse como un decaimiento simple exponencial:

$$X_{triplete}(\tau) = I - Y + Y \cdot e^{-\frac{\tau}{\tau_{triplete}}} \quad (II-33)$$

este decaimiento se muestra en las curvas de las medidas a escalas temporales muy cortas. Es posible también normalizar esta expresión dividiendo por:  $(I - Y)$  (*Widengren et al., 1995; Schwille et al., 2000*). Incorporando las ecuaciones II-29 y II-33 en la ecuación II-32, la función total de autocorrelación para la difusión libre de un colorante puede escribirse como:

$$\begin{aligned} G_{total}(\tau) &= X_{cinéticos}(\tau) \cdot G_{movimiento}(\tau) \\ &= (I - Y + Y \cdot e^{-\frac{\tau}{\tau_{triplete}}}) \cdot \frac{I}{V_{ef} \langle C \rangle} \cdot \frac{I}{(I + \frac{\tau}{\tau_D})} \cdot \frac{I}{\sqrt{I + (\frac{r_0}{z_0})^2 \cdot \frac{\tau}{\tau_D}}} \end{aligned} \quad (II-34)$$

Como hemos mencionado anteriormente, las fluctuaciones debidas al estado triplete pueden generalizarse para cualquier fenómeno fotofísico que ocasione en transiciones reversibles entre un estado fluorescente (estado Brillante,  $B$ ) y un estado oscuro ( $D$ ), en el que no se emitan fotones:



Análogamente al caso anterior, podemos escribir:

$$X_{\text{parpadeo}}(\tau) = I - F + F \cdot e^{-\frac{\tau}{\tau_F}} \quad (\text{II-35})$$

con  $\tau_F = \frac{I}{k_D + k_B}$  como el tiempo de relajación, y  $F = \frac{k_D}{k_D + k_B}$ , como promedio de la fracción de moléculas en el estado oscuro, que representa el promedio de tiempo que una molécula pasa en dicho estado. Si el estado oscuro no lo fuera totalmente, se deben tener en cuenta los dos rendimientos cuánticos  $\eta_i$  de los dos estados para corregir la expresión de  $F$ :

$$F = \frac{k_D k_B (\eta_B - \eta_D)^2}{(k_D + k_B)(k_B \eta_B^2 + k_D \eta_D^2)}$$

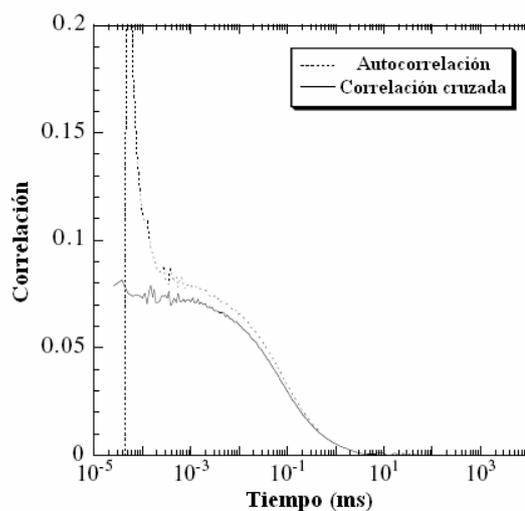
Si sucede otra transición adicional a la función de autocorrelación, se le añade de forma multiplicativa otro término similar a la ecuación II-33, de forma que, si tienen lugar  $n$  transiciones independientes rápidas entre dos estados distintos, la función de autocorrelación para la difusión combinada con las transiciones entre un estado fluorescente y los estados oscuros es de la forma:

$$G(\tau) = G_D(\tau) \prod_{i=1}^{i=n} \frac{I}{I - f_i} \left( I - f_i + f_i e^{-\tau/\tau_i} \right) \quad (\text{II-36})$$

en donde  $f_i$  es la fracción de moléculas en el estado oscuro debido al mecanismo  $i$  y  $\tau_i$  es la constante de tiempo característica para la fotoconversión entre el estado fluorescente y el estado oscuro mediante el mecanismo  $i$ . La constante  $\tau_i$  de la transición es la inversa de la suma de las constantes de velocidad para las reacciones directa e inversa de esa transición  $i$ . Naturalmente un número excesivo de transiciones temporalmente próximas impide resolver con exactitud todos los términos de la ecuación II-36.

#### II.3.8.3. Correlación cruzada.

La realización de un análisis de autocorrelación compara de manera efectiva la señal medida consigo misma un tiempo mas tarde, y busca patrones recurrentes. El análisis de correlación cruzada es un método sencillo que permite mirar las características comunes de dos medidas independientes. Si la señal fluorescente se separa en dos canales independientes utilizando un filtro separador, la señal recibida en uno de los detectores puede correlacionarse con la del segundo detector. Ésto no sólo elimina los artefactos introducidos por el detector (por ejemplo los llamados *afterpulsing* de un APD o las fluctuaciones de intensidad de la fuente de iluminación), sino que también proporciona una mayor especificidad de detección.

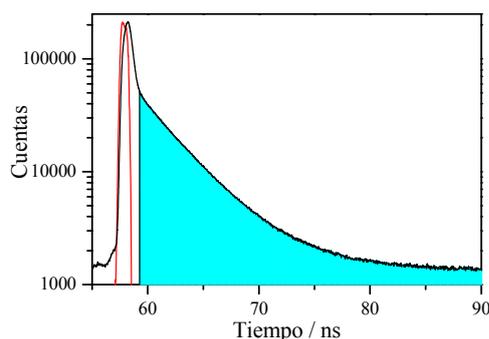


**Figura II-12.** Comparación de la autocorrelación en un único detector y correlación cruzada empleando dos detectores de moléculas de rodamina 6G difundiéndose libremente. Es de destacar el pico producido a 100 ns en la función de autocorrelación se debe al *afterpulsing* del detector.

Además de las ventajas mencionadas con anterioridad, existen diferentes variaciones y aplicaciones de la correlación cruzada que son dignas de mención por ser especialmente efectivas, aunque no se empleen en esta Memoria: la primera es la correlación cruzada espacial, que consiste en correlacionar las señales de fluorescencia medidas entre dos volúmenes separados. La segunda es el modo de color-dual, en la que dos colorantes distintos son medidos en el mismo volumen usando dos tipos de láser sobre ellos, separando luego la emisión de cada fluoróforo.

### II.3.9. Análisis de funciones de autocorrelación con ventana temporal.

Cuando se utilizan fuentes de luz pulsátil para la excitación de fluoróforos en espectroscopía a nivel molecular, el ruido de fondo originado por la luz de excitación dispersa presenta una aparición temporal característica. Este ruido sigue un patrón temporal relacionado con el pulso de excitación, pero también es afectado por otros motivos como: la incertidumbre temporal de los detectores y de los tiempos electrónicos. Es útil medir la resolución temporal completa del sistema, también llamada Función de Respuesta Instrumental (*IRF*, por sus siglas en inglés) para obtener la forma de respuesta del láser, tal como aparece en la figura II-13. Por otro lado, como puede observarse, la señal fluorescente es, normalmente, mas larga que el pulso de excitación. Si se dan estas condiciones, podemos describir la señal detectada como una convolución de estas dos señales, y su diferencia en el tiempo permite su separación a través de la aplicación del análisis con ventana temporal.

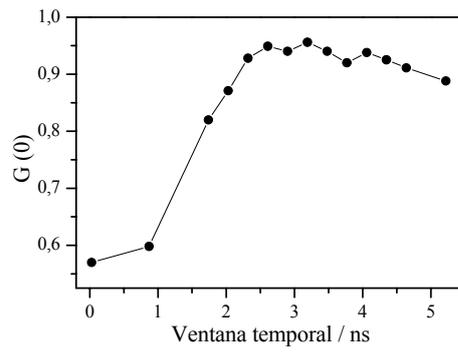


**Figura II-13.** Histograma de conteo de fotones individuales correlacionados en el tiempo (TCSPC) (—) mostrando un pico a tiempos cortos debido a los procesos de dispersión y una señal más larga debido a la emisión fluorescente. Aplicando un análisis con ventana temporal (área coloreada en azul) permite separar la señal fluorescente y los fotones de la luz dispersa. La línea roja representa la señal ocasionada por el pulso del láser.

La instrumentación en modo TTTR permite la reconstrucción de los histogramas de decaimiento, tal y como se muestra en la figura II-13, y la aplicación de ventanas temporales para filtrar los fotones llegados al detector debidos únicamente a fluorescencia, eliminando aquellos procedentes de dispersión Rayleigh o Raman. Esto permite la obtención de funciones de autocorrelación puras de fluorescencia, sin contribución de artefactos. Para la elección del inicio de la ventana temporal, se selecciona el punto donde el pulso de excitación decrece sustancialmente pero su fluorescencia tenga todavía una señal alta. En la figura II-13, la ventana temporal seleccionada se representa con el área coloreada de azul. Solo los protones comprendidos entre los límites temporales seleccionados son utilizados para la obtención de la función de correlación.

Si la ventana temporal no se escoge adecuadamente, la amplitud de la función de correlación  $G(0)$  puede depender del ajuste de la ventana temporal. Para conocer esta dependencia, se han registrado los valores obtenidos con el colorante TG-II, entre la posición inicial de la ventana temporal utilizada y la función de correlación de fluorescencia a  $G = (0)$ . Los valores obtenidos se muestran en la figura II-14. Como puede observarse, aparece un máximo después de  $2.5 \text{ ns}$ , indicando que esa escala temporal tiene la mejor relación señal:ruido. A tiempos posteriores, el valor de  $G$  decrece, ya que; los fotones originados por la fluorescencia quedan fuera del análisis en mayor cantidad con respecto a los fotones que originan el ruido de fondo.

Sin embargo, existen ciertas condiciones experimentales en las que el ruido no es ocasionado completamente por la luz dispersa, como por ejemplo autofluorescencia. En estos casos, el análisis con ventana temporal no conseguirá separar completamente la señal fluorescente del ruido de fondo.



**Figura II-14.** Valor de  $G(0)$  de la curva de correlación de fluorescencia del Tokyo Green-II en disolución acuosa como función del inicio de la ventana temporal.

# *III. Resultados y discusión*



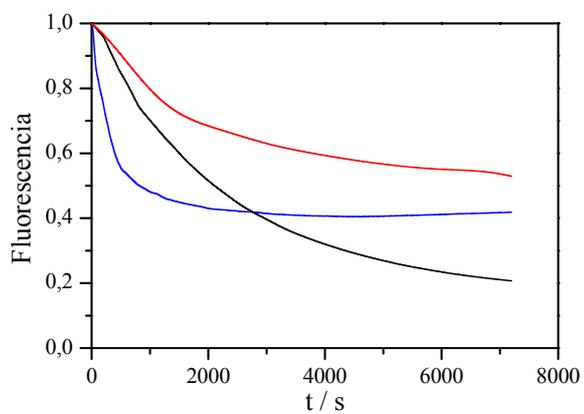
### III.1. FOTOESTABILIDAD

Uno de los problemas más importantes a tener en cuenta en el uso de colorantes fluorescentes, y especialmente en su uso en espectroscopia de fluorescencia de moléculas individuales, es la estabilidad del fluoróforo tras una larga exposición a un láser u otra fuente de excitación. El fenómeno conocido como fotoblanqueamiento se puede definir como la destrucción fotoquímica de un fluoróforo. Como ya es conocido, su aparición provoca complicaciones en la observación de las moléculas fluorescentes, por lo que es de gran interés, comprobar la fotoestabilidad de nuestros nuevos derivados (*Lakowick, 1999*)

En nuestro estudio se midió la estabilidad de nuestros derivados xanténicos, 9-[1-(2-metoxi-5metilfenil)]-6-hidroxi-3H-xantén-3-ona (**TG-I**) y 9-[1-(2-metil-4-metoxifenil)]-6-hidroxi-3H-xanten-3-ona (**TG-II**) y se compararon con la fluoresceína. El experimento fue llevado a cabo en glicerol, con el fin de obtener una alta viscosidad en el medio y a una concentración baja de fluoróforo ( $1 \times 10^{-11}$  M) para evitar la renovación de moléculas susceptibles de ser excitadas. Las disoluciones fueron excitadas mediante una lámpara de Xe de manera continuada, con la mayor abertura de rendija disponible en el fluorímetro (20 nm), con el fin de ocasionar el mayor daño posible a nuestros colorantes. Se recogió la señal de fluorescencia con el tiempo para comprobar su fotoestabilidad.

La figura III-1 muestra la señal de fluorescencia normalizada en estado estacionario y su evolución con respecto al tiempo de irradiación. En la figura puede observarse como el TG-I presenta una mayor estabilidad que los otros dos fluoróforos, así como tras más de 7000 s, su señal conserva más de un 60 % de la fluorescencia inicial. También puede verse como el TG-II aunque sufre una bajada significativa de su fluorescencia en poco tiempo, posteriormente llega a un mínimo a partir del cual se conserva su fluorescencia con respecto al tiempo,

lo que conlleva que este compuesto sea, al igual que el TG-I, más estable que la fluoresceína.



**Figura III-1.** Intensidad de fluorescencia normalizada en estado estacionario vs tiempo de irradiación, de disoluciones,  $1 \times 10^{-11}$  M, de fluoresceína (—), TG-I (—) y TG-II (—), en glicerol. Las muestras fueron sometidas a una excitación continua mediante una lámpara de Xenon.

## **III.2. ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN Y EQUILIBRIO EN EL ESTADO FUNDAMENTAL.**

Como paso inicial en el estudio de las propiedades fotofísicas del TG-I y del TG-II en disolución acuosa, se ha llevado a cabo la caracterización de su estado fundamental. De esta manera, se han estudiado las constantes que definen los equilibrios ácido-base implicados ( $pK_a$ ), así como los espectros de absorción de las especies prototrópicas presentes. La adquisición de los 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. Debido a que la aparición de estos fluoróforos es muy reciente existe muy poca información sobre los datos que la describen. Así en bibliografía (*Urano et al, 2005*), sólo encontramos los rendimientos cuánticos de las especies neutra y aniónica del TG-I y TG-II. Por lo que es importante realizar un estudio detallado de las características ácido-base en disolución acuosa, en el estado fundamental.

### III.2.1. Estudio del equilibrio ácido-base y obtención de los espectros de absorción de las especies prototrópicas en disolución acuosas.

Las leyes que rigen el equilibrio 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 valor del 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. De

esta manera, la absorbancia a una determinada longitud de onda y a un cierto valor de pH viene dada por la expresión:

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

donde  $C_T$  es la concentración total del 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.

Debido a la ausencia de grupo carboxílico en el benceno de nuestros derivados xanténicos, con respecto a la estructura química de la fluoresceína, podemos afirmar que tanto el TG-I como el TG-II en disolución acuosa presentan tres formas prototrópicas distintas, catión ( $C$ ), neutro ( $N$ ) y anión ( $A$ ). Por lo tanto en el estudio absorciométrico de los equilibrios ácido-base en el estado fundamental de ambos TG, se considerarán dichas especies. De esta manera, son dos los valores de  $pK_a$  implicados en los equilibrios ácido-base, según el esquema III-1



**Esquema III-1.** Equilibrios prototrópicos considerados en el tratamiento del estado fundamental de los compuestos TG-I y TG-II.

De acuerdo con la ecuación III-1 y los equilibrios del esquema III-1, las fracciones molares de cada especie en función del valor del pH vienen dadas por las siguientes expresiones:

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

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

$$\alpha_A = \frac{K_C K_N}{P} \quad (\text{III-4})$$

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

Basándonos en lo anteriormente expuesto, se ha procedido a determinar los valores de  $pK_a$  implicados en el equilibrio ácido-base, así como los coeficientes de extinción molar de las diferentes especies presentes a las diversas longitudes de onda de interés.

#### III.2.1.1. Obtención de $\epsilon_A$

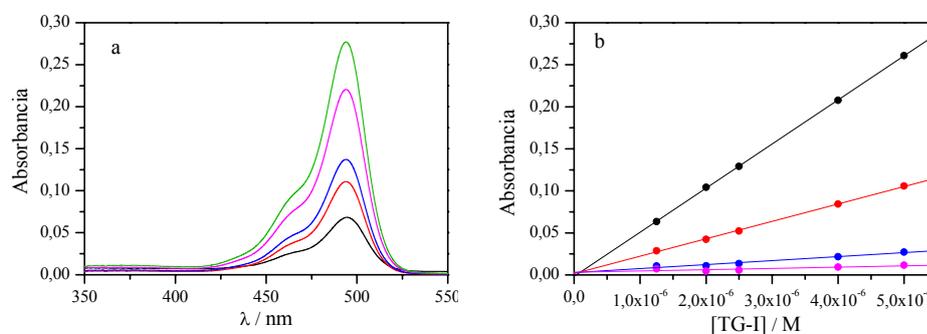
Para la determinación del coeficiente de extinción molar de la especie aniónica, y teniendo como referencia el  $pK_a$  del equilibrio monoanión-dianión de la fluoresceína, se llevaron las disoluciones a valores de pH suficientemente elevados, en donde exclusivamente exista la especie aniónica. De esta manera, la ecuación (III-1) puede simplificarse en:

$$A = C_T \epsilon_A d \quad (\text{III-5})$$

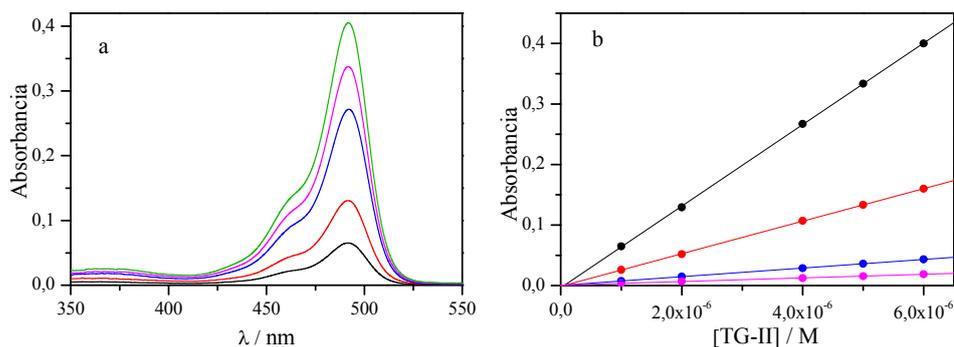
Se recogieron espectros de absorción de disoluciones acuosas de los compuestos TG-I y TG-II con una concentración constante de NaOH ( $1.27 \times 10^{-3}$  M), tal y como se describe en la sección *Material y Métodos*, obteniéndose para todas las disoluciones un pH final de 10.00. Para ello se prepararon disoluciones con concentraciones crecientes de TG-I y TG-II en los intervalos

comprendidos entre  $1.25 \times 10^{-6}$  M a  $5.0 \times 10^{-5}$  M y  $1.25 \times 10^{-6}$  M a  $6.0 \times 10^{-5}$  M, respectivamente.

Posteriormente se realizó un ajuste lineal  $A$  vs  $C_T$  por mínimos cuadrados, para todas las longitudes de onda en intervalos de 2 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 monoaniónica  $\epsilon_A$  a cada longitud de onda determinada. En las Figuras III-2A y III-3A se muestran los espectros recogidos para TG-I y TG-II, mientras que en las Figuras III-2B y III-3B se observan algunos de los ajustes lineales efectuados.



**Figura III-2.** a) Espectros con concentraciones crecientes de TG-I en disoluciones de valores de pH básico.  $[TG-I] = 1.25 \times 10^{-6}$  M (—),  $2.0 \times 10^{-6}$  M (—),  $2.5 \times 10^{-5}$  M (—),  $4.0 \times 10^{-5}$  M (—),  $5.0 \times 10^{-5}$  M (—). b) Ajustes lineales  $A$  vs  $C_T$  de los espectros recogidos a valor de pH básico a las longitudes de onda de: 490 (—), 470 (—), 440 (—), 420(—) nm.



**Figura III-3.** a) Espectros con concentraciones crecientes de TG-II en disoluciones de valores de pH básico.  $[TG-II] = 1.0 \times 10^{-6} \text{ M}$  (—),  $2.0 \times 10^{-6} \text{ M}$  (—),  $4.0 \times 10^{-5} \text{ M}$  (—),  $5.0 \times 10^{-5} \text{ M}$  (—),  $6.0 \times 10^{-5} \text{ M}$  (—). b) Ajustes lineales  $A$  vs  $C_T$  de los espectros recogidos a valor de pH básico a las longitudes de onda de: 490 (—), 470 (—), 440 (—), 420 (—) nm.

Se puede comprobar que la linealidad de la Ley de Beer se cumple bien, incluso a concentraciones de  $6.0 \times 10^{-5} \text{ M}$ .

En las tablas III-1 y III-2 se muestran los valores de coeficientes de extinción recuperados mediante el ajuste lineal, a algunas longitudes de onda de interés.

**Tabla III-1.** Valores recuperados para la pendiente y la ordenada en el origen del ajuste de la ecuación III-5 a la  $A$  vs  $C_T$  de TG-I para cuatro longitudes de onda.

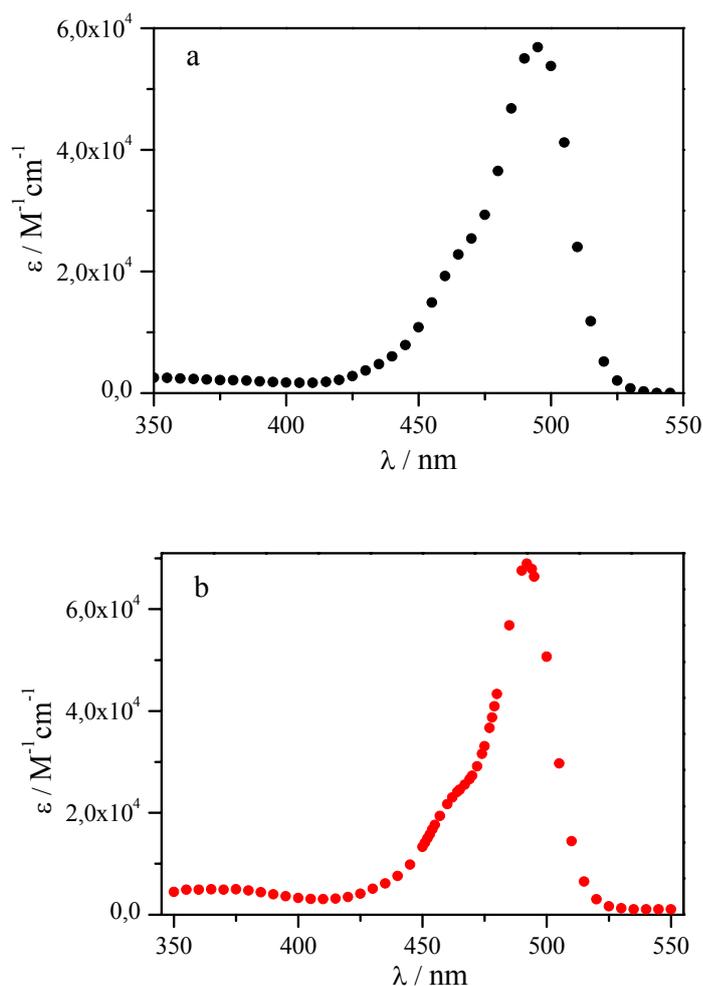
Longitud de onda	Pendiente / $\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	Ordenada en origen	$r^2$
420	$1512 \pm 584$	$0.0032 \pm 0.0019$	0.8312
440	$4730 \pm 529$	$0.0029 \pm 0.0017$	0.98171
470	$20712 \pm 362$	$0.0016 \pm 0.0012$	0.99954
490	$52428 \pm 258$	$-0.0016 \pm 0.0008$	0.99996

**Tabla III-2.** Valores recuperados para la pendiente y la ordenada en el origen del ajuste de la ecuación III-5 a la A vs  $C_T$  de TG-II para cuatro longitudes de onda.

Longitud de onda	Pendiente / $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$	Ordenada en origen	$r^2$
420	$3460 \pm 69$	$0.0007 \pm 0.0003$	0.9992
440	$7130 \pm 40$	$0.00041 \pm 0.00016$	0.99995
470	$27310 \pm 140$	$0.00017 \pm 0.0006$	0.99997
490	$67568 \pm 331$	$0.0007 \pm 0.0013$	0.9998

Todos los ajustes han ofrecido un coeficiente de regresión mayor a 0.95 y un error asociado a la determinación del  $\epsilon$  menor del 1% para todas las longitudes de onda cuyo valor de absorbancia es significativo (entre 450 y 510 nm), y conjuntamente la ordenada en el origen de las rectas obtenidas ha resultado despreciable.

De todos estos ajustes se pueden obtener el espectro de la especie aniónica para ambos compuestos mediante la representación de los coeficientes de extinción molar a cada longitud de onda, tal y como se muestra en la Figura III-4.



**Figura III-4.** Coeficientes de extinción molar calculados a partir de la ecuación III-5 del TG-I (a) y del TG-II (b), entre las longitudes de onda de 350 y 550nm.

Es posible observar que la forma aniónica del TG-I presenta su máximo de absorción a 495 nm y un coeficiente de extinción molar de  $56863 \pm 300 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ; mientras que para el TG-II, su espectro de absorción está ligeramente desplazado hacia el azul situándose el máximo de absorción a 492 nm y un coeficiente de extinción molar de  $68960 \pm 350 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ . Los dos colorantes presentan un hombro alrededor de 460 nm. El coeficiente de extinción molar del

TG-II resulta ligeramente más elevado (1.2 veces) que el del TG-I. Adicionalmente se debe destacar la similitud con el espectro de absorción del dianión de la fluoresceína, que presenta un máximo a 490 y un coeficiente de extinción molar de  $83600 \pm 700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

La tabla III-3 muestra algunos valores del coeficiente de extinción molar a diferentes longitudes de onda de interés, obtenidas del el ajuste anteriormente mencionado, y los compara con algunos coeficientes de los fluoróforos más usados hoy en día.

**Tabla III-3.** Coeficiente de absorción molar de la especie aniónica del TG-I y TG-II así como el dianión y pentaanión (equivalentes con el anión) de algunos colorantes xanténicos más utilizados en ensayos biológicos según bibliografía (Fluoresceína: *Álvarez-Pez et al., 2001*; OG488: *Orte et al., 2005a*; BCECF: *Böens et al., 2006*)

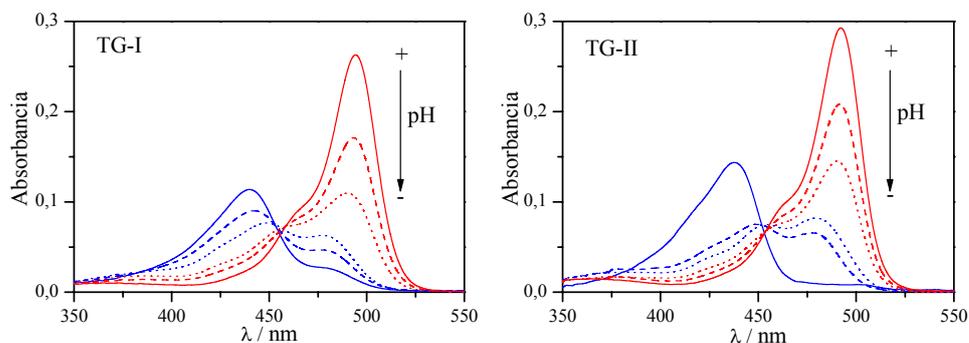
$\lambda / \text{nm}$	$(\epsilon / \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}) \times 10^{-4}$				
	TG-I	TG-II	Fluoresceína <sup>2-</sup>	OG488 <sup>2-</sup>	BCECF <sup>5-</sup>
420	$0.15 \pm 0.06$	$0.35 \pm 0.01$	$0.30 \pm 0.08$	$0.38 \pm 0.10$	$0.28 \pm 0.09$
440	$0.47 \pm 0.05$	$0.71 \pm 0.01$	$0.92 \pm 0.08$	$1.05 \pm 0.10$	$0.70 \pm 0.09$
470	$2.07 \pm 0.04$	$2.73 \pm 0.01$	$3.80 \pm 0.08$	$4.10 \pm 0.10$	$2.98 \pm 0.09$
480	$3.65 \pm 0.03$	$4.34 \pm 0.03$	$6.11 \pm 0.08$	$6.48 \pm 0.10$	$4.19 \pm 0.09$
490	$5.24 \pm 0.03$	$6.76 \pm 0.03$	$8.28 \pm 0.08$	$8.95 \pm 0.10$	$6.23 \pm 0.09$

### III.2.1.2. Obtención de $\epsilon_N$

Se han realizado espectros de absorción de disoluciones acuosas de TG-I y TG-II a concentraciones de  $6 \times 10^{-6} \text{ M}$  y  $4 \times 10^{-6} \text{ M}$  respectivamente, en un amplio rango de valores de pH (entre 2.71 y 9.12 para el TG-I y 1.63 y 9.15 para el TG-II). Para lograr este gradiente de valores de pH, se prepararon las distintas disoluciones mezclando diferentes cantidades de tampón  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  y

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$  con el objeto de mantener un valor de pH estable, y a baja concentración, para evitar la posibilidad de formación de complejos.

La Figura III-5 muestra, por claridad, solo algunos de los espectros de absorción del TG-I y del TG-II en el rango de pH antes mencionado.

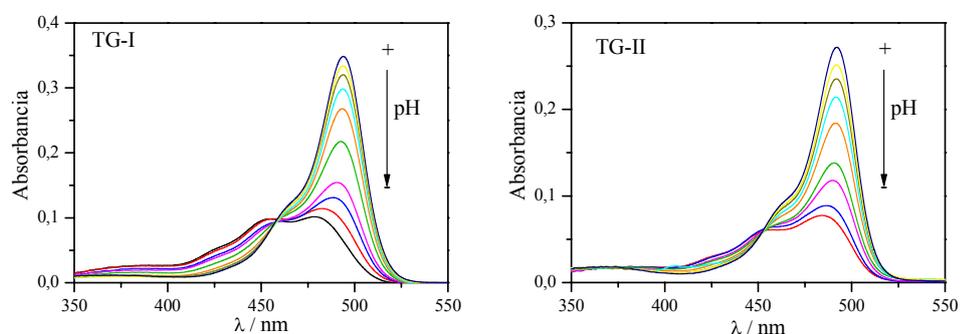


**Figura III-5.** Espectro de absorción de disoluciones acuosas de TG-I y TG-II de  $6 \times 10^{-6}$  M y  $4 \times 10^{-6}$  M respectivamente, a valores de pH para el TG-I de: 2.71, 3.20, 3.72, 5.93, 6.70 y 9.12. Y valores de pH para el TG-II de: 1.63, 3.75, 5.28, 6.23, 6.67 y 9.15.

Como ya es conocido, los cambios de absorbancia experimental para las disoluciones a distintos valores de pH son debidos a los equilibrios químico ácido – base en el estado fundamental, los cuales vienen regidos por los valores de  $\text{pK}_a$  de las sustancias de interés.

En la Figura III-5 aparecen dos puntos isobésticos para ambos fluoroforos, TG-I y TG-II, característico de dos equilibrios ácido – base consecutivos. Los valores de los puntos isobésticos determinados experimentalmente para el TG-I se sitúa a bajos valores de pH en 455 nm y a valores moderados de pH a 460 nm; mientras que para el TG-II los puntos isobésticos hallados se sitúan en 452 nm y 455 nm a bajos y moderados valores de pH respectivamente.

La aparición de dos puntos isobéuticos nos indica la existencia de dos equilibrios para ambos compuestos. Asimismo nos muestra la imposibilidad de aislar experimentalmente la especie neutra para el cálculo de su coeficiente de extinción molar, ya que siempre se encontrará en equilibrio con alguna de las otras especies, neutra o aniónica. Debido a que el equilibrio entre las formas aniónica y neutra ocurre entre un rango de pH cercano al fisiológico, se ha optado por estudiar dicho equilibrio y obtener tanto el  $pK_a$  como el coeficiente de extinción molar de la especie neutra, mediante un ajuste global de todas las curvas de  $A$  vs pH.



**Figura III-6.** Espectros de absorción de disoluciones de TG-I y TG-II a valores de pH entre 5.15 y 9.50 para el colorante TG-I y 5.52 y 10.00 para el TG-II. La flecha muestra valores decrecientes de pH.

Para la obtención de la superficie de valores de absorción a analizar, se prepararon las disoluciones de los colorantes con un gradiente de valor de pH; entre 5.15 y 9.50 para el colorante TG-I y 5.52 y 10.00 para el TG-II. Dicho rango fue seleccionado una vez analizado los espectros de la Figura III-6 y desechados los espectros que rompieron el punto isobéutico ya que esto sugiere la presencia de una tercera especie (forma catiónica) en el medio. 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 especies involucradas en el equilibrio a estudiar, en este caso, la forma neutra y la forma aniónica:

$$A = C_T(\alpha_N \varepsilon_N + \alpha_A \varepsilon_A)d \quad (\text{III-6})$$

en donde  $\alpha_i$  representa a las fracciones molares de cada especie, que fueron anteriormente definidas en las ecuaciones III-3 y III-4. Dividiendo por la concentración total y por el coeficiente de extinción molar de la especie aniónica (ya calculado para cada longitud de onda en la sección III.2.1.1) y haciendo  $d = l$  cm (paso de luz empleado en las medidas experimentales), nos queda:

$$\frac{A}{C_T \varepsilon_A} = \frac{\varepsilon_N}{\varepsilon_A} \alpha_N + \alpha_A \quad (\text{III-7})$$

Para cada longitud de onda el cociente  $\varepsilon_N/\varepsilon_A$  varía, mientras que las constantes de los equilibrios ácido-base, implícitas en las definiciones de  $\alpha_i$ , son comunes para todas las curvas de  $A$  vs pH. Con estas consideraciones, la ecuación finalmente ajustada es la siguiente:

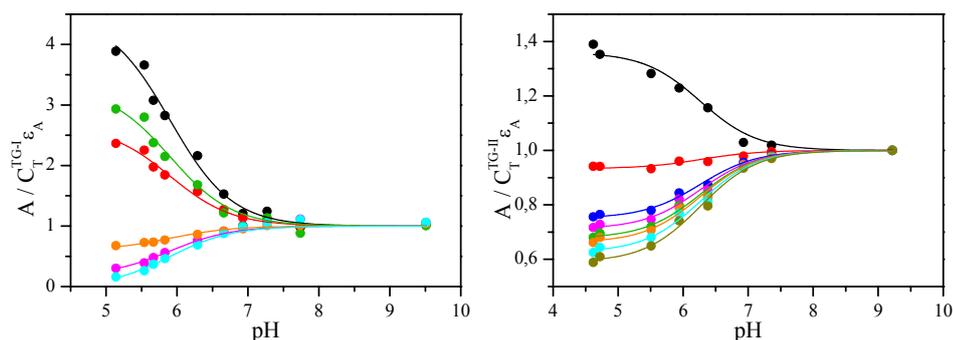
$$\frac{A}{C_T \varepsilon_A} = \frac{R_N 10^{-pH} + 10^{-pK_N}}{P} \quad (\text{III-8})$$

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

Se ha denotado por  $R_N$  al cociente  $\varepsilon_N/\varepsilon_A$  y  $P$  es el polinomio dado por la ecuación III-9.

$$P = 10^{-pH} + 10^{-pK} \quad \text{(III-9)}$$

Los parámetros de ajuste son  $pK_N$  (común a todas las longitudes de onda) y el valor de  $R_N$  (diferente a cada longitud de onda). El ajuste global no lineal se llevó a cabo utilizando el programa *Origin 7.0*, empleándose 40 longitudes de onda para el cálculo del coeficiente de extinción molar de la especie neutra del TG-I, 60 longitudes de onda diferentes para el TG-II, todas ellas comprendidas entre 350 y 550 nm.

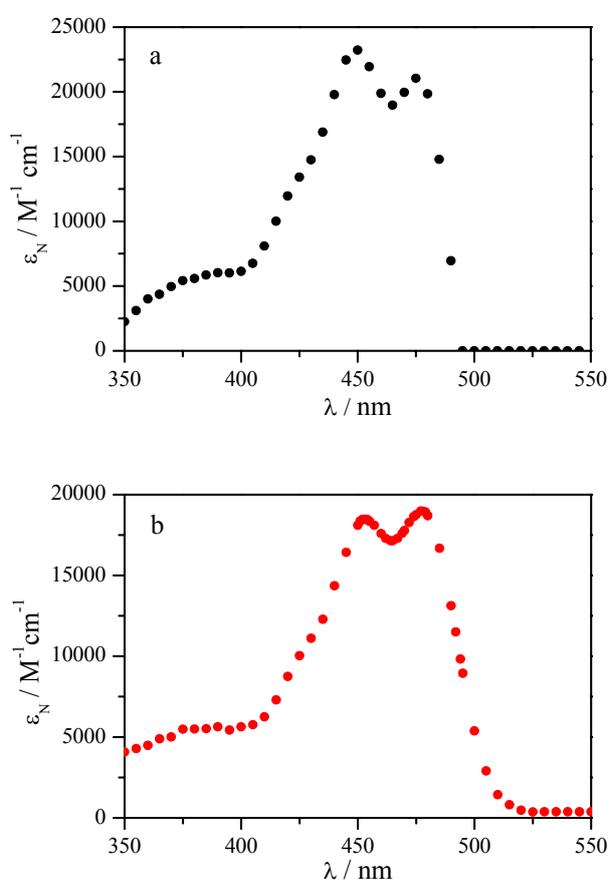


**Figura III-7.** Ajuste no lineal por mínimos cuadrados de  $A/(C_T \varepsilon_A)$  vs pH. Las absorbancias están medidas a las longitudes de onda de: 420(—), 440(—), 490(—), 400(—), 475(—) y 500 nm(—) para el TG-I y 450(—), 457(—), 462(—), 464(—), 467(—), 469(—), 472(—) y 474(—) para el TG-II.

La figura III-7 muestra algunos de estos ajustes donde se obtiene la relación entre  $\varepsilon_N/\varepsilon_A$  y se recupera el valor de  $pK_a$  del equilibrio anión-neutro.

Los ajustes de la figura III-7 proporcionaron correlaciones aceptables ( $r^2 = 0.991$  para el TG-I y  $r^2 = 0.994$  para el TG-II) y nos permitieron la obtención del  $\varepsilon_N$ , a partir de la relación  $\varepsilon_N/\varepsilon_A$ , una vez que ya era conocido el coeficiente de extinción molar de la especie aniónica.

Al igual que en el apartado anterior podemos obtener el espectro de la especie de interés, en este caso la especie neutra, de ambos compuestos mediante la representación de los coeficientes de extinción molar a cada longitud de onda (Figura III-8)



**Figura III-8.** Coeficientes de extinción molar calculados para las especies neutras del TG-I (a) y del TG-II (b) calculados a partir de la ecuación III-8.

El coeficiente de extinción molar, entre las longitudes de onda de 440 y 480 nm, de la especie neutra del TG-I es ligeramente superior que el del TG-II, presentando dos máximos a 450 y 475 nm y un valle a 465 nm para el TG-I, mientras que en el TG-II los máximos se sitúan a 453 nm y 477 nm y el valle a 465 nm. Como se puede apreciar la especie neutra para ambos compuestos presenta una forma similar a la del monoanión de la fluoresceína que presenta sus picos máximos a 454 y 474 nm y el valle a 461 nm.

Como se comentó anteriormente, del ajuste de la ecuación III-8 a la superficie  $A/(C_T \epsilon_A)$  vs pH., es posible obtener los valores del  $pK_N$  implicados en el equilibrio neutro-anión tanto para el TG-I como el TG-II. Dicho ajuste aportó los valores de  $pK_N$ ,  $5.94 \pm 0.06$  y  $6.27 \pm 0.02$ , con índices de correlación global de  $r^2 > 0.92$  y  $r^2 > 0.98$ , para el el TG-I y el TG-II respectivamente.

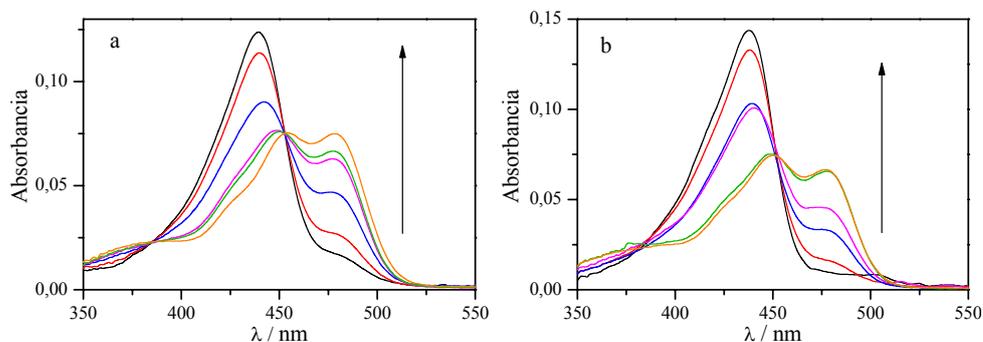
Asimismo la tabla III-4 muestra algunos valores del coeficiente de extinción molar a diferentes longitudes de onda de interés, obtenidas del el ajuste anteriormente mencionado, y los compara con algunos coeficientes de los fluoróforos mas usados hoy en día.

**Tabla III-4.** Coeficiente de absorción molar de la especie neutra del TG-I y TG-II así como el monoanión y tetraanión (equivalentes con el neutro) de algunos colorantes xanténicos más utilizados en ensayos biológicos según bibliografía (Fluoresceína: *Álvarez-Pez et al., 2001*; OG488: *Orte et al., 2005a*; BCECF: *Böens et al., 2006*)

$\lambda / \text{nm}$	$(\epsilon / \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}) \times 10^{-4}$				
	TG-I	TG-II	Fluoresceína <sup>-</sup>	OG488 <sup>-</sup>	BCECF <sup>4-</sup>
420	$1.20 \pm 0.07$	$0.88 \pm 0.04$	$1.34 \pm 0.08$	$1.46 \pm 0.06$	$1.21 \pm 0.09$
440	$1.98 \pm 0.08$	$1.44 \pm 0.02$	$2.35 \pm 0.08$	$2.60 \pm 0.06$	$2.00 \pm 0.09$
470	$2.00 \pm 0.08$	$1.78 \pm 0.08$	$3.11 \pm 0.08$	$3.43 \pm 0.06$	$2.93 \pm 0.09$
480	$1.98 \pm 0.08$	$1.87 \pm 0.08$	$3.04 \pm 0.08$	$3.26 \pm 0.06$	$3.26 \pm 0.09$
490	$0.70 \pm 0.08$	$1.31 \pm 0.01$	$1.99 \pm 0.08$	$2.29 \pm 0.06$	$2.88 \pm 0.09$

III.2.1.3. Obtención de  $\varepsilon_c$

Una vez obtenido el coeficiente de extinción molar de la especie neutra, se procedió a la obtención del coeficiente de absortividad molar para la especie catiónica. Para ello se recogieron los espectros de absorción del TG-I y el TG-II a una concentración de  $6 \times 10^{-6}$  M y  $4 \times 10^{-6}$  M respectivamente, y en un rango de pH comprendido entre 2.38 y 4.85 para el TG-I y entre 1.63 y 4.27 para el TG-II. La figura III-9 muestra algunos de los espectros de TG-I y TG-II para el equilibrio catión-neutro, y en ella se puede observar la aparición de un nuevo punto isobéstico alrededor de 452 nm para el TG-I y de 451 para el TG-II.



**Figura III-9.** **a)** Espectros de absorción recogidos de TG-I ( $6 \times 10^{-6}$  M) a los valores de pH de: 2.38, 2.71, 3.20, 3.72, 3.84 y 4.85. **b)** Espectros de absorción recogidos de TG-II ( $4 \times 10^{-6}$  M) a los valores de pH de: 1.63, 2.45, 2.82, 3.10, 3.75 y 4.27. La flecha indica el aumento del valor de pH.

Partiendo de la ecuación general de absorbancia para las especies involucradas en este equilibrio:

$$A = C_T(\alpha_C \varepsilon_C + \alpha_N \varepsilon_N)d \quad (\text{III-10})$$

Y una vez conocido el coeficiente de absorción molar de la especie neutra podemos transformar la ecuación anterior en la ecuación III-11, dividiendo por la concentración total y por el coeficiente de extinción molar de la especie neutra, obteniéndose:

$$\frac{A}{C_T \varepsilon_N} = \frac{\varepsilon_C}{\varepsilon_N} \alpha_C + \alpha_N \quad (\text{III-11})$$

Dicha ecuación nos permite ajustar la superficie de  $A$  vs pH, obteniéndose el cociente  $\varepsilon_C/\varepsilon_N$  para cada longitud de onda y la constante del equilibrio ácido-base. Esta constante está implícita en las definiciones de  $\alpha_i$ , y son comunes para todas las curvas de  $A$  vs pH. Con estas consideraciones, la ecuación finalmente ajustada es la siguiente:

$$\frac{A}{C_T \varepsilon_N} = \frac{R_C 10^{-pH} + 10^{-pK_C}}{P'} \quad (\text{III-12})$$

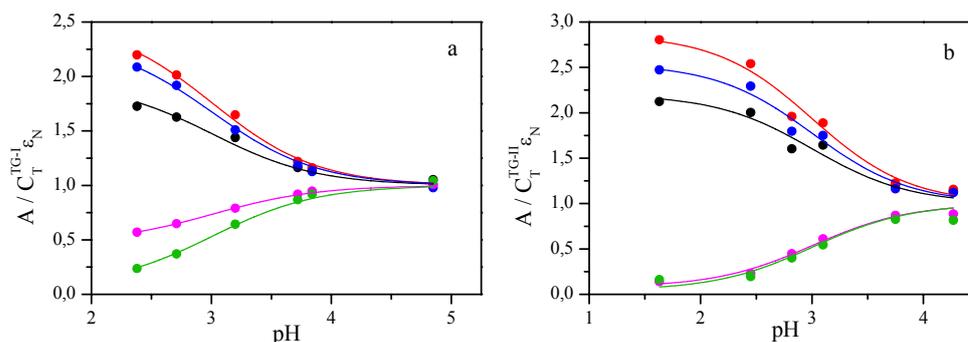
en donde  $\frac{A}{C_T \varepsilon_N}$  es la variable dependiente y el pH la variable independiente.

Se ha denotado por  $R_C$  al cociente  $\varepsilon_C/\varepsilon_N$  y  $P'$  es el polinomio dado por la ecuación III-13.

$$P' = 10^{-pH} + 10^{-pK_C} \quad (\text{III-13})$$

El ajuste global no lineal se llevó a cabo utilizando el programa *Origin* 7.0, empleándose 40 longitudes de onda para el cálculo del coeficiente de extinción molar (cada 5 nm) de la especie catiónica del TG-I y del TG-II, todas

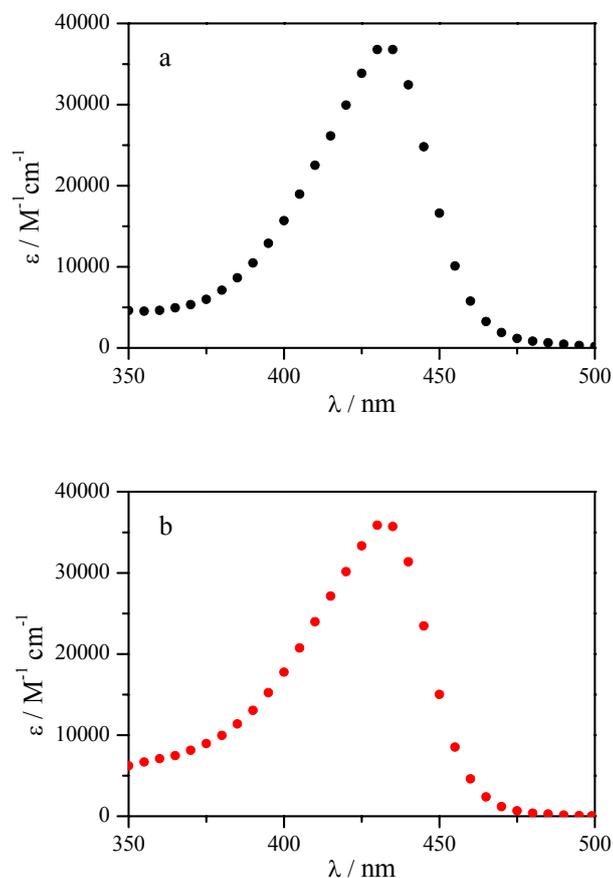
ellas comprendidas entre 350 y 550 nm. Los parámetros ajustables fueron  $R_C$  a cada longitud de onda y el valor del  $pK_C$  como parámetro global. La Figura III-10 muestra algunos de estos ajustes. Los coeficientes de correlación de los ajustes fueron aceptables ( $r^2 > 0.996$   $r^2 > 0.991$  para el TG-I y TG-II, respectivamente).



**Figura III-10. a)** Ajustes globales de las curvas de  $A/C_T^{TG-I} \epsilon_N$  en función del pH. Las longitudes de onda mostradas son: 400 (●), 420 (●), 440(●), 460(●) y 480(●) nm. **b)** Ajustes globales de las curvas de  $A/C_T^{TG-II} \epsilon_N$  en función del pH. Las longitudes de onda mostradas son: 400 (●), 420 (●), 440(●), 460(●) y 480(●) nm.

Con estos datos obtenidos se puede recuperar los valores de  $\epsilon_C$  de los dos colorantes, ya que como se comentó anteriormente conocemos el valor del coeficiente de absorción molar de la especie neutra. Una vez recuperados estos valores podemos obtener el espectro de la especie catiónica mediante la representación de los coeficientes de extinción molar frente a las longitudes de onda correspondientes. (Figura III-11). Los máximos de absorción del TG-I y del TG-II están centrados a 432 nm con coeficientes de extinción molar de  $(3.72 \pm 0.09) \times 10^4$  y  $(3.63 \pm 0.08) \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . En comparación, la forma catiónica de la fluoresceína presenta el máximo de absorción centrado en 437

nm con un coeficiente de absorción de  $(4.29 \pm 0.08) \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Crovetto, 2003).



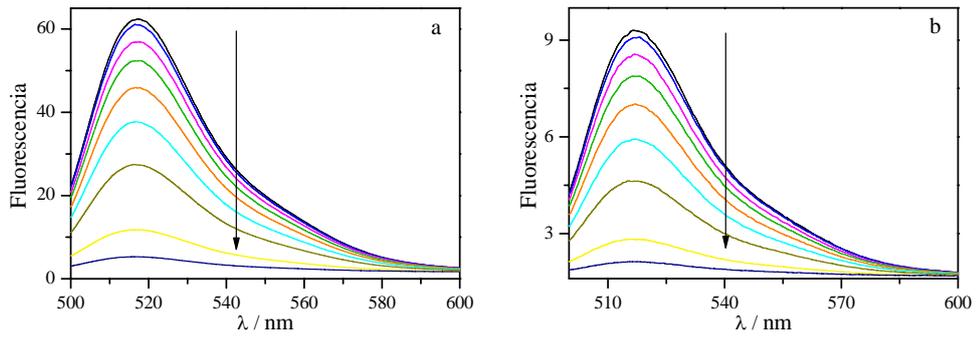
**Figura III-11.** Coeficientes de extinción molar calculados a partir de la ecuación III-5 del TG-I (a) y del TG-II (b).

De estos ajustes de la ecuación III-12 a las superficies  $A/(C_T \epsilon_N)$  vs pH., se obtienen los valores del  $\text{pK}_C$  implicados en el equilibrio cation-neutro tanto para el TG-I como el TG-II. Se obtuvieron los valores de  $\text{pK}_C$   $3.01 \pm 0.03$  y  $3.01 \pm 0.04$ , con coeficientes de correlación de 0.996 y 0.991, para el TG-I y el TG-II respectivamente. En contraste, el  $\text{pK}_C$  de la fluoresceína es de  $2.16 \pm 0.03$  (Crovetto, 2003).

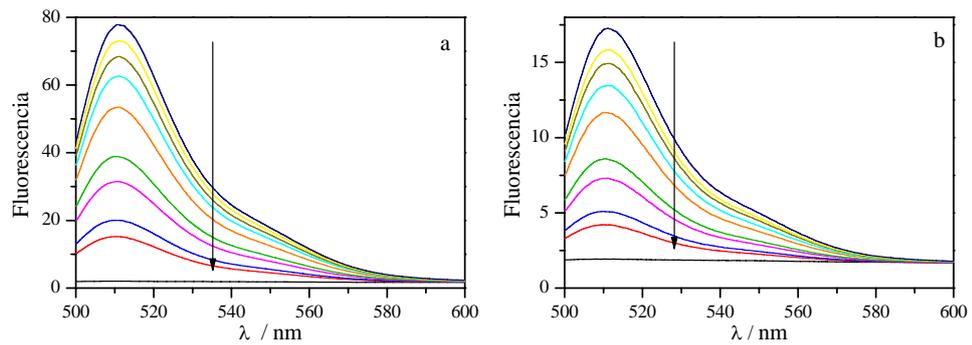
### III.3. ESPECTROSCOPIA DE EMISIÓN DE FLUORESCENCIA EN ESTADO ESTACIONARIO Y CARACTERIZACIÓN DE LA EMISIÓN DE LAS ESPECIES PROTOTRÓPICAS EN DISOLUCIÓN ACUOSA.

Los dos fluoróforos principales estudiados en esta Memoria presentan diferentes características de emisión de fluorescencia, y en concreto, una importante dependencia de éstas con el pH debido a los equilibrios ácido – base. En un primer paso, con objeto de realizar una descripción completa de las características fotofísicas de los nuevos fluoróforos estudiados en esta Memoria, se tratarán las características de fluorescencia en estado estacionario de las disoluciones de TG-I y TG-II para las especies catiónica, neutra y aniónica.

En las figuras III-12 y III-13 se muestran los espectros de emisión en estado estacionario, correspondientes a disoluciones acuosas de TG-I,  $4 \times 10^{-6}$  M, y TG-II,  $6 \times 10^{-6}$  M, a diferentes pHs y una concentración de fosfato igual a 0.02 M. La adición de tampón fosfato a baja concentración nos permite regular fácilmente el pH de la disolución, sin que introduzca otros efectos como reacciones de transferencia protónica en el estado excitado ya que la concentración empleada es lo suficientemente baja (*Ávarez-Pez et al., 2001*). En las figuras III-12a y III-13a la longitud de onda de excitación fue de 440 nm, la correspondiente a una excitación preferente de la forma neutra para ambos compuestos, mientras que en las figuras III-12b y III-13b la longitud de onda de excitación fue de 490 nm, excitando así preferentemente la forma aniónica frente al catión. Como se puede observar, la intensidad de fluorescencia de los espectros varían con el pH.



**Figura III-12.** Emisión de fluorescencia del TG-I ( $6 \times 10^{-6}$  M) en un rango de valores de pH comprendido entre 5.40, 5.52, 6.29, 6.64, 6.94, 7.24, 7.63, 8.39 y 8.93. Las muestras se prepararon con una concentración de 0.01 M de tampón de fosfato. La flecha indica la disminución del valor de pH. La longitud de onda de excitación fue de a) 490 nm y b) 440 nm.



**Figura III-13.** Emisión de fluorescencia del TG-II ( $4 \times 10^{-6}$  M) en un rango de valores de pH comprendido entre 3.46, 5.52, 5.76, 6.05, 6.33, 6.65, 6.89, 7.19, 7.62, y 9.00. Las muestras se prepararon con una concentración de 0.02 M de tampón de fosfato. La flecha indica la disminución del valor de pH. La longitud de onda de excitación fue de a) 480 nm y b) 440 nm.

Al objeto de realizar un análisis cuantitativo de los resultados obtenidos, a continuación se va a derivar una expresión matemática que relaciona la intensidad de fluorescencia con el pH, bajo el supuesto de que no se produce la reacción en el estado excitado entre la especie neutra y la aniónica para ambos TGs, es decir, a baja concentración de tampón. Para simplificar el modelo, se va a suponer que, para valores de  $\text{pH} > 5$ , la especie catiónica (si estuvieran presentes) de los TGs, se convierten rápidamente y con el 100 % de eficiencia en especie neutra excitada, a través de reacciones de transferencia protónica en el estado excitado. Este último hecho fue convincentemente demostrado en un trabajo previo para la fluoresceína (Yguerabide *et al.* 1994). Así, la emisión sucede exclusivamente desde la especie neutra a la aniónica. Con estas suposiciones se puede escribir la siguiente expresión para la intensidad de fluorescencia,  $I$ , en disolución acuosa:

$$I = C_T K_p [\phi_N (\alpha_C \varepsilon_C + \alpha_N \varepsilon_N) + \phi_M \alpha_M \varepsilon_M] \quad (\text{III-14})$$

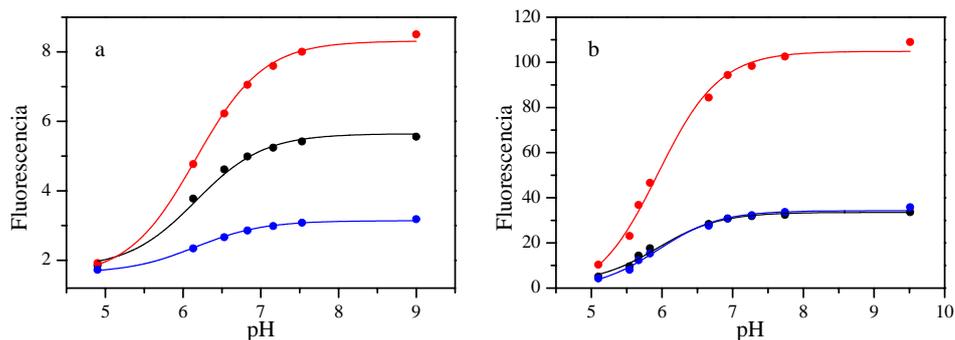
en donde  $C_T$  es la concentración total de fosfato,  $\alpha_i$  es la fracción de TG en la forma protonada  $i$ ,  $\varepsilon_i$  es el coeficiente de extinción molar de la forma protonada  $i$  del TG, y  $\phi_N$  y  $\phi_M$  son las eficiencias relativas de fluorescencia de neutro y anión, respectivamente, a la longitud de onda de emisión,  $K_p$  es la constante de proporcionalidad entre los rendimientos cuánticos y las eficiencias relativas de las especies prototrópicas. El valor de  $\alpha$  depende del pH y del  $\text{pK}_a$  en el estado fundamental, mientras que los valores de  $\varepsilon$  dependen de la longitud de onda de excitación y los de  $\phi$  de la longitud de onda de emisión. En esta ecuación también se ha supuesto que las eficiencias de fluorescencia no dependen del pH. La dependencia de  $I$  con el pH se obtiene de la dependencia de  $\alpha_i$  con el pH, según las ecuaciones III-1–III-4.

Para determinar si la intensidad de fluorescencia frente al pH en presencia de baja concentración de fosfato, se puede explicar de forma cuantitativa por el modelo de la ecuación III-14, se ajustó la mencionada ecuación, junto a las ecuaciones III-1–III-4 que describen la dependencia de  $\alpha_i$  con el pH, a los datos experimentales de las Figuras III-12 y III-13. En el citado ajuste se consideraron fijos los valores de  $\varepsilon_i$ , previamente obtenidos en la sección III.2 y se dejaron flotantes los de  $K_a$ ,  $\phi_M$  y  $\phi_D$ . Los valores de la constante de equilibrio y el cociente de los parámetros espectrales obtenidos para el mejor ajuste, se exponen en la tabla III-5. El coeficiente de correlación en ambos casos fue superior a 0.997.

**Tabla III-5.** Valores de la relación entre los rendimientos cuánticos de las especies neutra y anionica y pK, obtenidos mediante fluorescencia en estado estacionario.

	Esta Memoria		Urano et al. (2005)	
	TG-I	TG-II	TG-I	TG-II
$\phi_N / \phi_A$	$0.08 \pm 0.04$	$0.03 \pm 0.01$	0.008	0.012
pK	$5.94 \pm 0.04$	$6.16 \pm 0.02$	--	~ 6.2

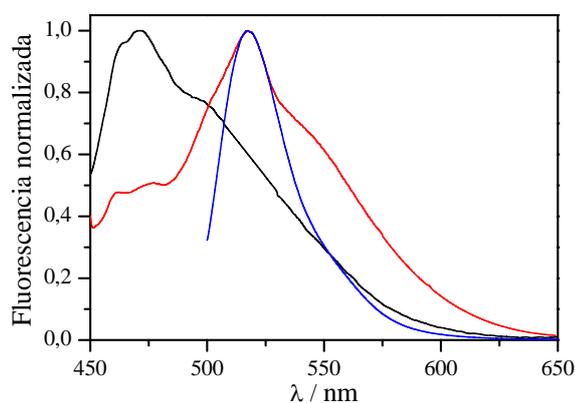
La línea continua a través de los puntos experimentales de la figura III.14 se ha calculado con la ecuación correspondiente y los valores de los parámetros de la Tabla III-4. Como se puede observar, el ajuste fue excelente, lo que justifica las suposiciones realizadas sobre la conversión de la especie catiónica en la neutra, incluso a baja concentración de dador/aceptor protónico. El valor obtenido para el pK<sub>a</sub> de TG-II (6.16) concuerda bien con el estimado anteriormente por *Urano et al. (2005)* (pK<sub>a</sub> = 6.20).



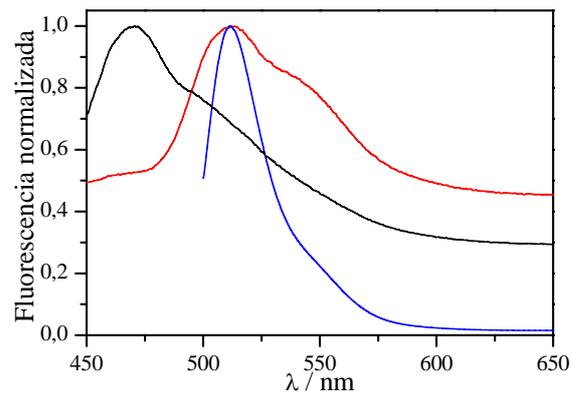
**Figura III-14. a)** Ajuste de la ecuación III-14 a los datos de fluorescencia vs pH del TG-I a  $6 \times 10^{-6}$  M a concentración de 0.01 M de tampón fosfato. La longitud de onda de excitación fue de 490 nm y las longitudes de onda de emisión seleccionadas fueron: (●) 500, (●) 515 y (●) 550 nm. El pK calculado fue de  $5.94 \pm 0.04$ . El coeficiente de correlación fue de 0.997 **b)** Ajuste de la ecuación III-14 a los datos de fluorescencia vs pH del TG-II a  $4 \times 10^{-6}$  M a concentración de 0.01 M de tampón fosfato. La longitud de onda de excitación fue de 480 nm y las longitudes de onda de emisión seleccionadas fueron: (●) 500, (●) 515 y (●) 550 nm. El pK calculado fue de  $6.16 \pm 0.02$ . El coeficiente de correlación del ajuste fue de 0.999

En las figuras III-15 y III-16 se recogen los perfiles espectrales de emisión recuperados de las distintas especies prototrópicas del TG- I y TG- II respectivamente. Para ello, se realizaron espectros de emisión de los colorantes a distintos valores de pH. Así, para la obtención del perfil de emisión del anión se preparó la muestra a pH 9.00. La obtención del perfil de emisión de catión se realizó en una disolución 7 M de  $\text{HClO}_4$ , Estos valores son lo suficientemente extremos como para asegurar la ausencia de otras especies prototrópicas distintas a las estudiadas. Finalmente, para el registro del perfil neutro, se prepararon muestras a pH 0.62 y 1.63, a este valor de pH, se observa un perfil espectral distinto al catiónico y aniónico. A estos valores de pH, en los espectros de absorción nos muestra la presencia de la forma catiónica, sin embargo, la emisión corresponde a la forma neutra (Figura III-5). Este hecho indica que estos colorantes tienen una rápida desprotonación en el estado

excitado de la forma catiónica. Por tanto, consideramos estos colorantes como superfotoácidos al igual que ocurre con la fluoresceína (Shah *et al.*, 1984, 1985), derivados como el Oregon Green 488 (Orte *et al.*, 2005a y c) el 8-hidroxipireno-1,3,6-trisulfonatos (HPTS) (Suwaiyan *et al.*, 1990) o los cianonaftoles (Tolbert *et al.*, 1990). Cabe destacar que la emisión de las especies neutra y catiónica en el proceso de normalización debieron multiplicarse por factores mayores de 300.



**Figura III-15.** Espectros normalizados de emisión en estado estacionario de disoluciones acuosas TG-I a valores de pH de: 9.00 (—), 0.52 (—) y 7 M de HClO<sub>4</sub> (—). El espectro de emisión a valor de pH de 9.00 se registró a  $\lambda_{ex}$ =490 nm y corresponde con la emisión de la forma aniónica. Los espectros de emisión a valores de pH de 0.78 y 7 M de HClO<sub>4</sub> se registraron a  $\lambda_{ex}$ =440 nm. Estos corresponden a la forma neutra y catiónica respectivamente.



**Figura III-16.** Espectros normalizados de emisión en estado estacionario del TG-II en disolución acuosa a valores de pH de: 10,00 (—), 1,63 (—) y 7 M de  $HClO_4$  (—). El espectro de emisión a valor de pH de 10,00 se registró a  $\lambda_{ex}=490$  nm y corresponde con la emisión de la forma aniónica. Los espectros de emisión a valores de pH de 1,63 y 7 M de  $HClO_4$  se registraron a  $\lambda_{ex}=440$  nm. Estos corresponden a la forma neutra y catiónica respectivamente.

#### III.4. INFLUENCIA DE LA FUERZA IÓNICA SOBRE EL VALOR DEL $pK_a$ .

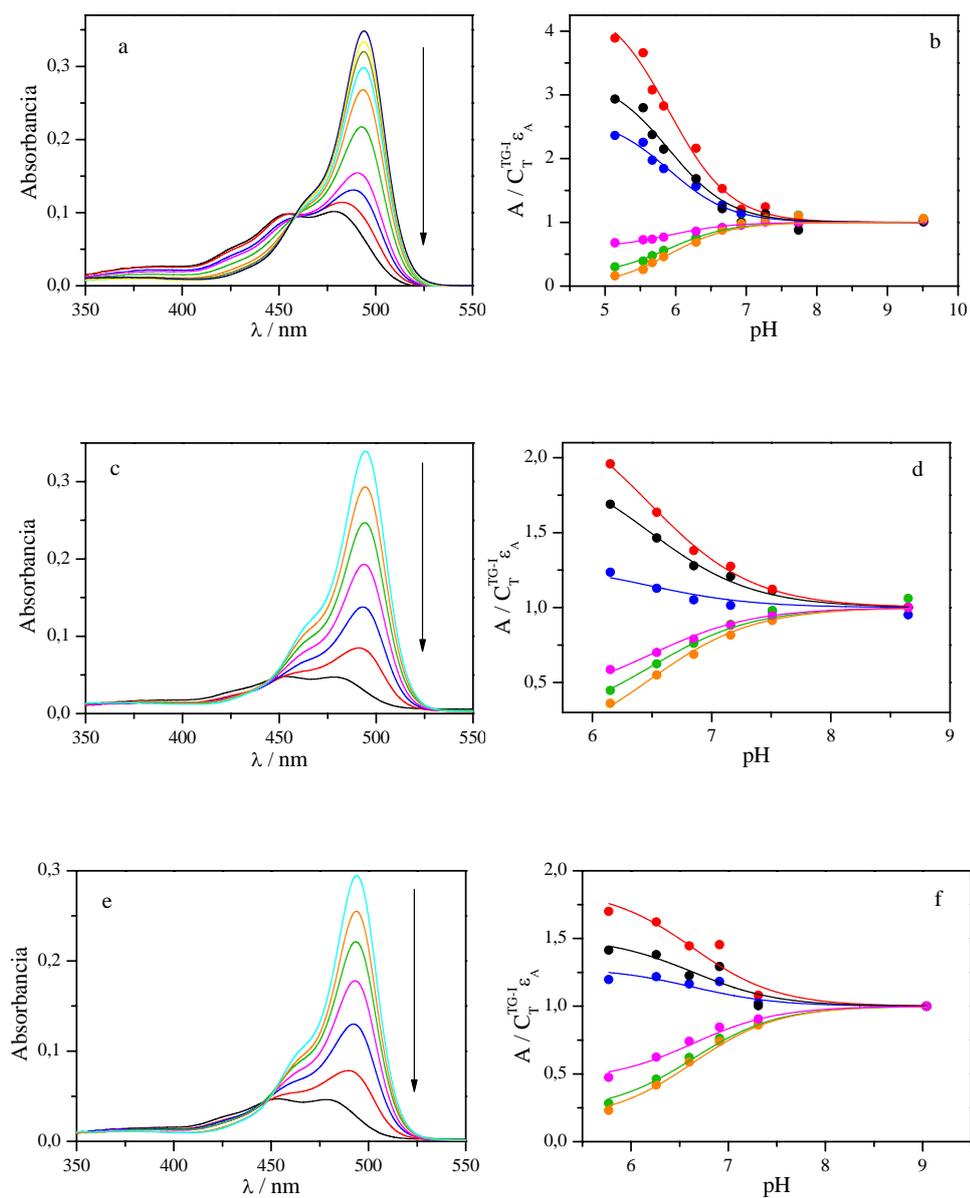
Alrededor del valor de pH fisiológico, sólo están presentes en el medio las especies neutra y aniónica, y la reacción de intercambio protónico se describe por la constante de acidez  $pK_a$ . Sin embargo, la fuerza iónica del medio afecta a los coeficientes de actividad de las especies iónicas, con lo que en realidad los métodos espectrales proporcionan un valor de  $K_a$  aparente. Es por tanto de interés un detallado estudio de la dependencia de la  $K_a$  con la fuerza iónica. Para ello, se prepararon disoluciones de TG-I y TG-II en un rango de valores de pH y a distintas fuerzas iónicas; en el que sus espectros de absorción tuvieran un único punto isobéptico, de tal manera que sólo las especies neutra y aniónica estuvieran presentes en el medio. Para la preparación de estas disoluciones se utilizó tampón fosfato a baja concentración, y para aumentar la fuerza iónica del medio se usaron concentraciones crecientes de cloruro potásico. Se recogieron tanto los espectros de absorción como los de emisión de fluorescencia a dos longitudes de onda de excitación (440 nm y 490 nm), para aplicar tanto métodos absorciométricos como fluorimétricos (directo y ratiométrico) en la determinación de los valores de  $pK_a$  aparentes ( $pK_a^{app}$ ).

##### III.4.1. Obtención de los valores de $pK_a^{app}$ .

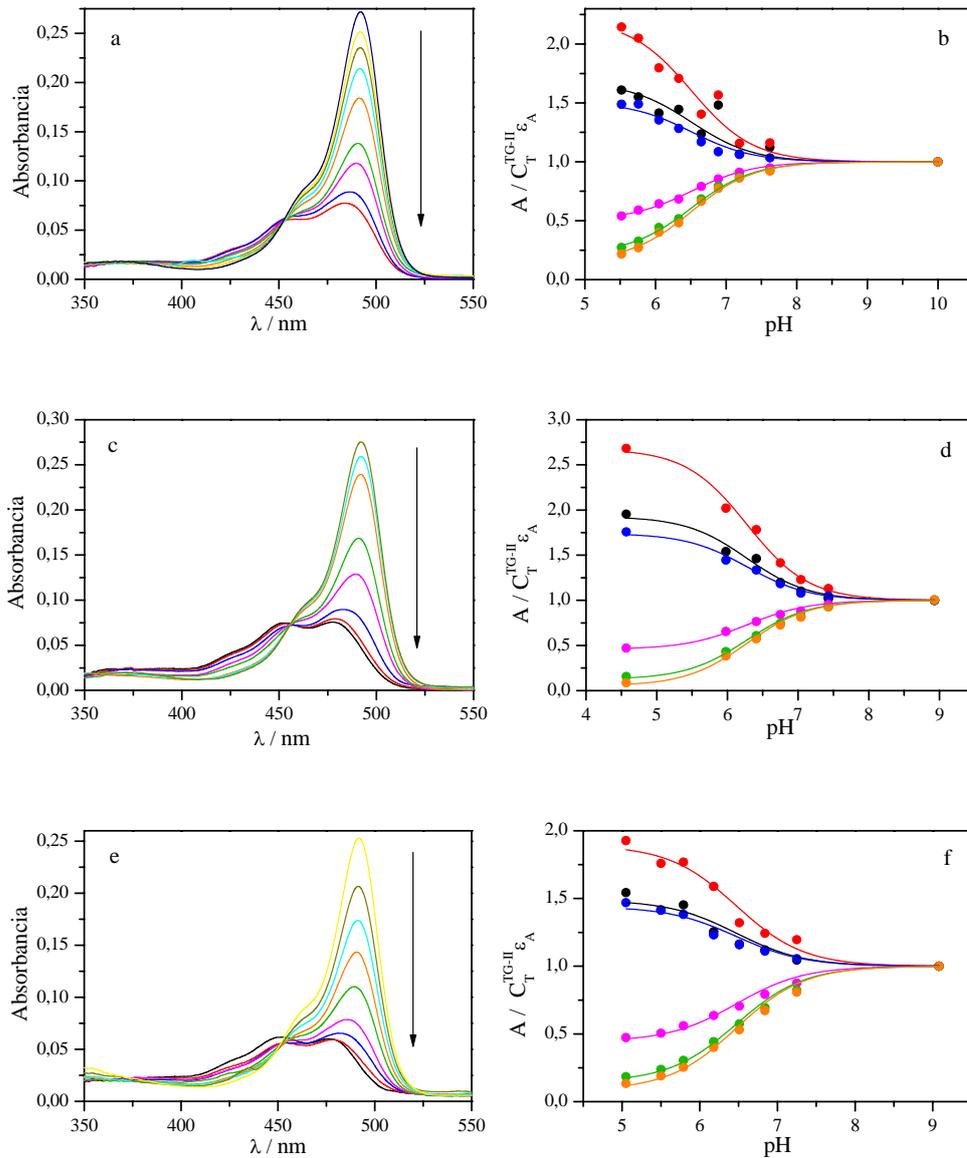
###### III.4.1.1. Determinación de $pK_a^{app}$ por método absorciométrico.

La absorbancia,  $A$ , de los colorantes en disolución acuosa depende del valor de pH según la ley de Beer y de la teoría de equilibrio ácido-base. Para analizar la absorbancia experimental en función del valor de pH, implantamos un método de ajuste no lineal por mínimos cuadrados, tal como se menciona

anteriormente en el apartado III.2.1.3 según la ecuación III-8. En la figura III-17 y III-18 se muestran algunos espectros de absorción recogidos, con sus respectivos ajustes, para el TG-I y TG-II respectivamente. Las curvas que rompían el punto isobéstico no fueron tomadas en cuenta a la hora de realizar el ajuste. Estos ajustes permitieron la obtención de  $pK_a^{app}$  obtenidos a cada fuerza iónica, que posteriormente fueron utilizados para la obtención del  $pK_a$  termodinámico según se expone en el apartado III-4-2.



**Figura III-17.** Espectros de absorción recogidos de TG-I ( $6 \times 10^{-6}$  M) a diferentes fuerzas iónicas (figura a  $\mu = 0.02$ , figura c  $\mu = 0.3$  y figura e  $\mu = 0.5$ ). Las flechas indican el descenso del valor de pH. Las figuras b, d y f corresponden, respectivamente, a los ajustes globales de las curvas de  $A/C_T^{TG-I} \epsilon_A$  en función del pH. Las longitudes de onda mostradas son: 400 (—), 420 (—), 440(—), 475(—), 490(—) y 500(—) nm.



**Figura III-18.** Espectros de absorción recogidos de TG-II ( $4 \times 10^{-6}$  M) a diferentes fuerzas iónicas (figura a  $\mu = 0.04$ , figura c  $\mu = 0.3$  y figura e  $\mu = 0.7$ ). Las flechas indican el descenso del valor de pH. Las figuras b, d y f corresponden, respectivamente, a los ajustes globales de las curvas de  $A/C_T^{TG-II} \epsilon_A$  en función del pH. Las longitudes de onda mostradas son: 400 (—), 420 (—), 440 (—), 475 (—), 490 (—) y 500 (—) nm.

Los valores de  $pK_a^{app}$  obtenidos en el ajuste por el método absorciométrico se recogen en la tabla III-6:

**Tabla III-6.** Valores de  $pK_a^{app}$  obtenidos mediante el ajuste global de la ecuación III-8, a las curvas de  $A/C^{TG} \cdot \epsilon_A$

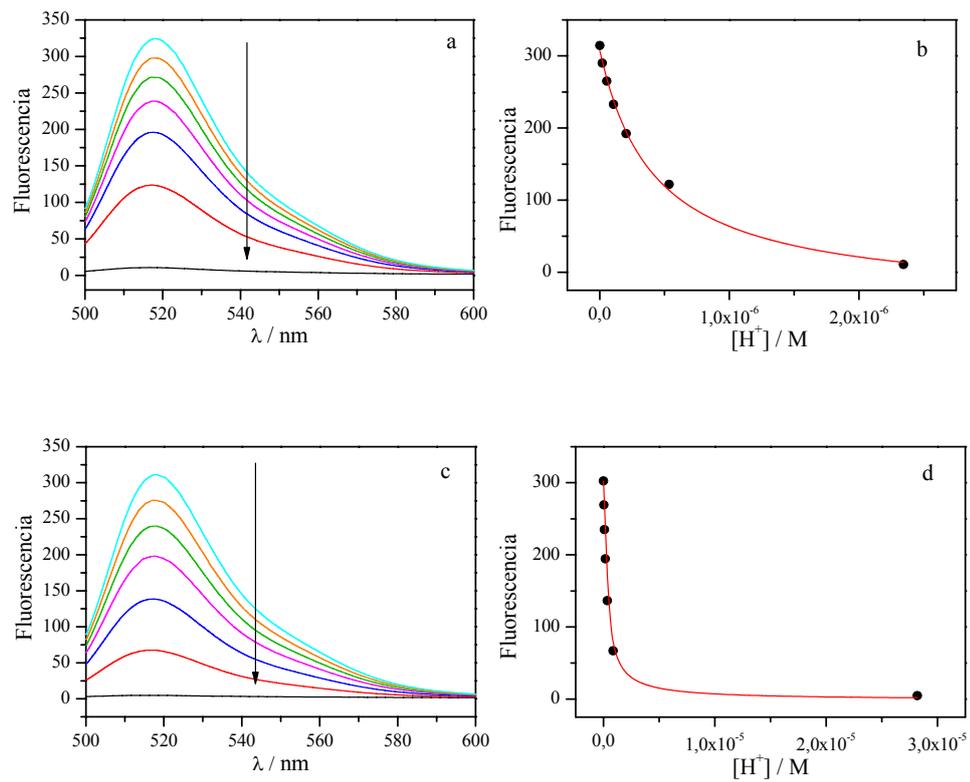
TG-I		TG-II	
Fuerza iónica	$pK_a^{app}$	Fuerza iónica	$pK_a^{app}$
0.02	$6.19 \pm 0.07$	0.06	$6.19 \pm 0.04$
0.037	$6.30 \pm 0.15$	0.1	$6.29 \pm 0.07$
0.12	$6.32 \pm 0.03$	0.2	$6.36 \pm 0.02$
0.2	$6.45 \pm 0.03$	0.3	$6.39 \pm 0.02$
0.3	$6.53 \pm 0.08$	0.4	$6.40 \pm 0.06$
0.5	$6.57 \pm 0.06$	0.7	$6.47 \pm 0.03$
0.7	$6.55 \pm 0.07$	1	$6.50 \pm 0.06$
0.9	$6.66 \pm 0.08$		
1.1	$6.54 \pm 0.06$		
1.2	$6.87 \pm 0.05$		

#### III.4.1.2. Determinación de $pK_a^{app}$ por método fluorimétrico directo.

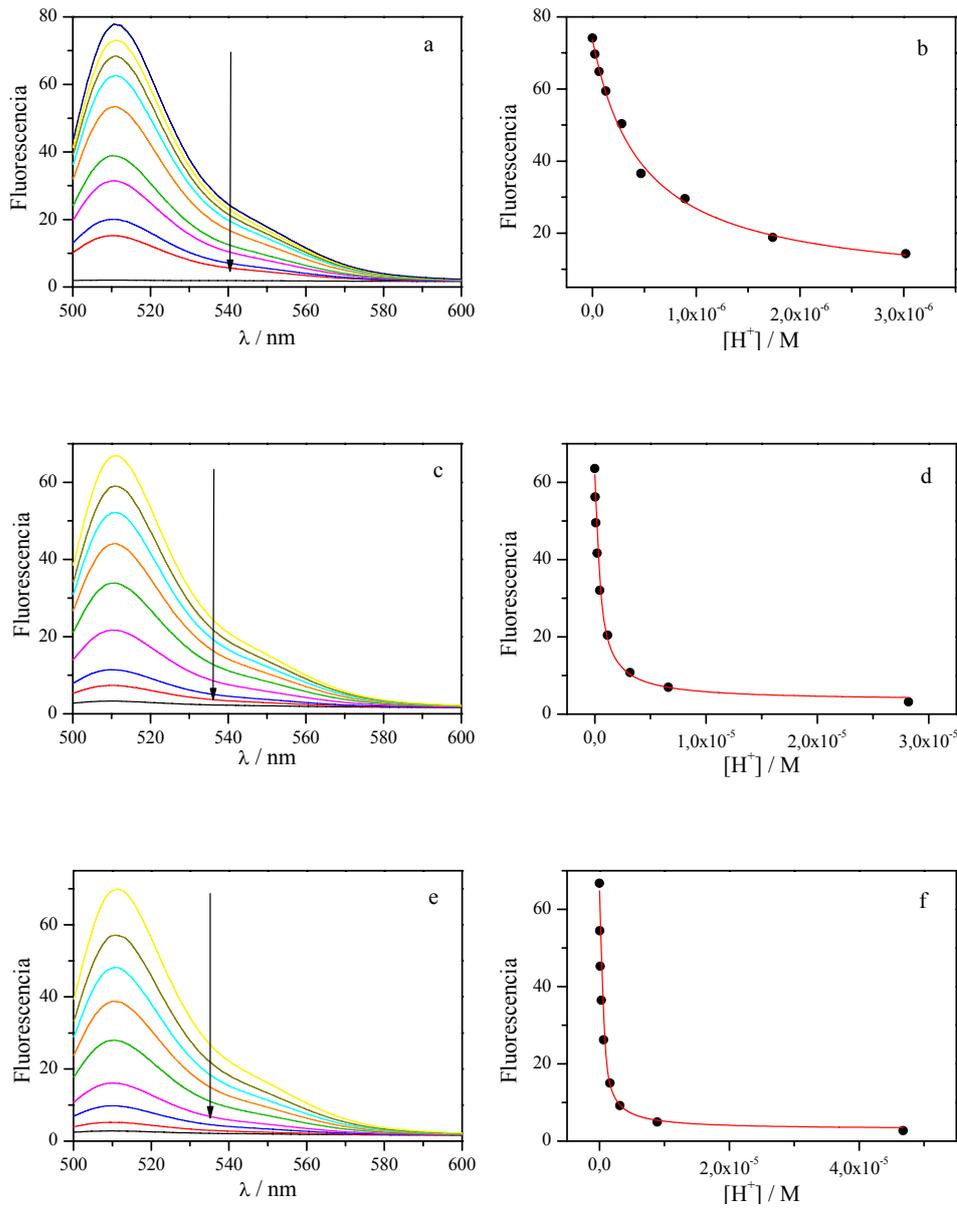
Si el sistema fotofísico descrito es excitado con una luz de intensidad constante, la absorbancia  $A$  de las muestras es menor que 0.1, y además, puede despreciarse la velocidad de unión del protón en el estado excitado, la señal de fluorescencia  $F(\lambda_{ex}, \lambda_{em}, [H^+])$  a concentración protónica  $[H^+]$ , debida a la excitación a longitud de onda  $\lambda_{ex}$  y observada a una longitud de onda  $\lambda_{em}$  puede expresarse como:

$$F(\lambda_{ex}, \lambda_{em}, [H^+]) = \frac{F_{max}[H^+]^n + F_{min}K_a}{K_a + [H^+]^n} \quad (III-15)$$

en donde  $F_{min}$  representa la señal de fluorescencia a la mínima concentración de  $[H^+]$ , es decir, que constituye la señal de fluorescencia de la especie aniónica; mientras que  $F_{max}$  es la señal fluorescente de la máxima concentración de  $[H^+]$ , es decir, que representa la señal de fluorescencia de la especie neutra y  $n$  es el número de protones unidos por molécula. Por lo tanto, el ajuste de la ecuación III-15 a los datos de fluorescencia recogidos  $F(\lambda_{ex}, \lambda_{em}, [H^+])$  en función de la concentración  $[H^+]$  obtendría valores para  $K_a$ ,  $F_{max}$  y  $F_{min}$ . El parámetro  $n$  se mantuvo fijo a 1 en el ajuste realizado, según el estudio estequiométrico de los colorantes.



**Figura III-19.** Espectros de emisión de fluorescencia en estado estacionario del colorante TG-I con distinta fuerza iónica: (figura a  $\mu = 0.04$ , y figura c  $\mu = 0.2$ ). La longitud de onda de excitación fue de 490 nm. Las flechas indican el descenso del valor de pH. Las figuras b y d muestran el ajuste de la ecuación III-15 a los datos de fluorescencia en estado estacionario en función a la concentración de hidrogeniones, a longitud de onda de 515 nm.



**Figura III-20.** Espectros de fluorescencia en estado estacionario del colorante TG-II con distinta fuerza iónica: (figura a  $\mu = 0.04$ , figura c  $\mu = 0.3$  y figura e  $\mu = 0.7$ ). La longitud de onda de excitación fue de 480 nm. Las flechas indican el descenso del valor de pH. Las figuras b, d y f muestran el ajuste de la ecuación III-15 a los datos de fluorescencia en estado estacionario en función de la concentración de hidrogeniones, a longitud de onda de 515 nm.

Los valores de  $pK_a^{app}$  recuperados por el método fluorimétrico directo, a través de la emisión fluorescente del TG- I y TG- II se recogen en la tabla III-7.

**Tabla III-7.** Valores de  $pK_a^{app}$  obtenidos por el método fluorimétrico directo mediante el ajuste de la ecuación III-17 a la emisión fluorescente a diferente concentración protónica.

TG-I		TG-II	
Fuerza iónica	$pK_a^{app}$	Fuerza iónica	$pK_a^{app}$
0.04	$6.37 \pm 0.07$	0.04	$6.22 \pm 0.01$
0.2	$6.54 \pm 0.06$	0.1	$6.26 \pm 0.04$
		0.1	$6.29 \pm 0.03$
		0.3	$6.37 \pm 0.04$
		0.3	$6.34 \pm 0.02$
		1.0	$6.51 \pm 0.02$
		1.2	$6.53 \pm 0.04$

#### III.4.1.3. Determinación de $pK_a^{app}$ por método fluorimétrico ratiométrico.

En el método ratiométrico para la obtención del  $pK_a^{app}$ , se mide  $R = F(\lambda_{em}, \lambda_{ex}^1) / F(\lambda_{em}, \lambda_{ex}^2)$  a una longitud de onda común de emisión,  $\lambda_{em}$ , y dos longitudes de onda de excitación diferentes. La ecuación que proporciona la variación de  $R$  con el pH y el  $pK_a^{app}$  es la siguiente:

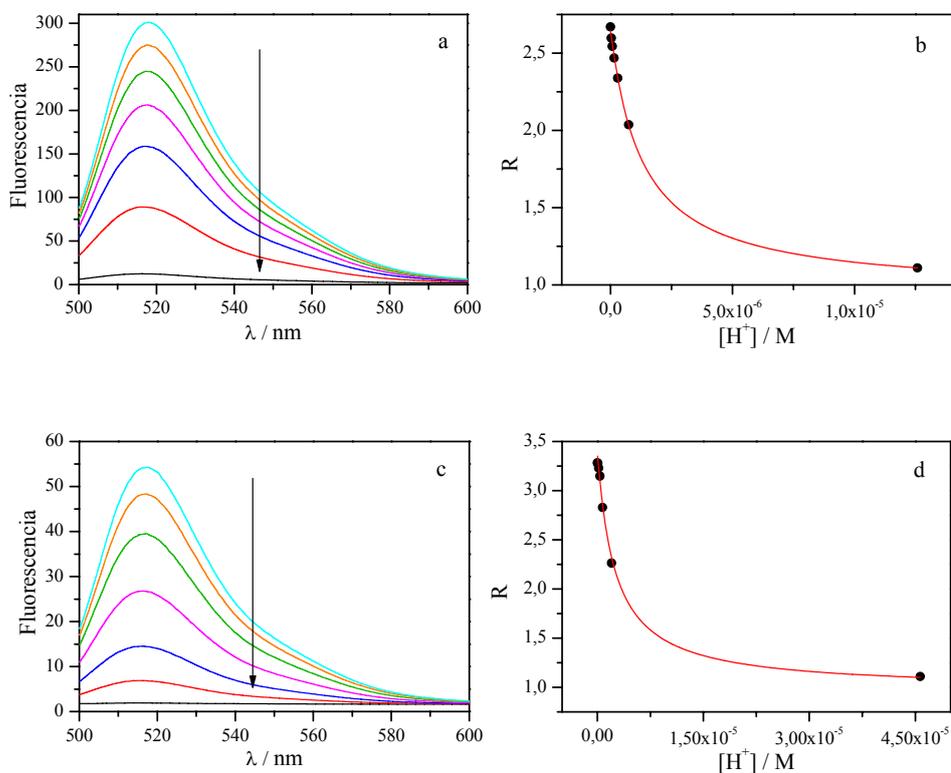
$$R = \frac{R_{max} [H^+]^n + R_{min} K_a^{app} \xi}{K_a^{app} \xi + [H^+]^n} \quad (III-16)$$

donde  $\lambda_{ex}^1$  y  $\lambda_{ex}^2$  son las dos diferentes longitudes de onda de excitación,  $R_{min}$  y  $R_{max}$  corresponden a los ratios de fluorescencia a las concentraciones de  $[H^+]$  mínima y máxima, respectivamente, y el factor  $\xi$  da cuenta de las diferencias

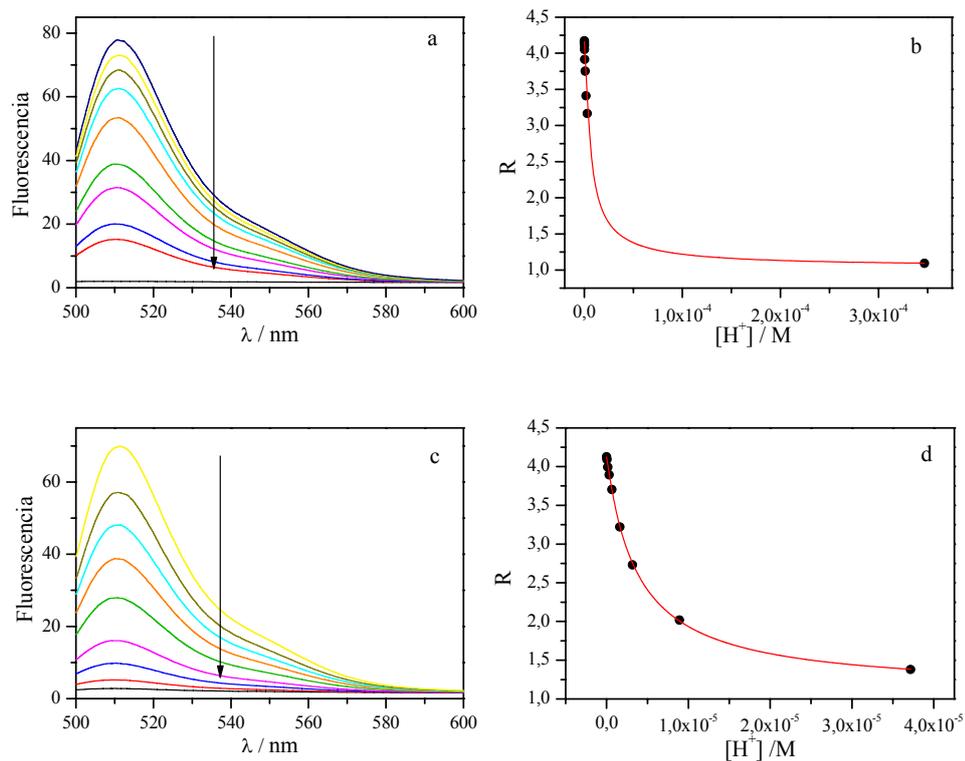
instrumentales entre las longitudes de onda de excitación y puede ser determinado experimentalmente como el ratio de la señal fluorescente entre la forma aniónico del TG-I o TG-II sobre la forma neutra a las longitudes de onda de excitación y emisión indicadas en la ecuación III-17:

$$\xi = F_{min}(\lambda_{em}, \lambda_{ex}^2) / F_{max}(\lambda_{em}, \lambda_{ex}^2) \quad (III-17)$$

Mediante el ajuste no lineal por mínimos cuadrados a la ecuación III-16 a los datos experimentales de  $R$  como función de la concentración de hidrogeniones  $[H^+]$  permite obtener valores para  $pK_a^{app}$ .



**Figura III-21.** Espectros de fluorescencia en estado estacionario del colorante TG-I con distinta fuerza iónica: (figura a  $\mu = 0.12$ , figura c  $\mu = 0.7$ ). Las flechas indican el descenso del valor de pH. Las figuras b, y d corresponden con el ajuste de la ecuación III-16 a los datos de relación de fluorescencia  $R$  en función de la concentración de hidrogeniones, ( $\lambda_{ex} = 490$  nm,  $\lambda_{em}^1 = 515$  nm,  $\lambda_{em}^2 = 550$  nm).



**Figura III-22.** Espectros de fluorescencia en estado estacionario del colorante TG-II con distinta fuerza iónica: (figura a  $\mu = 0.04$ , figura c  $\mu = 0.7$ ). Las flechas indican el descenso del valor de pH. Las figuras b, y d corresponden con el ajuste de la ecuación III-16 a los datos de relación de fluorescencia  $R$  en función de la concentración de hidrogeniones, ( $\lambda_{ex} = 490$  nm,  $\lambda_{em}^1 = 515$  nm,  $\lambda_{em}^2 = 550$  nm).

En la siguiente tabla se muestran los resultados obtenidos por el método descrito anteriormente:

**Tabla III-8.** Valores de  $pK_a^{app}$  obtenidos mediante el ajuste de la ecuación III-16 al ratio de emisión fluorescente entre dos longitudes de onda de emisión en función de la concentración de protones.

TG-I		TG-II	
Fuerza iónica	$pK_a^{app}$	Fuerza iónica	$pK_a^{app}$
0.12	$6.35 \pm 0.07$	0.1	$6.23 \pm 0.02$
0.7	$6.60 \pm 0.10$	0.3	$6.41 \pm 0.02$
0.9	$6.64 \pm 0.10$	0.7	$6.48 \pm 0.02$
		1.0	$6.54 \pm 0.01$
		1.2	$6.52 \pm 0.02$

#### III.4.2. Obtención del valor de $pK_a$ termodinámico.

La ecuación de Hendersson-Hasselbach relaciona el valor de pH con la concentración de las especies prototrópicas, y aplicada al estudio del TG-I y del TG-II en valores de pH alrededores del fisiológico tendremos:

$$pH = pK_a + \log\left(\frac{[A]}{[N]}\right) + \log\left(\frac{f_A}{f_N}\right) - \log(a_{H_2O}) \quad (III-18)$$

donde  $[N]$  y  $[A]$  representan la concentración de las formas neutra y aniónica respectivamente,  $f_N$  y  $f_A$  denotan los coeficientes de actividad de dichas especies, y  $a_{H_2O}$  es la actividad del agua.

El valor del  $pK_a$  aparente ( $pK_a^{app}$ ) está dado por:

$$pK_a^{app} = pK_a + \log\left(\frac{f_A}{f_N}\right) - \log(a_{H_2O}) \quad (III-19)$$

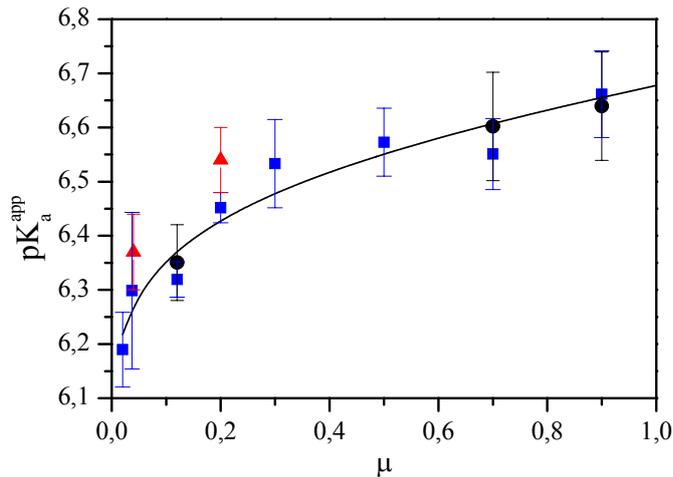
y depende del ratio de los coeficientes de actividad  $f_i$ . Las figuras III-23 y III-24 muestran, para el TG-I y el TG-II respectivamente, el incremento del valor de la constante de acidez aparente del estado fundamental  $pK_a^{app}$  en función de la fuerza iónica. Se encontraron efectos similares en el valor de  $pK_a^{app}$  de varios aminoácidos, en los cuales, el cambio de carga electrónica en la reacción de desprotonación era de  $\pm a$  (Vilariño *et al.* 1997). Por lo tanto, se concluye que la especie neutra puede ser una estructura quinoide neutra o una estructura cargada eléctricamente doble, su coeficiente de actividad a baja fuerza iónica será, por lo tanto, aproximadamente 1 o menor que uno, respectivamente. Así, se usó una función semi-empírica basada en la ecuación extendida de Debye-Hückel para relacionar  $f_i$  con la fuerza iónica ( $\mu$ ). De tal manera que el coeficiente de actividad puede representarse como:

$$\log f_i = \frac{-A_{DH} z_i^2 \sqrt{\mu}}{1 + \dot{a}B\sqrt{\mu}} + L_i \mu \quad (\text{III-20})$$

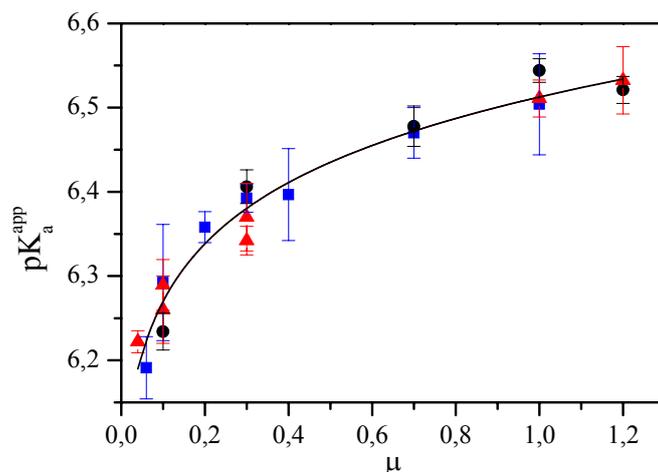
En esta ecuación, también llamada de Truesdell-Jones,  $L_i$  es un parámetro semi-empírico ajustable; los valores a temperatura ambiente y presión atmosférica para  $A_{DH}$  y  $B$  son 0.51 y 0.33, respectivamente;  $\dot{a}$  representa el radio iónico en Angstroms, cuyos valores utilizados en cada caso, se calcularon a través del programa informático *Sybil* obteniendo radios moleculares promedios de 5 Å para el TG-I y 6 Å para el TG-II, y  $z_i$  es la carga iónica. Si sustituimos la ecuación III-20 en la ecuación III-18, y asumiendo un radio similar para la especie neutra y la especie aniónica (es decir,  $\dot{a}_N = \dot{a}_A = \dot{a}$ ), nos queda:

$$pK_a^{app} = pK_a - \left( A_{DH} (z_A^2 - z_N^2) \frac{\sqrt{\mu}}{1 + \dot{a}B\sqrt{\mu}} + L^* \mu \right) - \log(a_{H_2O}) \quad (\text{III-21})$$

Donde  $L^*$  representa un parámetro ajustable compuesto de los valores individuales de  $L_i$ . La ecuación III-22 permite la obtención del  $pK_a$  termodinámico a través del ajuste no lineal de los valores de  $pK_a^{app}$  experimentales. En estos ajustes se emplearon los valores de  $pK_a^{app}$  obtenidos mediante los tres métodos descritos anteriormente, y mostrados en las tablas III-6, III-7 y III-8.



**Figura III-23.** Representación gráfica del valor de  $pK_a^{app}$  estimado de TG-I frente a la fuerza iónica ( $\mu$ ). Los símbolos representan el valor estimado por: (■) medidas de absorción, (▲) método fluorimétrico directo, y (●) método fluorimétrico ratiométrico. La línea representa el ajuste global de la ecuación III-21. Los valores de fuerza iónica  $\mu$  se calcularon para disoluciones a 20 °C y valores de pH 6.80 (este valor de pH corresponde al valor del  $pK_a^B$  del tampón fosfato a 20 °C).



**Figura III-24.** Representación gráfica del valor de  $pK_a^{app}$  estimado de TG-II frente a la fuerza iónica ( $\mu$ ). Los símbolos representan el valor estimado por: ( $\blacksquare$ ) medidas de absorción, ( $\blacktriangle$ ) método fluorimétrico directo, y ( $\bullet$ ) método fluorimétrico ratiométrico. La línea representa el ajuste global de la ecuación III-21. Los valores de fuerza iónica  $\mu$  se calcularon para disoluciones a 20 °C y valores de pH 6.80 (este valor de pH corresponde al valor del  $pK_a^B$  del tampón fosfato a 20 °C).

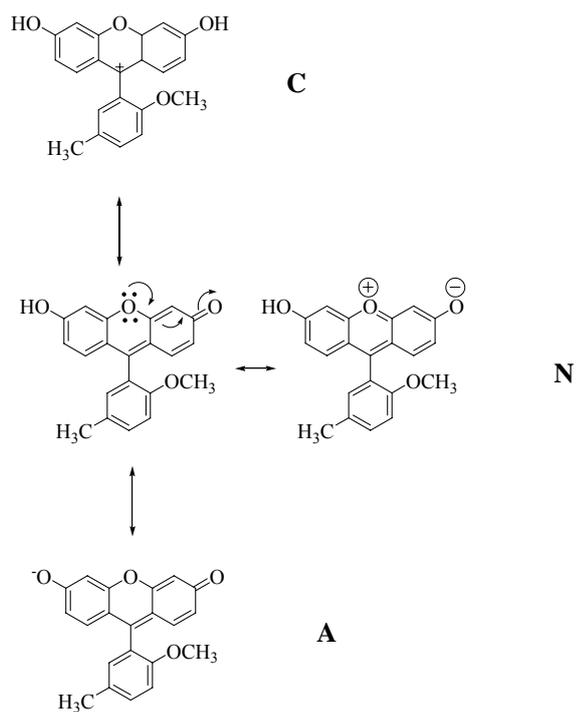
Es evidente que el  $pK_a^{app}$  se incrementa ligeramente con la subida de la fuerza iónica  $\mu$  (de  $\sim 6.2$  a  $\sim 6.7$  para el TG-I y de  $\sim 6.2$  a  $\sim 6.5$  para el TG-II). Sin embargo, este efecto es muy reducido al compararlo con otros derivados de la fluoresceína, ya que en este caso, el número de cargas de las especies prototrópicas envueltas en el equilibrio químico es reducido, haciendo el valor de  $pK_a^{app}$  menos sensible a la concentración salina. Así por ejemplo, la BCECF (*Rink et al., 1982; Paradiso et al., 1984*), un colorante ampliamente utilizado en investigación biológica debido a su elevada retención celular, presenta un descenso de  $\sim 7.9$  a  $\sim 6.8$  en el valor del  $pK_a^{app}$  con el aumento de la fuerza iónica (*Boens et al. 2006*). Esto representa una magnífica ventaja en los indicadores fluorescentes del valor de pH. Las figuras III-23 y III-24 muestran también la curva de ajuste del modelo semi-empírico ( $r^2=0.94$  y  $r^2=0.96$  respectivamente)

en la que se obtuvieron unos valores estimados de  $pK_a$  (a  $\mu = 0$ ) de  $6.04 \pm 0.03$  para el TG-I y de  $5.97 \pm 0.02$  para el TG-II.

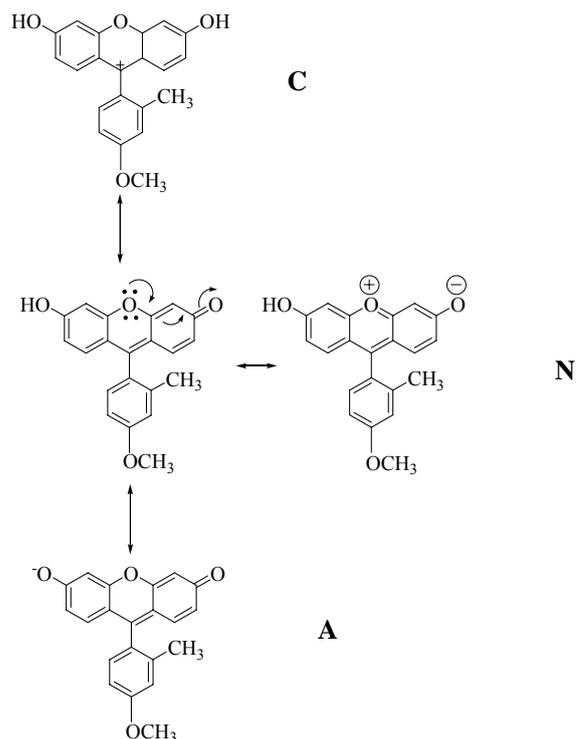
III.4.3. Equilibrios ácido-base del TG-I y del TG-II y dimensiones moleculares.

En los apartados anteriores se ha desarrollado un estudio absorciométrico y fluorimétrico de los equilibrios ácido-base del TG-I y del TG-II, considerando la teoría general del equilibrio y la ley de Beer con tres especies prototrópicas absorbentes implicadas.

De acuerdo con la estructura química de estos compuestos, no es posible encontrar en la forma lactónica de la especie neutra, sin embargo la variación del  $pK_a^{app}$  con la fuerza iónica, en el apartado III.4.2, nos indica la presencia de una forma zwitteriónica en la especie neutra. Por tanto, y a modo de resumen, en los esquemas III-2 y III-3, se representan las estructuras de las formas prototrópicas y los equilibrios ácido-base que, según los resultados de esta Memoria, presentan el TG-I y el TG-II en disolución acuosa.



**Esquema III-2.** Estructura química y reacción de intercambio protónico en el estado fundamental de las fomas del TG-I, **C** (catiónica), **N** (neutra) y **A** (aniónica). La especie neutra se representa mediante dos estructuras resonantes.



**Esquema III-3.** Estructura química y reacción de intercambio protónico en el estado fundamental de las formas del TG-II, **C** (catiónica), **N** (neutra) y **A** (aniónica). La especie neutra se representa mediante dos estructuras resonantes.

Los valores obtenidos para la superficie y el volumen de las distintas formas prototrópicas del TG-I y el TG-II a través del programa informático *Sybil* se recogen en la tabla III-9. Para su cálculo se construyeron modelos de las moléculas utilizando fragmentos los fragmentos adecuados de la base de datos del programa, y las cargas atómicas se calcularon mediante el método de Gasteiger-Marsili (*Gasteiger et al, 1980*) (*Gasteiger et al, 1981*). La geometría se optimizó usando el método Powell (*Powel et al, 2007*), hasta que el gradiente energético fue menor que  $0.05 \text{ Kcal M}^{-1} \text{ \AA}^2$ .

**Tabla III-9.** Dimensiones calculadas por el programa *Sybyl* para las moléculas Tokyo Green-I y Tokyo Green-II.

	Tokyo Green-I		Tokyo Green-II	
	Superficie ( $\text{Å}^2$ )	Volumen ( $\text{Å}^3$ )	Superficie ( $\text{Å}^2$ )	Volumen ( $\text{Å}^3$ )
Forma catiónica	291.1	266.5	300.0	269.8
Forma neutra	288.8	264.7	299.7	269.2
Forma aniónica	286.8	263.3	297.8	266.7

### III.5. ESTUDIO DE LAS REACCIONES DE TRANSFERENCIA PROTÓNICA EN ESTADO EXCITADO DEL TG-I Y DEL TG-II MEDIANTE FLUORIMETRÍA EN ESTADO ESTACIONARIO.

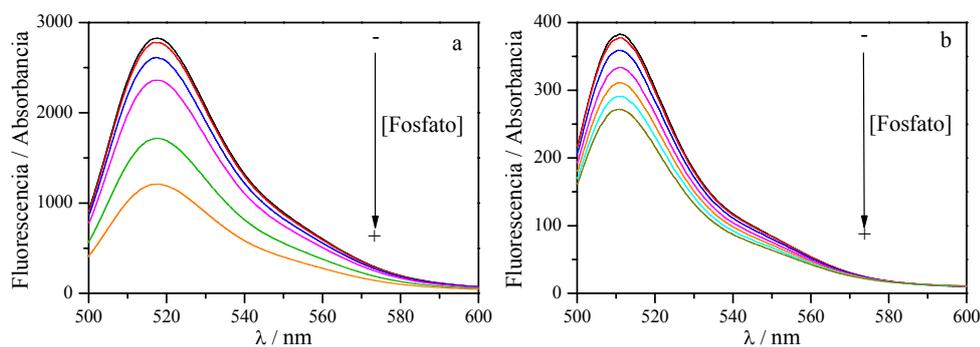
Usualmente, las reacciones de intercambio protónico en estado excitado se detectan comparando las gráficas de absorbancia *vs* pH, con las de intensidad de fluorescencia *vs* pH. Las transiciones inducidas por el valor de pH que aparecen en las representaciones de absorción son debidas a las reacciones de intercambio protónico en el estado fundamental y suceden en las regiones de los valores del pH dictadas por el  $pK_a$  del estado fundamental. Si los valores de  $pK_a^*$  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 valor de pH en el estado excitado, en adición a las transiciones en el estado fundamental observadas en las representaciones de absorbancia *vs* pH.

#### III.5.1. Influencia de un aceptor/dador protónico en la intensidad de fluorescencia del sistema neutro/anión.

Una vez descartada la posibilidad de la presencia de reacciones en el estado fundamental, y caracterizados los perfiles espectrales de la emisión de los colorantes estudiados tal como se describe en la sección III.3, se exponen los experimentos que conducen a demostrar la existencia de la reacción de transferencia protónica en el estado excitado cuando en el medio está presente un aceptor/dador protónico apropiado que promueve reacciones de transferencia protónica durante el tiempo de vida del estado excitado de algunos fluoróforos. En esta Memoria emplearemos el tampón fosfato, que en trabajos anteriores ha

demostrado ser un aceptor / dador protónico adecuado (Alvarez-Pez, 2001). En adición, el  $pK_a$  del tampón fosfato utilizado es 6.80 por lo que resulta muy favorable para el estudio de la mencionada reacción de transferencia protónica, dado que los valores de  $pK_a$  del equilibrio entre las especie neutras y aniónicas del TG-I y del TG-II son respectivamente: 6.04 y 5.97, tal como se obtuvo en el apartado III.4. Estas características permiten que se pueda variar el valor de pH de las disoluciones experimentales con relativa amplitud y conseguir así que predomine la excitación de la especie neutra o bien, de la especie aniónica, según interese para la mejor interpretación y discusión de los resultados.

Es posible demostrar la existencia de la reacción de transferencia protónica en el estado excitado mediada por la presencia de un aceptor/dador protónico, entre la especie neutra y aniónica, con la simple observación de las figura III-24, que muestran los espectros de emisión, registrados con excitación a 490 nm, de disoluciones acuosas de TG-I y TG-II respectivamente, a concentraciones de tampón fosfato crecientes y a un valor de pH constante de 6.78.



**Figura III-24.** (a) Espectros de emisión en estado estacionario ( $\lambda_{ex} = 490$  nm), normalizados por la absorbancia, de  $6 \times 10^{-6}$  M de disoluciones acuosas de TG-I a diferentes concentraciones de tampón fosfato: de 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 y 1 M y valor de pH de 6.78. (b) Espectros de emisión en estado estacionario ( $\lambda_{ex} = 490$  nm), normalizados por la absorbancia, de  $4 \times 10^{-6}$  M de disoluciones acuosas de TG-I a diferentes concentraciones de tampón fosfato: de 0.02, 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 0.6 y 1 M y valor de pH de 6.78.

A la longitud de onda de excitación utilizada (490 nm), la absorbancia de la especie aniónica es mayor que la de la especie neutra, así mismo, al valor de pH del experimento (6.78) la relación neutro/anión en el estado fundamental es menor de uno. Por lo tanto, estas condiciones experimentales permiten la excitación preferente de la especie aniónica. Dado que la especie neutra casi no emite, la señal fluorescente se debe exclusivamente a la especie aniónica. Por lo tanto, el descenso producido al añadir el tampón fosfato en los resultados experimentales, nos indica que la reacción de transferencia protónica en el estado excitado mediada por tampón ocurre, produciendo la desaparición de la especie aniónica (disminución de la concentración de la forma fluorescente en el estado excitado), transformándose en su lugar la especie neutra (aumentando la concentración de la forma no fluorescente en el estado excitado).

Los efectos descritos en el párrafo precedente son consistentes con la aparición de una reacción en el estado excitado mediada por la presencia de un aceptor/dador protónico. Así, la excitación preferente de la especie aniónica produce una alta concentración 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 de equilibrio neutro-anión en el estado excitado.

Aunque estos experimentos demuestran convincentemente que se produce una reacción de transferencia protónica entre las especies neutra y aniónica del TG-I y del TG-II, no permiten la evaluación del valor del  $pK_a^*$ . Para esto, se deben realizar otra serie de experimentos que se detallan en la siguiente sección.

III.5.2. Cálculo de  $pK_a^*$  de la reacción neutro/anión, mediada por la presencia de un aceptor/dador protónico.

En investigaciones anteriores, se ha demostrado que la excitación preferente de la forma menos fluorescente de la fluoresceína (Álvarez-Pez *et al.*, 2001) y algunos de sus derivados tales como el Oregon Green 488 (Orte *et al.*, 2005a) a un valor de pH por debajo del valor del  $pK_a$  del estado fundamental en presencia de un aceptor/dador de protones adecuado produce un aumento de la intensidad de fluorescencia debida a la reacción de transferencia protónica en el estado excitado, que promueve la formación de la especie dianiónica, más fluorescente. Por el contrario, los experimentos realizados con los Tokyo Green nos muestran un sistema diferente, donde la especie más fluorescente es preferentemente excitada, teniendo lugar la reacción en el estado excitado mediada por el aceptor/dador de protones y formándose la especie no fluorescente.

Para determinar cuantitativamente el valor del  $pK_a$  del estado excitado ( $pK_a^*$ ) se han recogido los espectros de fluorescencia, a diferentes longitudes de onda de excitación, de disoluciones acuosas de TG-I ( $\lambda_{ex} = 440, 460$  y  $490$  nm;  $\lambda_{em} = 515$  nm) y TG-II ( $\lambda_{ex} = 440, 460$  y  $490$  nm;  $\lambda_{em} = 505, 515$  y  $535$  nm) en presencia de tampón fosfato 1 M, a distintos valores de pH comprendidos en el intervalo de 5.50 y 9.00 para la experiencia con el TG-I y 4.00 y 9.00 para la del TG-II. En base de los anteriores experimentos descritos, esta concentración de fosfato es suficientemente alta para promover una rápida reacción en el estado excitado, ya que los efectos del tampón sobre la intensidad de fluorescencia saturan a concentraciones de 1 M. Por otra parte, el margen de valor de pH resulta muy adecuado, ya que, en este intervalo nos encontramos en el medio la presencia sólo de las especies neutra y aniónica, obteniendo por lo tanto un modelo de dos estados excitados, lo que a su vez, simplifica la ecuación que se deriva de tal modelo. Bajo estas condiciones, la intensidad de fluorescencia no

depende de la especie protónica que ha sido excitada preferentemente, ya que asumiremos que durante el tiempo de vida de los estados excitados las concentraciones de las diferentes especies prototrópicas se reajustan según dicte el valor del  $pK_a^*$ , eliminando todos los efectos debidos a la excitación preferente de alguna de las especies y originando una emisión acoplada de las dos especies excitadas. Según este modelo, la intensidad de fluorescencia se relaciona con los valores de pH y  $pK_a^*$  mediante la expresión (Yguerabide *et al.*, 1994):

$$I = \frac{A\phi_N}{1 + 10^{(pH - pK_a^*)}} + \frac{A\phi_A}{1 + 10^{(pK_a^* - pH)}} \quad (\text{III-22})$$

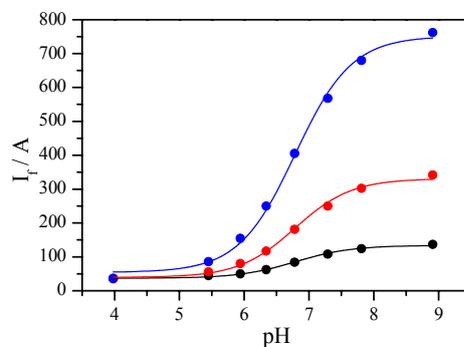
en donde  $A$  es la absorbancia a la longitud de onda de excitación y  $pK_a^*$  es la constante para la reacción de intercambio protónico en el estado excitado  $N^* \rightleftharpoons A^* + H^+$ .  $\phi_A$  y  $\phi_N$  son parámetros proporcionales a las eficiencias relativas de fluorescencia de la especie neutra y aniónica a cada longitud de onda de emisión, ya que incluyen ciertas contribuciones instrumentales. La ecuación III-15 supone la condición de equilibrio para las especies  $N^*$  y  $A^*$ .

Para la serie de ajustes realizados, la ecuación III-22 fue ligeramente modificada, pasando la absorbancia experimental al primer miembro, de forma que la variable dependiente fue el cociente  $I_F/A$ , donde  $I_F$  es la intensidad de fluorescencia recogida, y  $A$  las absorbancias experimentales de las disoluciones a las distintas longitudes de onda de excitación. Así, la ecuación III-16 se ajustó a los datos experimentales de forma simultánea (global), mediante un algoritmo no lineal de mínimos cuadrados.

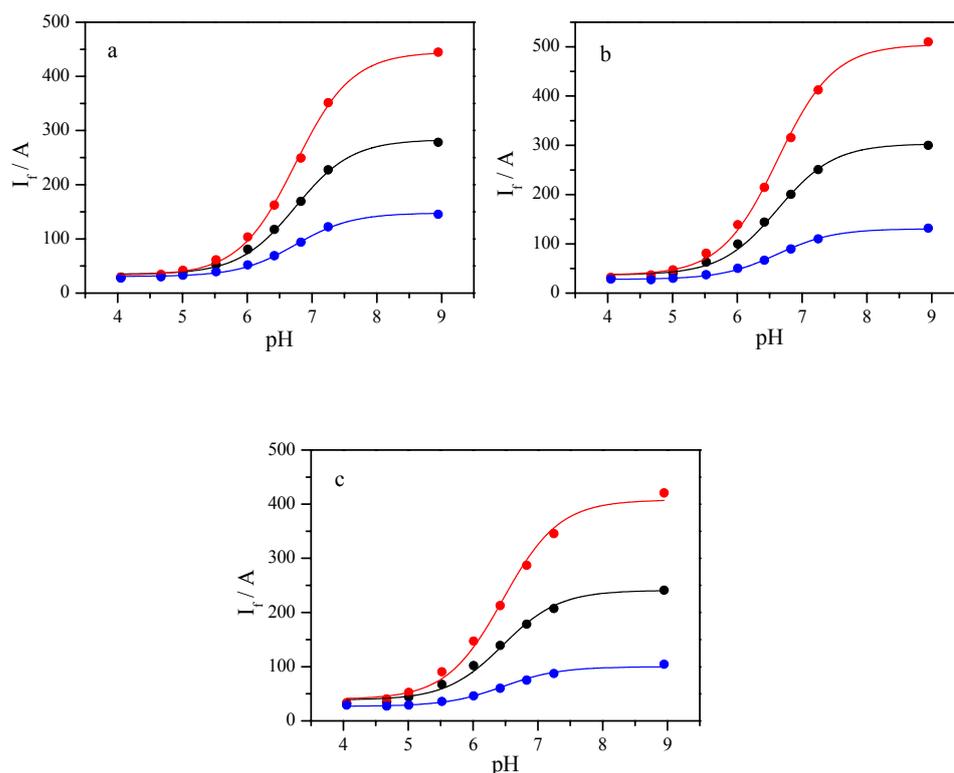
$$\frac{I_F}{A} = \frac{\phi_N}{1 + 10^{(pH - pK_a^*)}} + \frac{\phi_A}{1 + 10^{(pK_a^* - pH)}} \quad (\text{III-23})$$

En el citado ajuste se consideran como parámetros ajustables locales los valores de  $\phi_N$  y  $\phi_A$ , mientras que el valor de  $pK_a^*$  fue un parámetro de ajuste

ligado en todas las curvas  $I_f/A$  vs pH. Los valores obtenidos para los  $pK_a^*$  fueron:  $6.78 \pm 0.02$  para el TG-I y de  $6.46 \pm 0.30$  para el TG-II. En las figuras III-25 y III-26 se muestran las representaciones de estos ajustes globales.



**Figura III-25.** Intensidad de fluorescencia en estado estacionario de los resultados experimentales normalizada con la absorbancia ( $\lambda_{ex} = 440$  nm (—),  $\lambda_{ex} = 460$  nm (—) y  $\lambda_{ex} = 490$  nm (—).  $\lambda_{em} = 515$  nm) vs pH de disoluciones de  $4 \times 10^{-6}$  de TG-I y 1.00 M de tampón fosfato. Las líneas representan las mejores curvas de ajuste de la ecuación III-23 a los datos experimentales.



**Figura III-26.** Ajuste de la ecuación III-16 con los datos experimentales de  $I_f/A$  en presencia de tampón fosfato 1 M. Se muestran las curvas a las longitudes de onda de excitación: **a)** 440 nm **b)** 460 nm y **c)** 490 nm, y a las longitudes de onda de emisión de 505 (—), 515 (—) y 535 (—) nm.

Los cocientes de las eficiencias relativas de las especies neutra y aniónica,  $\phi_N/\phi_A$ , a la longitud de onda de 515 nm, fueron, para el TG-I:  $0.08 \pm 0.01$  y para el TG-II:  $0.07 \pm 0.01$ . 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  $\phi_N/\phi_A$  se puede considerar de cierto interés fotofísico para el empleo de estos fluoróforos, ya que da una idea de la alta eficiencia fluorescente de las especies aniónicas sobre las formas neutras. Además, estos valores están en buena concordancia

con los obtenidos en el apartado III.3 (Tabla III-5) para medidas de fluorescencia en estado estacionario en ausencia de reacción en estado excitado.

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 producen reacciones de transferencia protónica en el estado excitado entre las especies aniónicas y neutras del TG-I y del TG-II, lo suficientemente rápidas, cuando en el medio se encuentra una concentración apropiada de un aceptor/dador protónico adecuado, como para que ocurran durante el tiempo de vida de los estados excitados de las especies implicadas.

**III.6. SISTEMA BICOMPARTIMENTAL  $N^* \rightleftharpoons A^*$  EN AUSENCIA Y PRESENCIA DE TAMPÓN FOSFATO 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, la técnica TCSPC para resolver cinéticas de procesos en el estado excitado. Asimismo, la aplicación del Análisis Global Compartimental (GCA) 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; Böens et al., 1996, 2000*)

Por otra parte, y como se ha establecido en los apartados anteriores, en el intervalo de valores de pH en donde coexisten en equilibrio (en el estado fundamental) las especies neutra y aniónica del TG-I y del TG-II, 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 estas características, se comenzará el estudio cinético de las reacciones en el estado excitado entre las diversas especies prototrópicas de ambos colorantes en disolución acuosa, en el intervalo de valores de pH donde existen las especies neutra y aniónica, en el estado fundamental y en el excitado. Se realizará así el estudio de un proceso de transferencia protónica en el estado excitado mediado por un aceptor/dador de protones mediante Análisis Global Compartimental.

Este modelo se basa en el descrito en la sección II.2.6 de *Materiales y Métodos*, donde se describe la teoría general y ecuaciones generales que se

aplicarán, así como las condiciones para la identificabilidad del sistema compartimental estudiado.

III.6.1. Análisis global del sistema  $N^* \rightleftharpoons A^*$  en ausencia de aceptor/dador de protones.

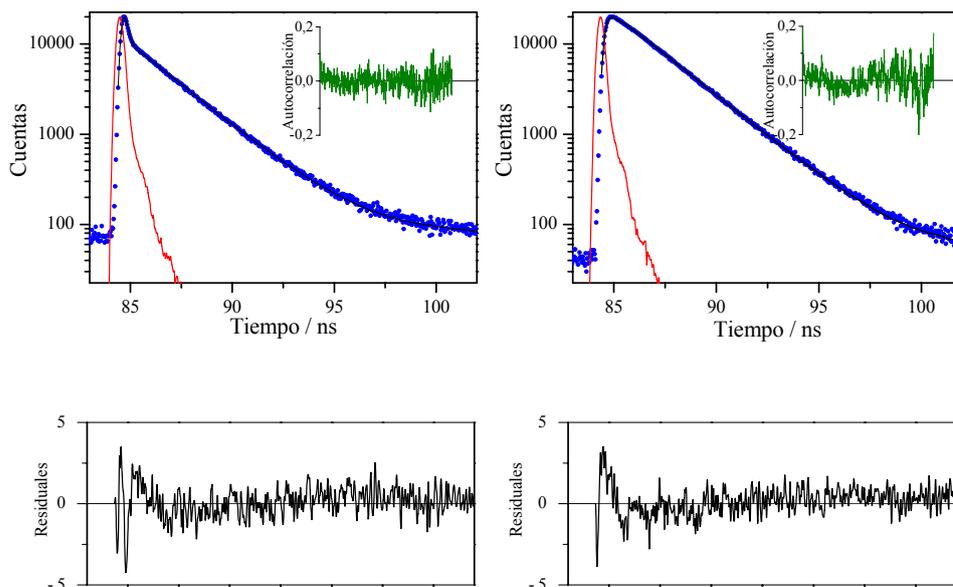
Con el objeto de conocer la cinética de los TGs, se recogieron los decaimientos de fluorescencia de disoluciones acuosas de TG-I ( $6 \times 10^{-6}$  M) y TG-II ( $4 \times 10^{-6}$  M), en un rango de pH, entre 4.85 y 9.88, y 4.50 y 10.26, respectivamente y en ausencia de aceptor/dador protónico. La longitud de onda de excitación fue de 488 nm, donde se excita fundamentalmente a la especie aniónica, mientras que las longitudes de onda de emisión fueron de 505, 515 y 535 nm, en las cuales se recoge la emisión de ambas especies, neutra y aniónica, aunque la eficiencia relativa de fluorescencia es mucho mayor para la especie aniónica. Se recogieron tres decaimientos para cada longitud de onda de emisión con 20,000 cuentas en el máximo, siguiendo la metodología descrita en la sección *Materiales y Métodos*.

Como paso previo al análisis global de los decaimientos obtenidos, se examinaron los decaimientos con de manera individual, en términos de tiempos de decaimiento,  $\tau_i$ , con sus factores preexponenciales asociados  $p_i$ . Con este sencillo análisis, se pretende averiguar, tanto los términos exponenciales necesarios para el correcto análisis de los decaimientos, como la calidad de los decaimientos experimentales realizados. Ambos compuestos mostraron ajustes biexponenciales para aquellos decaimientos con valores de pH por debajo de 6.00, mientras que aquellos realizados a valores de pH mayores de 6.00 presentaron un ajuste monoexponencial, manteniendo su tiempo de decaimiento invariante a cualquier valor de pH.

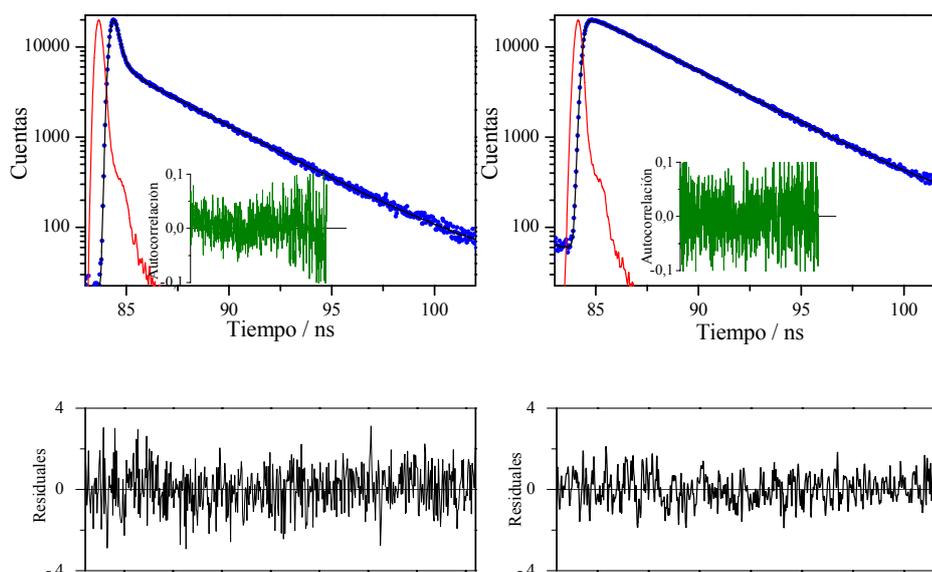
Posteriormente se realizó un análisis global mediante métodos de reconvolución iterativa basados en el algoritmo de Marquardt y se ligaron como

parámetros comunes los tiempos de decaimiento de fluorescencia,  $\tau_i$ , para todas las curvas analizadas, mientras que los factores preexponenciales se dejaron como parámetros independientes en cada decaimiento.

La Figuras III-27 III-28 muestran respectivamente algunos de los decaimientos obtenidos para el TG-I y TG-II junto a los residuales y las funciones de autocorrelación obtenidas.



**Figura III-27.** Decaimientos de fluorescencia ajustados mediante análisis global de disoluciones de TG-I  $6 \times 10^{-6}$  M en ausencia de tampón. En las gráficas se pueden observar el perfil de la fuente de excitación (—), el decaimiento experimental (●), la función de ajuste por reconvolución iterativa (—), los residuales (—) y la función de autocorrelación (—).  $\lambda^{ex} = 488$  nm  $\lambda^{em} = 515$  nm **a)** pH = 4.85. **b)** pH = 9.88.



**Figura III-28.** Decaimientos de fluorescencia ajustados mediante análisis global de disoluciones de TG-II  $4 \times 10^{-6}$  M en ausencia de tampón. En las gráficas se pueden observar el perfil de la fuente de excitación (—), el decaimiento experimental (●), la función de ajuste por reconvolución iterativa(—), los residuales (—) y la función de autocorrelación (—).  $\lambda^{ex} = 488$  nm  $\lambda^{em} = 515$  nm **a)** pH = 4.50. **b)** pH = 10.26.

En ausencia de tampón se realizaron, 45 decaimientos para el TG-I y 108 para el TG-II. La característica más destacable en ambos casos, es la desaparición del tiempo de vida corto a valores de pH por encima de 6.00. Este hecho se debe a que, en ausencia de un aceptor/dador de protones, la reacción de transferencia protónica en el estado excitado no tiene lugar, por lo tanto, la especie neutra y la aniónica no se acoplan y decaen independientemente uno del otro, lo que unido al mayor rendimiento cuántico de la especie aniónica y la excitación preferente de esta a 488 nm, hace que sólo se observe esta especie. A valores de pH bajos, las concentraciones en el estado fundamental de la especie neutra es mucho mas elevada que la de la especie aniónica, lo que conlleva que se pueda recuperar en el análisis su tiempo de vida.

En las tablas III-10 y III-11 se recogen algunos de los valores de los tiempos de vida y la media de los factores pre-exponenciales recuperados en el análisis global a cada longitud de onda de emisión, junto a los parámetros estadísticos de los ajustes, para cada valor de pH. Como se puede observar, para el TG-I los valores de  $\chi^2$  son todos inferiores a 1.193 y para el TG-II los son inferiores a 1.211, indicando que los ajustes fueron muy aceptables.

**Tabla III-10.** Resultados de los análisis globales de los decaimientos de fluorescencia de disoluciones acuosas de TG-I  $6 \times 10^{-6}$  M en ausencia de un aceptor/dador protónico. Se ha representado el valor medio de los parámetros pre-exponenciales obtenidos a cada longitud de onda de emisión (505, 515 y 535 nm).

pH	$\tau_1$ (ns)	$\tau_2$ (ns)	$p_1$	$p_2$	$\chi^2_{\text{global}}$
4.85	0.062	2.375	0.45	0.55	1.175
			0.31	0.69	
			0.31	0.69	
5.09	0.081	2.374	0.31	0.69	1.113
			0.24	0.76	
			0.31	0.69	
5.93	0.091	2.39	0.47	0.53	1.193
			0.42	0.58	
			0.36	0.64	
6.40	--	2.38	--	1	1.135
			--	1	
			--	1	
6.70	--	2.38	--	1	1.085
			--	1	
			--	1	
7.61	--	2.38	--	1	1.126
			--	1	
			--	1	
9.88	--	2.37	--	1	1.126
			--	1	
			--	1	

**Tabla III-11.** Resultados de los análisis globales de los decaimientos de fluorescencia de disoluciones acuosas de TG-II  $4 \times 10^{-6}$  M en ausencia de un aceptor/dador protónico. Se ha representado el valor medio de los parámetros pre-exponenciales obtenidos a cada longitud de onda de emisión (505, 515 y 535 nm).

pH	$\tau_1$ (ns)	$\tau_2$ (ns)	$p_1$	$p_2$	$\chi^2_{\text{global}}$
4.50	0.198	3.638	0.86	0.14	1.192
			0.86	0.14	
			0.92	0.08	
5.43	0.209	3.679	0.28	0.72	1.127
			0.28	0.72	
			0.47	0.53	
5.87	0.212	3.671	0.43	0.57	1.211
			0.27	0.73	
			0.42	0.58	
6.20	--	3.684	--	1	1.108
			--	1	
			--	1	
6.36	--	3.684	--	1	1.145
			--	1	
			--	1	
7.03		3.701	--	1	1.093
			--	1	
			--	1	
7.45		3.705	--	1	1.122
			--	1	
			--	1	
9.63		3.704	--	1	1.103
			--	1	
			--	1	

Estos tiempos de vida presentan una variación despreciable con el valor de pH y corresponden, respectivamente, a los tiempos de vida de la especie neutra y aniónica en el estado excitado en ausencia de cualquier proceso que ocurra en dicho estado. Los coeficientes pre-exponenciales  $p_1$  y  $p_2$  dependen del valor de pH y están determinados esencialmente por los coeficientes de extinción molar a  $\lambda^{ex}$ , por las eficiencias relativas de fluorescencia a  $\lambda^{em}$  y por

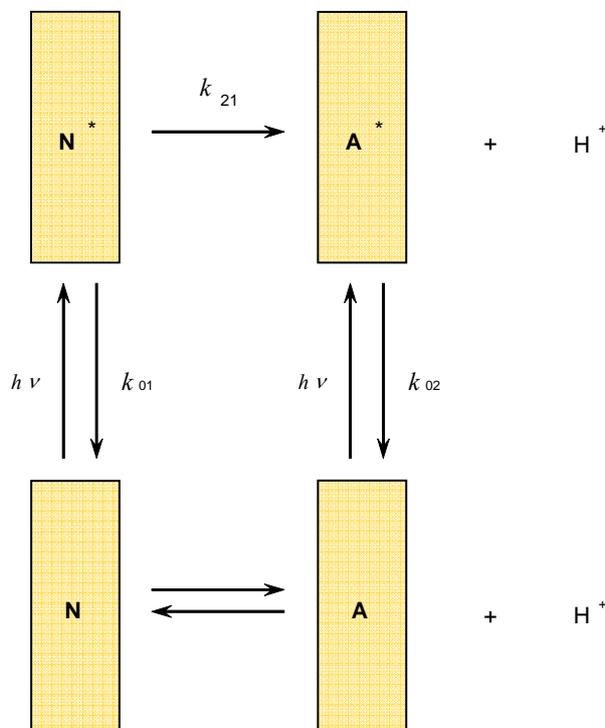
las concentraciones de la especie neutra y aniónica en el estado fundamental. De esta manera, a valores de  $\text{pH} \gg \text{pK}_a$ , la concentración de la forma neutra es insignificante, luego  $p_1$  es cero y la función  $I(t)$  es monoexponencial. Dicha característica se mantiene a valores de  $\text{pH}$  moderados debido al bajo rendimiento cuántico de la especie neutra con respecto al monoanión junto a la excitación preferente de este último. La concentración de protones a estos valores de  $\text{pH}$  es muy baja y aunque la constante de velocidad de la reacción bimolecular de protonación en estado estacionario fuera del orden de magnitud de la constante de difusión, la velocidad de tal reacción no podría competir con la desactivación del estado excitado, por lo que el tiempo de vida puede ser asignado, sin ninguna duda, a la especie aniónica.

A valores de  $\text{pH}$  donde la concentración de la especie neutra es muy elevada aparece una función biexponencial con ambos pre-exponenciales finitos y positivos, aunque el pre-exponencial correspondiente a la especie neutra es menor, tal y como se puede observar en las tablas III-10 y III-11. Como mencionamos en apartados anteriores, las especies neutra de estos colorantes tienen un bajo rendimiento cuántico, lo que dificulta la obtención de los fotones con tiempos de vida cortos (correspondientes a la especie neutra), y provoca que los preexponenciales recuperados en el análisis sean menores que aquellos esperados por la teoría del equilibrio químico.

Un análisis global de todos los decaimientos, obtenidos a cualquier valor de  $\text{pH}$  y longitud de onda de emisión, proporcionó los siguientes valores medios de tiempos de vida para las especies de TG-I:  $\tau_1 = 0.079 \pm 0.004$  ns y  $\tau_2 = 2.36 \pm 0.01$  ns con un parámetro de ajuste de  $\chi_g^2 = 1.04$ ; mientras que para el TG-II fueron:  $\tau_1 = 0.195 \pm 0.003$  ns and  $\tau_2 = 3.71 \pm 0.03$  ns con un  $\chi_g^2$  de 1.25.

Tal y como se ha demostrado anteriormente en estudios con fluoresceína (Ballesteros *et al.*, 1998) y Oregon Green 488 (Orte *et al.* 2005a) cuando la concentración de protones en el medio es muy baja, a  $\text{pH}$  cercanos a

la neutralidad, en el esquema III-4 debemos considerar sólo la reacción de desprotonación unimolecular en el estado excitado,  $k_{21}$ , mientras que la reacción de reprotonación bimolecular puede despreciarse, ya que su constante cinética  $k_{12}$  se encuentra multiplicada por la concentración protónica, haciendo la reacción suficientemente lenta como para no poder competir con la desactivación del estado excitado. Considerando así el esquema cinético, la solución del sistema de ecuaciones diferenciales predice decaimientos biexponenciales, donde el tiempo  $\tau_1$  corresponde a la inversa de la suma de las constantes  $k_{01} + k_{21}$ , mientras que el tiempo de decaimiento  $\tau_2$  corresponde a la inversa de  $k_{02}$ .



**Esquema III-4.** Modelo de reacción cinética entre las especies neutra ( $N$ ) y aniónica ( $A$ ) del TG-I o del TG-II, a baja concentración de aceptor/dador protónico y a valores de pH cercanos a la neutralidad.

En la tabla III-12 se recogen los valores de  $k_{02}$  y para la suma de las constantes ( $k_{01} + k_{21}$ ) a partir de los datos obtenidos en el análisis global de los decaimientos de fluorescencia en ausencia de un aceptor/dador de protones, para el TG-I y el TG-II.

**Tabla III-12.** Valores recuperados para las constantes cinéticas  $k_{02}$  y ( $k_{01} + k_{21}$ ) a partir de los datos obtenidos en el análisis global de los decaimientos de fluorescencia en ausencia de un aceptor/dador de protones

	TG-I	TG-II
$(k_{01} + k_{21}) \text{ s}^{-1}$	$1.29 \times 10^{10}$	$5.2 \times 10^9$
$(k_{02}) \text{ s}^{-1}$	$4.21 \times 10^8$	$2.7 \times 10^8$

III.6.2. Análisis global del sistema  $N^* \rightleftharpoons A^*$  en presencia de aceptor/dador de protones.

Con la adición de un aceptor/dador protónico adecuado, como es el tampón fosfato, se promueve la reacción de transferencia protónica en el estado excitado (ESPT) (*Álvarez-Pez et al. 2001*). Si esta reacción se hace más rápida que los tiempos de fluorescencia de los colorantes, se modifica la proporción de las especies prototrópicas en el estado excitado, y por tanto, se obtienen cambios en los tiempos de vida de fluorescencia dependientes del pH.

Con el objetivo de minimizar la influencia de la fuerza iónica en la constante de acidez aparente de los colorantes, el estudio cinético se ha realizado sin llegar a concentraciones de tampón muy elevadas. Al igual que en el apartado anterior se han recogido decaimientos de fluorescencia de disoluciones acuosas de TG-I a  $6 \times 10^{-6}$  M y TG-II a  $4 \times 10^{-6}$  M, en un rango de valores de pH entre 4.85 y 10.50 con concentraciones de tampón fosfato de 0.02

M, 0.10 M y 0.25 M para el TG-I y de 0.02, 0.05, 0.10, 0.20, 0.30 y 0.40 M para el TG-II. Se recogieron tres decaimientos a cada longitud de onda de emisión registrada (505, 515 y 535 nm), mientras que la longitud de onda de excitación fue de 488 nm.

Al igual que en el apartado anterior se ha realizado el análisis de los decaimientos de manera individual, en términos de tiempos de decaimiento,  $\tau_i$ , con sus factores preexponenciales asociados  $p_i$ , ( $i = 1, 2$ ), con el objeto de averiguar, tanto los términos exponenciales necesarios para el correcto análisis de los decaimientos, como la calidad de los mismos. Para las muestras de TG-I, solamente aquellas muestras con bajas concentraciones de fosfato (menores que 0.25 M) y valores de pH por debajo de 6.12 fueron biexponenciales, mientras que si se aumenta el valor de pH y/o la concentración de tampón, el resultado es un ajuste monoexponencial. Los resultados obtenidos para el TG-II fueron muy similares; para obtener decaimientos biexponenciales se necesitan bajas concentraciones de fosfato (por debajo de 0.20 M) y valores de pH por debajo de 6.10.

Una vez realizado el análisis individual y desechar aquellos decaimientos de dudosa calidad, se realizó un análisis global clásico en términos de  $\tau_i$  y de  $p_i$ , ajustando globalmente, aquellos decaimientos de fluorescencia recogidos, para una misma disolución, a igual valor de pH, concentración de tampón y a todas las diferentes longitudes de onda de emisión ( $\lambda^{em}$ ). 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 fluorescencia,  $\tau_i$ , de las curvas analizadas, mientras que los factores preexponenciales, se dejaron como parámetros independientes en cada decaimiento. Las tablas III-13 y III-14 muestran algunos de los valores experimentales de  $\tau_1$  y  $\tau_2$  obtenidos, para diferentes valores de pH y distinta concentración de tampón fosfato. Estos

tiempos de vida son dependientes del valor de pH, lo que apoya la presencia de reacciones en el estado excitado.

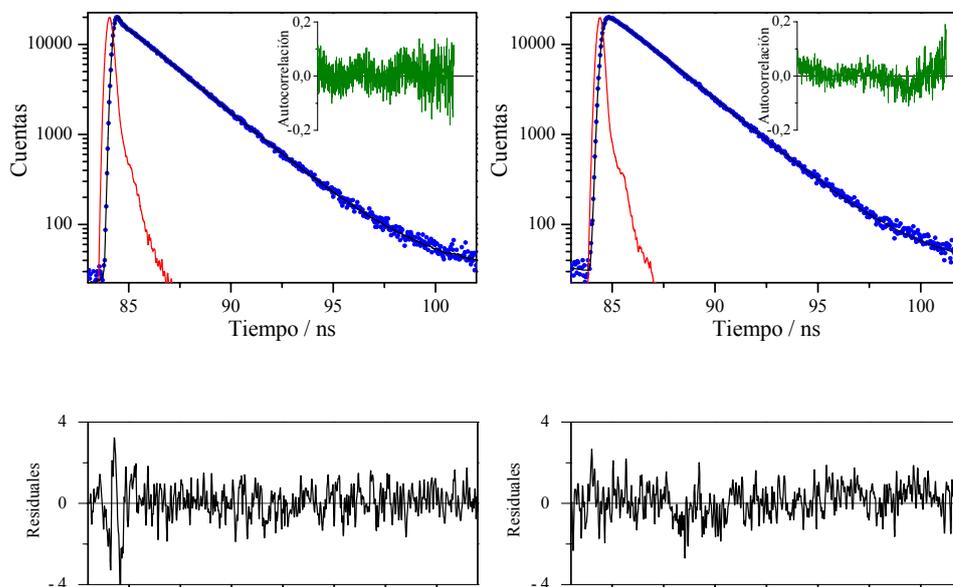
**Tabla III-13.** Resultados de los análisis globales de los decaimientos de fluorescencia de disoluciones acuosas de TG-I  $6 \times 10^{-6}$  M en presencia de un aceptor/dador protónico. Se ha representado el valor medio de los parámetros pre-exponenciales obtenidos a cada longitud de onda de emisión (505, 515 y 535 nm).

$C^B$	pH	$\tau_1$ (ns)	$\tau_2$ (ns)	$p_1$	$p_2$	$\chi^2_{\text{global}}$
0.02	5.09	0.04	2.29	0.88	0.12	1.179
				0.83	0.17	
				0.90	0.10	
	7.00	--	2.31	--	1	1.128
				--	1	
				--	1	
	8.99	--	2.32	--	1	1.113
				--	1	
				--	1	
0.1	4.57	0.06	2.08	0.76	0.24	1.146
				0.74	0.26	
				0.80	0.20	
	6.57	--	2.14	--	1	1.104
				--	1	
				--	1	
	9.20	--	2.30	--	1	1.161
				--	1	
				--	1	
0.25	5.99	--	1.87	--	1	1.107
				--	1	
				--	1	
	6.77	--	2.01	--	1	1.095
				--	1	
				--	1	
	9.05	--	2.28	--	1	1.096
				--	1	
				--	1	

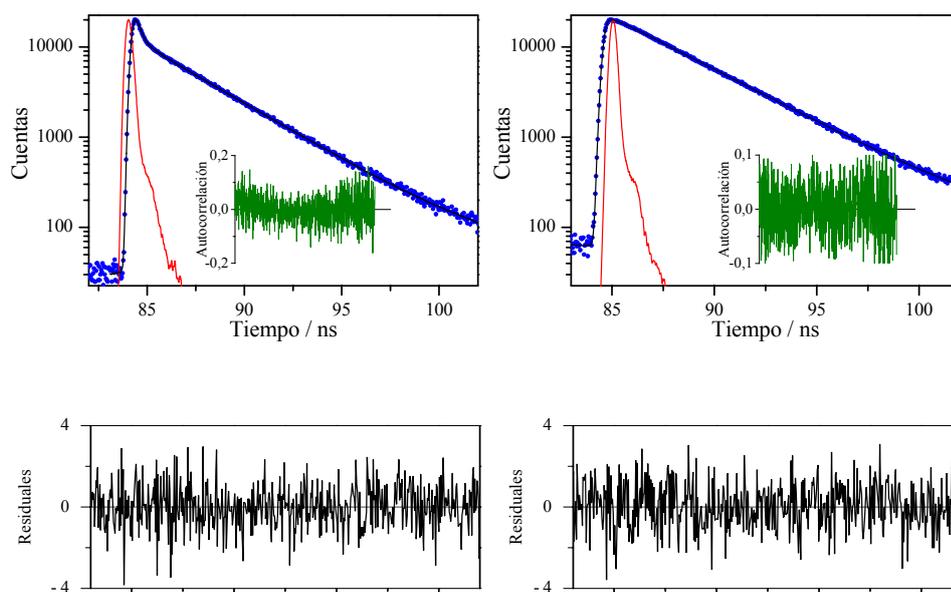
**Tabla III-14.** Resultados de los análisis globales de los decaimientos de fluorescencia de disoluciones acuosas de TG-II  $4 \times 10^{-6}$  M en presencia de un aceptor/dador protónico. Se ha representado el valor medio de los parámetros pre-exponenciales obtenidos a cada longitud de onda de emisión (505, 515 y 535 nm).

$C^B$	pH	$\tau_1$ (ns)	$\tau_2$ (ns)	$p_1$	$p_2$	$\chi^2_{\text{global}}$
0.05	4.86	0.212	3.440	0.66	0.34	1.116
				0.65	0.35	
				0.79	0.21	
	6.76	--	3.576	--	1	1.127
				--	1	
				--	1	
	9.47	--	3.692	--	1	1.099
				--	1	
				--	1	
0.1	5.82	0.327	3.267	0.13	0.87	1.113
				0.10	0.90	
				0.20	0.80	
	7.00	--	3.530	--	1	1.194
				--	1	
				--	1	
	10.50	--	3.695	--	1	1.129
				--	1	
				--	1	
0.2	6.08	--	3.04	--	1	1.100
				--	1	
				--	1	
	7.00	--	3.378	--	1	1.175
				--	1	
				--	1	
	10.10	--	3.667	--	1	1.166
				--	1	
				--	1	

Las figuras III-29 y III-30 muestran el análisis de algunos de los decaimientos obtenidos en presencia de tampón fosfato.



**Figura III-29.** Decaimientos de fluorescencia ajustados mediante análisis global de disoluciones de TG-I  $6 \times 10^{-6}$  M en presencia de tampón (0.02 M). En las gráficas se pueden observar el perfil de la fuente de excitación (—), el decaimiento experimental (●), la función de ajuste por reconvolución iterativa(—), los residuales (—) y la función de autocorrelación (—).  $\lambda^{ex} = 488$  nm  $\lambda^{em} = 515$  nm **a)** pH = 5.09. **b)** pH = 8.99.



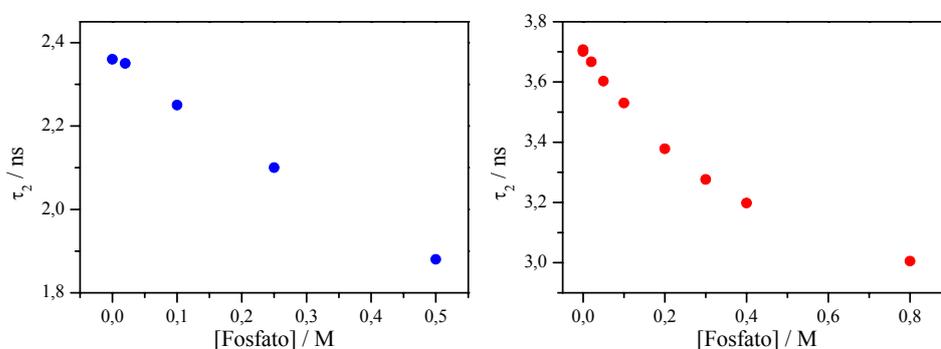
**Figura III-30.** Decaimientos de fluorescencia ajustados mediante análisis global de disoluciones de TG-II  $4 \times 10^{-6}$  M en presencia de tampón (0.05 M). En las gráficas se pueden observar el perfil de la fuente de excitación (—), el decaimiento experimental (●), la función de ajuste por reconvolución iterativa(—), los residuales (—) y la función de autocorrelación (—).  $\lambda^{ex} = 488$  nm  $\lambda^{em} = 515$  nm **a)** pH = 4.86. **b)** pH = 9.47.

Las características más destacables observadas son la presencia de dos tiempos de fluorescencia, donde el tiempo de vida más corto desaparece a valores de pH superiores a 6.12 y 6.10 para el TG-I y el TG-II respectivamente. Sin embargo, la desaparición del tiempo de decaimiento corto representa una ventaja si son usados como sensores fluorescentes en valores de pH cercanos al fisiológico ya que presentarían un único tiempo de vida, haciendo más sencilla la interpretación de cualquier cambio en el ambiente que pueda influir sobre los fluoróforos.

A un valor de pH constante, la adición de tampón fosfato repercute en la disminución del tiempo de vida largo, lo que corresponde con un proceso en el

estado excitado mediante el cual desaparece la especie más fluorescente (A) para formar la especie menos fluorescente (N). Esto último, junto con la característica de que la especie neutra casi no fluoresce, lo que implica la aparición de decaimientos monoexponenciales permite el uso de estos fluoróforos como sondas on/off.

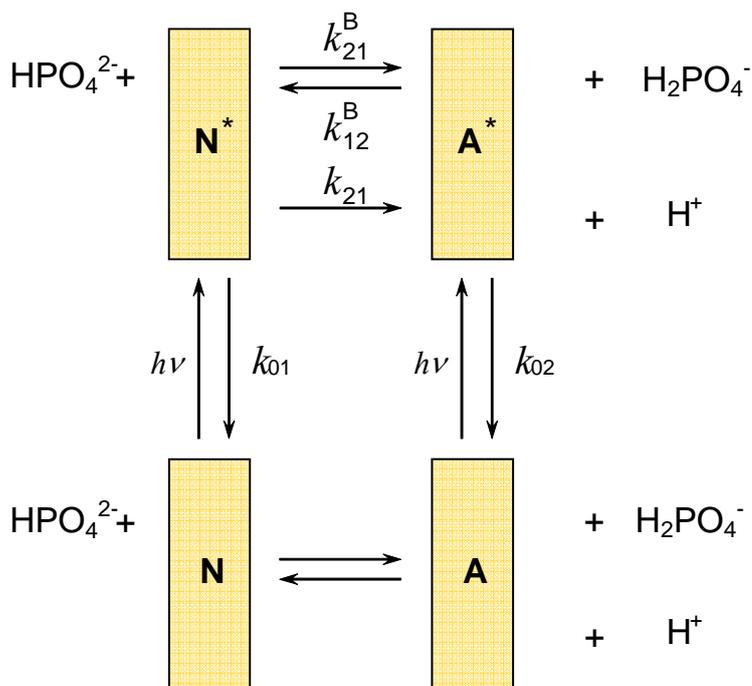
Una muestra de la sensibilidad de nuestros colorantes se puede apreciar en la figura III-31 donde se muestran el descenso del tiempo de vida tanto del TG-I como del TG-II a valor de pH =7.00, con la adición de concentraciones de tampón cada vez mas elevadas.



**Figura III-31.** Representación del tiempo de decaimiento largo de los colorantes obtenidos mediante análisis global monoexponencial de los decaimientos de fluorescencia a valor de pH de 7.00 de disoluciones acuosas de: **a)** TG-I  $6 \times 10^{-6}$  M (●) y **b)** TG-II  $4 \times 10^{-6}$  M (●).

III.6.3. Análisis global bicompartimental.

Los experimentos de fluorescencia en estado estacionario de nuestros colorantes en presencia de diferentes concentraciones de tampón fosfato, en los que aparece una disminución en la intensidad de fluorescencia con la adición del tampón, sugirieron la presencia de una reacción de transferencia protónica en estado excitado facilitada por las especies del tampón y que parece corresponder a un modelo de reacción en dos estados excitados como el que se muestra en el esquema II-1. En este modelo, las especies  $I^*$  y  $2^*$  son respectivamente, las especies neutra y aniónica del TG-I o del TG-II; mientras que las formas prototrópicas del tampón,  $HR$  y  $R$ , son, respectivamente, las formas  $H_2PO_4^-$  y  $HPO_4^{2-}$ . Así el esquema general II-1 aplicado al caso que ocupa este apartado se transforma en el esquema III-5.



**Esquema III-5.-** Modelo compartimental de reacción de transferencia protónica en el estado excitado entre las especies neutra ( $N$ ) y aniónica ( $A$ ) del TG-I o del TG-II promovida por el sistema tampón fosfato.

Como se ha descrito en Materiales y Métodos, si el sistema cinético es correcto, la aplicación del análisis global compartimental a la superficie de decaimientos de fluorescencia en función del pH, concentración de buffer  $C^{buff}$ , y longitudes de onda de excitación y emisión permite la obtención de las constantes cinéticas de las reacciones en estado excitado ( $k_{21}$ ,  $k_{21}^B$  y  $k_{12}^B$ ), las constantes de emisión de fluorescencia de cada especie ( $k_{01}$  y  $k_{02}$ ), y los parámetros de excitación ( $\tilde{b}$ ) y de emisión ( $\tilde{c}$ ). El análisis permitirá obtener valores únicos de los parámetros de ajuste siempre y cuando la superficie de decaimientos cumpla las condiciones de identificabilidad del sistema. Estas son al menos dos valores de pH diferentes, y dos concentraciones de tampón distintas. 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 compartimental en presencia de las especies de un aceptor/dador de protones con los decaimientos adquiridos en ausencia de tampón. Es 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 I.4.4 (en condiciones tales en las que pueda considerarse despreciable la reprotonación en el estado excitado,  $k_{12}[H^+] \approx 0$ ). Aunque se han empleado diferentes concentraciones de tampón, los decaimientos en ausencia del mismo dan la posibilidad de disponer de forma separada de los valores de  $k_{02}$ , en decaimientos a valores de pH muy básicos, y de  $k_{01} + k_{12}$  en decaimientos biexponenciales lo que permite llegar a valores únicos en términos de constantes cinéticas  $k_{ij}$ . Por otro lado, las condiciones de identificabilidad para  $\tilde{b}$  y  $\tilde{c}$  no se alcanzan estrictamente ya que los decaimientos en ausencia de tampón no se encuentran al mismo valor de pH que los decaimientos con aceptor/dador protónico. Sin embargo, los valores teóricos de  $\tilde{b}$  son accesibles a través de los resultados absorciométricos obtenidos en la sección III.2 con las ecuaciones II-8.

Consecuentemente, si los valores de  $\tilde{b}$  son conocidos, los de  $\tilde{c}$  quedarán determinados, y tendrán valores únicos.

La superficie de decaimientos de fluorescencia que se analizará en esta sección, mediante el análisis global compartimental, es la unificación de las dos superficies tratadas en las secciones III.6.1 y III.6.2. De esta forma se juntan, como primer paso en un mismo análisis, los decaimientos de fluorescencia de disoluciones acuosas de TG-I ( $6 \times 10^{-6}$  M) o de TG-II ( $4 \times 10^{-6}$  M) recogidos en ausencia de tampón fosfato (a diferentes valores de pH entre 4.85 y 9.88 y entre 4.50 y 10.26, respectivamente, y con longitud de onda de excitación a 488 nm y de emisiones a 505, 515 y 535 nm) y los decaimientos de disoluciones TG-I ( $6 \times 10^{-6}$  M) o de TG-II ( $4 \times 10^{-6}$  M) en presencia de distintas concentraciones de tampón fosfato, a iguales longitudes de onda de excitación y emisiones.

Se ligaron los parámetros  $k_{01}$ ,  $k_{02}$ ,  $k_{21}$ ,  $k_{12}^B$ ,  $k_{21}^B$ ,  $\tilde{b}_1$  y  $\tilde{c}_1$  según el esquema II-2, es decir, se ligaron para toda la superficie de decaimientos las constantes de velocidad  $k_{0i}$  y  $k_{ij}$ , mientras que las constantes  $k_{12}^B$  y  $k_{21}^B$  se ligaron en aquellos decaimientos que se realizaron en presencia de tampón fosfato y se mantuvieron fijos con valor cero, en aquellos decaimientos obtenidos en ausencia de tampón fosfato. 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.

Es conocido que para una buena obtención de todos los parámetros es necesario que los decaimientos utilizados en el análisis tengan un evidente carácter biexponencial y que los tiempos de decaimiento varíen considerablemente en función del valor de pH y de la concentración de tampón. Por tanto se eliminaron del análisis, aquellos decaimientos de naturaleza

monoexponencial con lo que el análisis global compartimental quedó de la siguiente manera:

- Para el TG-I, una superficie de decaimientos de 171 curvas y proporcionando el mejor ajuste del modelo a los datos experimentales un  $\chi^2_r$  global de 1.08. El resto de criterios estadísticos del ajuste, como la representación de los residuales y funciones de autocorrelación también fueron aceptables.
- Para el TG-II, la superficie de decaimientos seleccionada constó de 90 curvas, con un ajuste de  $\chi^2_r$  global de 1.17 y la representación de los residuales y la función de autocorrelación muy aceptables.

Los valores de las constantes de velocidad del sistema, calculadas por medio del análisis global compartimental se recogen en la tabla III-15, mientras que los parámetros de excitación y emisión obtenidos por dicho análisis se recogen en la tabla III-16 y III-17, respectivamente.

**Tabla III-15.** Valores estimados de las constantes de velocidad por análisis global compartimental de la superficie de decaimientos de fluorescencia en disolución acuosa en ausencia (valores de pH entre 4.87 y 9.88 y entre 4.50 y 6.10 para el TG-I y el TG-II respectivamente) y presencia de tampón fosfato (valores de pH entre 5.00 y 9.00 y entre 4.85 y 6.10 para el TG-I y el TG-II respectivamente).

	<b>Tokyo Green-I</b>	<b>Tokyo Green-II</b>
$k_{01} (s^{-1}) \times 10^{-9}$	(12.9 ± 0.3)	(5.2 ± 0.2)
$k_{02} (s^{-1}) \times 10^{-9}$	(0.421 ± 0.003)	(0.271 ± 0.002)
$k_{21} (M^{-1}s^{-1}) \times 10^{-9}$	(0.003 ± 0.003)	(0.011 ± 0.009)
$k_{12}^B (M^{-1}s^{-1}) \times 10^{-9}$	(0.640 ± 0.041)	(0.38 ± 0.01)
$k_{21}^B (M^{-1}s^{-1}) \times 10^{-9}$	(0.0261 ± 0.0053)	(1.8 ± 0.7)

**Tabla III-16.** Parámetros de excitación obtenidos en el análisis global compartimental de la superficie de decaimientos de disoluciones de TG-I y de TG-II en ausencia y presencia de tampón fosfato.

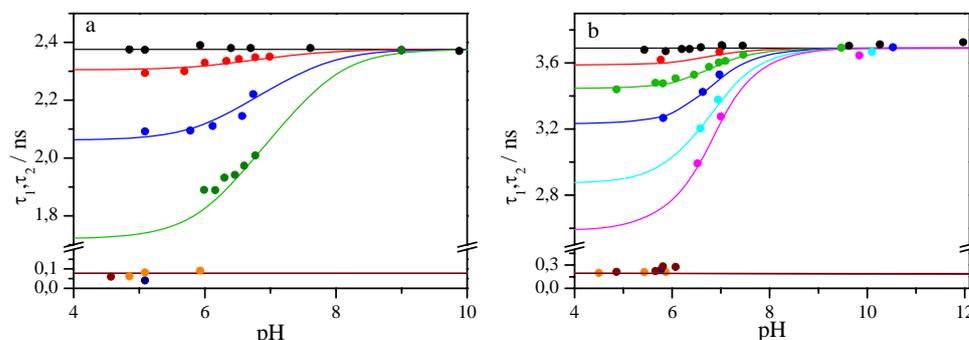
Tokyo Green-I		Tokyo Green-II	
pH	$\tilde{b}_1$	pH	$\tilde{b}_1$
5.09	0.501	4.50	0.992
5.69	0.201	4.86	0.960
5.78	0.201	5.43	0.840
6.00	0.112	5.66	0.795
6.52	0.038	5.80	0.788
6.72	0.025	5.87	0.817
6.99	0.013	6.07	0.600
8.99	0.0001		

**Tabla III-17.** Parámetros de emisión obtenidos en el análisis global compartimental de la superficie de decaimientos de disoluciones de TG-I y de TG-II en ausencia y presencia de tampón fosfato.

Tokyo Green-I		Tokyo Green-II	
$\lambda$ emisión	$\tilde{c}_1$	$\lambda$ emisión	$\tilde{c}_1$
505	0.295	505	0.094
515	0.291	515	0.089
535	0.414	535	0.161

Para comprobar la validez de las constantes de velocidad calculadas, se obtuvieron los tiempos de decaimientos  $\tau_2$  calculados usando los valores de las constantes obtenidas por el análisis global compartimental mostradas en la tabla III-15, en función de la concentración de tampón y valores de pH. Estos tiempos se compararon con los tiempos de decaimiento recuperados a través de los

análisis globales exponenciales correspondientes. La excelente concordancia entre los tiempos de decaimiento calculados y los recuperados mediante dichos ajustes para ambos colorantes se pueden observar en la figura III-32.

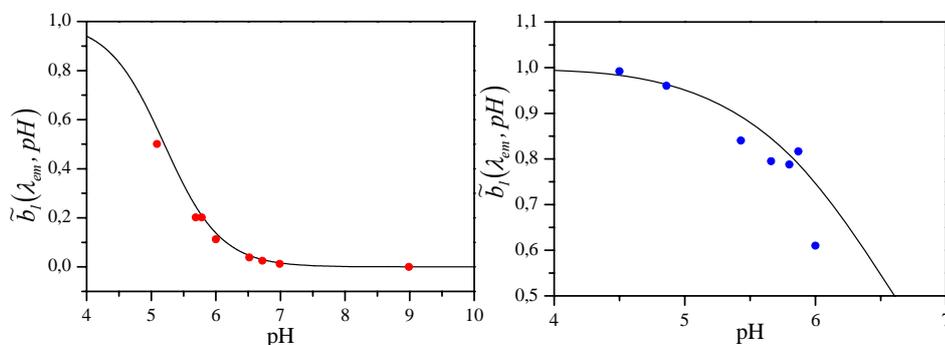


**Figura III-32.** Dependencia del tiempo de decaimiento  $\tau_1$  y  $\tau_2$  al valor de pH y de la concentración de tampón fosfato. La gráfica **a)** muestra los resultados obtenidos para el TG-I a concentraciones de:  $\tau_1$ : (●) 0, (●) 0.02, (●) 0.05 y  $\tau_2$ : (●) 0, (●) 0.02, (●) 0.10 y (●) 0.25 M de tampón fosfato. La gráfica **b)** muestra los resultados para el TG-II a concentraciones de:  $\tau_1$ : (●) 0, (●) 0.02, (●) 0.05 y  $\tau_2$ : (●) 0, (●) 0.02, (●) 0.05, (●) 0.10, (●) 0.20 y (●) 0.30 de tampón fosfato. Se ha obtenido el valor de  $\tau_2$  por análisis global. Los tiempos de decaimientos representados por las líneas rectas se han calculado por las ecuaciones III-13 y III-14 usando las constantes de velocidad de la tabla III-15.

En contraste con las buenas correlaciones entre los tiempos de vida largos del TG-I y del TG-II, para los tiempos de vida cortos no se han podido establecer una buena correlación. Dicha falta de correlación es explicable a partir del bajo valor de  $\tau_1$  y la baja contribución del mismo en la condiciones de nuestro estudio, lo que implica un gran error en la estimación del mismo.

Por otra parte, se representaron los valores de los parámetros de excitación obtenidos mediante absorción y se compararon con los valores de  $\tilde{b}_1$  (absorbancia normalizada de la forma neutra  $I$ ) estimados por análisis global compartimental (figura III-33) en función del valor de pH. Los valores de  $\varepsilon_i$  y

los  $pK_a$  del estado fundamental utilizados para calcular la curva fueron obtenidos en el estudio absorciométrico del TG-I y del TG-II. Se puede observar la excelente concordancia entre los valores recuperados del análisis compartimental y los calculados a través de los datos de absorción.



**Figura III-33.** Valores de los parámetros de absorción normalizados para la forma neutra del TG-I (●), y del TG-II (●) en función del valor de pH. Los puntos representan los valores estimados por el análisis global compartimental. Las curvas corresponden a los valores calculados a partir de la ecuación III-8 y los parámetros recuperados de las medidas de absorción y los  $pK$  calculados en el apartado III-4: 6.04 y 5.97 respectivamente.

En lo que se refiere a la tendencia de los valores de  $\tilde{c}_I$ , en la tabla III-17 se observa que se corresponde con la eficiencia relativa de cada especie a las longitudes de onda estudiadas. Así, para la especie neutra, tiene un aumento de la eficiencia a la longitud de onda de 535 nm debido al hombro que presenta el espectro de emisión de dicha especie a esas longitudes de onda. Aun así, la eficiencia de la especie neutra del TG-II es muy inferiores a la de la especie aniónica, de acuerdo con los valores del cociente  $\phi_N/\phi_A$  obtenidos en apartados anteriores, y demostrando que este sistema puede funcionar como sensor fluorescente on/off. En comparación, los resultados obtenidos demuestran que la eficiencia de la especie neutra del TG-I no resulta tan baja como se esperaba, por lo que este colorante actuaría peor como sonda “on/off”.

### III.7. ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA DE MOLÉCULAS INDIVIDUALES.

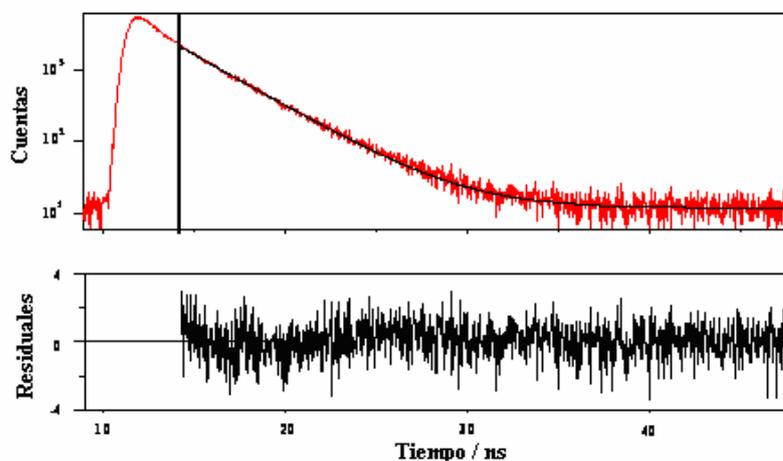
Entre la familia de los colorantes Tokyo Green con características on/off, consideramos el TG-II como el de más interés por su mayor emisión de fluorescencia en forma desprotonada, comparado con el TG-I. Este es el principal motivo por el cual el colorante xanténico TG-II puede ser el más adecuado para su utilización en investigaciones biológicas. De hecho, un compuesto derivado de este fluoróforo, el 2,5-dioxopirrolidin-1-il-4-(3-hidroxi-6-oxo-6H-xanten-9-il)-3-metilbenzoato, ha sido recientemente utilizado marcando restos amina en polinucleótidos sintéticos para detectar la hibridación con la cadena complementaria en ensayos homogéneos (*Crovetto et al, 2008*).

Asimismo, este compuesto reúne las condiciones para su uso en técnicas de espectroscopía de fluorescencia de moléculas individuales, a saber, alto coeficiente de extinción molar a 488 nm, alto rendimiento cuántico de fluorescencia y alta foto-estabilidad. Además los decaimientos de fluorescencia de este fluoróforo presentan carácter monoexponencial, una característica deseable en este tipo de estudios y que no se da en otros colorantes frecuentemente empleados como Cy5 o Alexa Fluor 647. Por todo ello, en el siguiente capítulo se ha estudiado la viabilidad y características del TG-II en técnicas de espectroscopía de fluorescencia de moléculas individuales.

#### III.7.1. Obtención del tiempo de vida fluorescencia del Tokyo Green-II a través de medidas a nivel molecular.

La utilización del microscopio confocal de fluorescencia en modo *TTR* permite tanto la medida de la fluorescencia de moléculas individuales difundiéndose en el volumen de detección, como la reconstrucción de los decaimientos de fluorescencia asociados a los fotones emitidos por estas

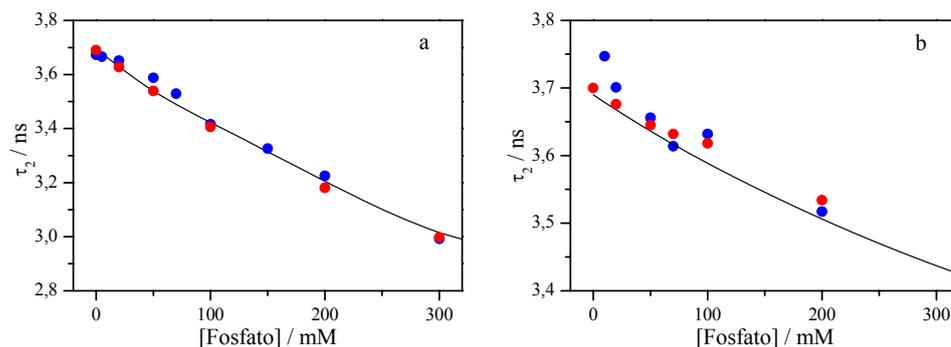
moléculas (detallado en el apartado II.3.8). Así, se reconstruyeron los decaimientos de disoluciones de TG-II, a una concentración de  $1 \times 10^{-9}$  M a distintos valores de pH regulados por una disolución tampón de fosfatos. Los fotones detectados durante 1 hora de medida se sumaron para poder construir los histogramas de decaimiento de fluorescencia. Esos histogramas se ajustaron aplicando un análisis en el que se emplea una ventana temporal en lugar del decaimiento completo para minimizar el efecto de la luz excitatriz dispersada y el ruido de fondo (Krämer et al, 2008; Kapusta et al, 2008). Como ejemplo se muestra uno de los decaimientos construidos en modo *TTTR* junto a su curva de ajuste en la figura III-34.



**Figura III-34.** Decaimiento de fluorescencia (—) obtenido en modo *TTTR* a nivel de moléculas individuales de TG-II en disolución acuosa ( $\lambda_{\text{ex}} = 488$  nm) a pH 6.60 y  $C^{\text{B}} = 0.3$  M. El tiempo de vida de fluorescencia recuperado fue de 2.99 ns, con un  $\chi^2$  de 1.21. Se muestran también el ajuste (—) y los residuales obtenidos. La ventana temporal de ajuste comienza tras 1.74 ns con el objeto de eliminar la influencia del pulso de la lámpara.

La figura III-35 muestra los tiempos de vida de fluorescencia, a valores de pH constante, en función de la concentración de tampón fosfato, obtenidos a nivel de moléculas individuales junto con aquellos tiempos recuperados a nivel de conjunto. Los experimentos se llevaron a cabo a valores de pH en los que los

decaimientos de fluorescencia mostraron carácter monoexponencial, entre ellos, el valor de pH fisiológico (7.35). Como puede observarse en la figura III-35, existe muy buena concordancia entre los tiempos obtenidos a nivel de moléculas individuales, los obtenidos a nivel de conjunto por análisis global de las curvas de decaimiento, y aquellos calculados teóricamente a través de los parámetros cinéticos y espectrales obtenidos de forma global en esta memoria. Esta excelente concordancia confirma la validez de las constantes de velocidad obtenidas en el análisis global compartimental. Es importante destacar que el tiempo de vida de fluorescencia presenta similares sensibilidades hacia la concentración de tampón fosfato a ambos valores de pH, por ejemplo, el incremento de la concentración de fosfato de 0.0 a 0.3 M produce una disminución del tiempo de vida medio de 3.7 ns a 3.0 ns para valores de pH de 6.60, y de 3.70 ns a 3.45 ns para valores de pH de 7.35. La sensibilidad del tiempo de vida de fluorescencia a la concentración de fosfato hacen del TG-II un colorante prometedor como sensor en experimentos de moléculas individuales realizados a valores de pH cercanos al fisiológico.



**Figura III-35.** Tiempos de vida recuperados a valores de pH de 6.60 (a) y 7.35 (b) representados frente a la concentración de tampón fosfato a (●) nivel de conjunto y (●) nivel de moléculas individuales. La línea representa los tiempos de vida calculados a través de las ecuaciones II-6 a II-16 del apartado II-3-6, usando las constantes de velocidad estimadas por análisis global compartimental recogidas en la tabla III-15 del apartado III-6-3.

III.7.2. Espectroscopía de correlación de fluorescencia (FCS).

Conocemos como equilibrio químico a cualquier reacción reversible, cuando se observa que las cantidades relativas de dos o más sustancias permanecen constantes, es decir, el equilibrio químico se da cuando la concentración de las especies participantes no cambia. Sin embargo, a pesar de que un sistema químico en equilibrio parece que no se modifica con el tiempo, esto no significa que no está ocurriendo ningún cambio. Inicialmente, los reactivos se combinan para formar los productos, pero llega un momento en que la cantidad de producto es lo suficientemente grande para que éstos reaccionen entre sí volviendo a formar los reactivos iniciales. De esta manera transcurren simultáneamente dos reacciones: directa e inversa. El equilibrio se alcanza cuando los reactivos se transforman en productos con la misma velocidad que los productos vuelven a transformarse en reactivos; es decir, se trata de un equilibrio dinámico, donde constantemente se formará producto y reactivo. A nivel molecular, una molécula en equilibrio químico entre dos especies pasará de una a otra dependiendo de las constantes cinéticas y de equilibrio que rijan las reacciones directa y reversa, influyendo en el tiempo que la molécula pase en cada estado. Por tanto, es posible estudiar un equilibrio químico a nivel molecular mediante espectroscopía de correlación de fluorescencia (descrito en el apartado II.3.9) siempre que dicha reacción implique un cambio en algún parámetro que afecte a la emisión de fluorescencia de alguna de las especies.

Como hemos expuesto en apartados anteriores, el colorante TG-II presenta tres formas prototrópicas diferentes. Sin embargo, este estudio tiene como finalidad la posibilidad de utilización de este fluoróforo como sensor fluorescente en muestras biológicas, aprovechando sus cualidades on/off. Por tanto, el equilibrio químico neutro-anión es el más interesante desde este punto de vista, ya que a valores de pH alrededor del fisiológico sólo estarán presentes estas dos especies. Así, encontraremos la especie aniónica, altamente

fluorescente, con un rendimiento cuántico de 0.840, y la especie neutra, que casi no fluorescerá, ya que posee un rendimiento cuántico de 0.010. (Urano *et al.* 2005). Este gran cambio en las propiedades de emisión de fluorescencia de ambas especies permitirá el estudio del equilibrio químico entre ambas por medio de FCS. El análisis de autocorrelación de la señal de fluorescencia mediante la aplicación de una ventana temporal (Krämer *et al.* 2006; Kapusta *et al.* 2008) permite por un lado eliminar la señal ocasionada por la luz dispersa, pero también queda fuera del análisis la pequeña contribución de la emisión de la especie neutra que emite a tiempos cortos. Por lo tanto, solo se tendrá en cuenta para la obtención de la función de autocorrelación la emisión fluorescente ocasionada por la especie aniónica. Las características y aplicación del análisis de autocorrelación con ventana temporal se recogen en la sección II-3-10.

#### III.7.2.1. Estudio del cruce entre los estados singlete y triplete.

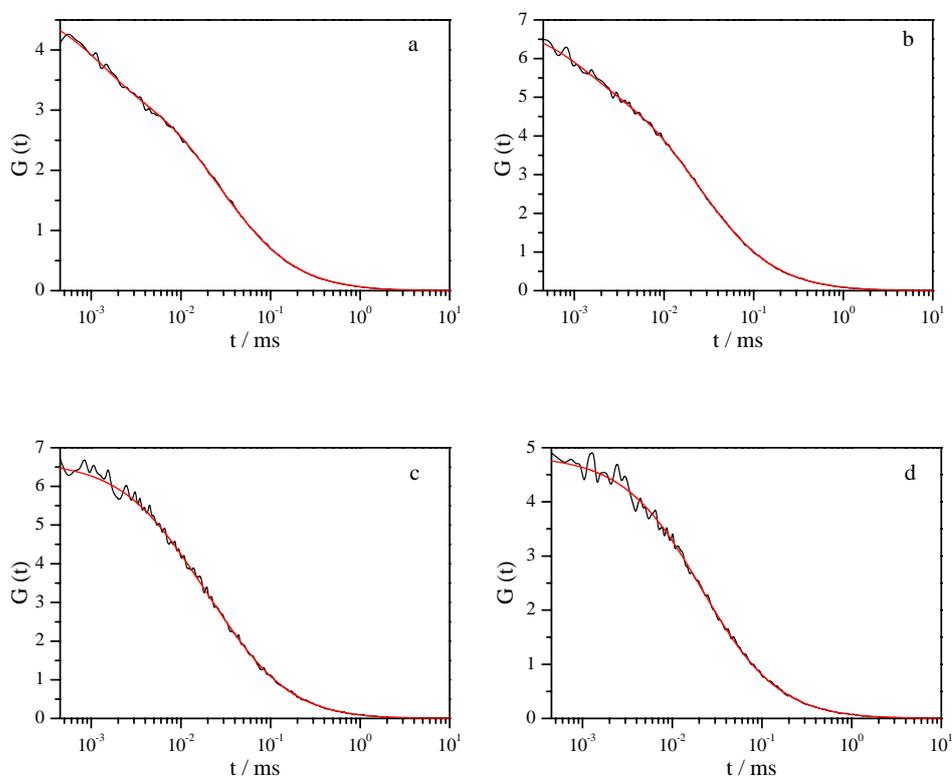
Es bien conocido que las transiciones entre estados excitados singlete y triplete de moléculas fluorescentes, aunque prohibidas cuánticamente, son posibles y frecuentes debido normalmente a altas intensidades de excitación que ocasionan una alta población del estado singlete excitado, favoreciendo el cruce hacia el estado triplete. Este cruce produce fluctuaciones en la emisión de fluorescencia puesto que la relajación del estado triplete suele producirse sin emisión. Estas fluctuaciones se ven fácilmente detectadas en la función de correlación de fluorescencia, ya que aparecen de forma característica en el rango de tiempo de microsegundos (Widengren *et al.* 1995).

Sin embargo, las fluctuaciones debidas al cruce entre sistemas se producen en el rango temporal donde ocurrirán las reacciones de protonación y desprotonación que se pretenden estudiar, lo que causaría serias interferencias y complicaría drásticamente el análisis posterior de la función de autocorrelación

de fluorescencia. Es por tanto primordial, reducir la intensidad de excitación hasta un valor en el que no se aprecie la distorsión en la función de correlación de fluorescencia debido a la formación del estado triplete. Para ello, se midió la señal de fluorescencia del colorante TG-II a valores de pH lo suficientemente elevados como para asegurarnos que en el medio sólo se encuentre la especie aniónica, y por lo tanto, de que no se produzcan fluctuaciones de la intensidad de fluorescencia producidas por la reacción de equilibrio neutro-anión. Para encontrar la intensidad de excitación óptima, se midió la muestra preparada a intensidades de excitación decrecientes, hasta obtener una función de correlación de fluorescencia que se pudiera ajustar al modelo II-27, expuesto en la sección II.3.9, correspondiente a moléculas individuales que difunden libremente en el volumen confocal, sin que en su trayectoria se vean implicadas en la formación de ningún estado oscuro (en este caso, del estado triplete).

En la figura III-36 se muestran las funciones de correlación de fluorescencia obtenidas para el colorante TG-II en disolución acuosa a concentración  $1 \times 10^{-9}$  M y a valor de pH de 9.70. Para alcanzar este valor de pH, se añadieron a las muestras el volumen necesario de hidróxido de sodio diluido. Las funciones de correlación de fluorescencia se intentaron ajustar en primer lugar al modelo II-27 que representa únicamente la contribución difusional, sin formación de un estado oscuro. En aquellas funciones de correlación de fluorescencia en los que no se obtuvieron buenos parámetros estadísticos en el ajuste se utilizó el modelo II-34, en la que se añade un término que representa la aparición de del estado triplete. En la figura III-36 pueden observarse las funciones de correlación de fluorescencia obtenidas para las intensidades de 84, 56, 8.4 y 5.6  $\mu W$ , respectivamente. Para las curvas mostradas en los apartados *a*, *b* y *c* fue necesario un ajuste al modelo II-34 (implicando un estado oscuro), mientras que solamente la función de autocorrelación obtenida con una intensidad de excitación de 5.6  $\mu W$  (gráfica *d*)

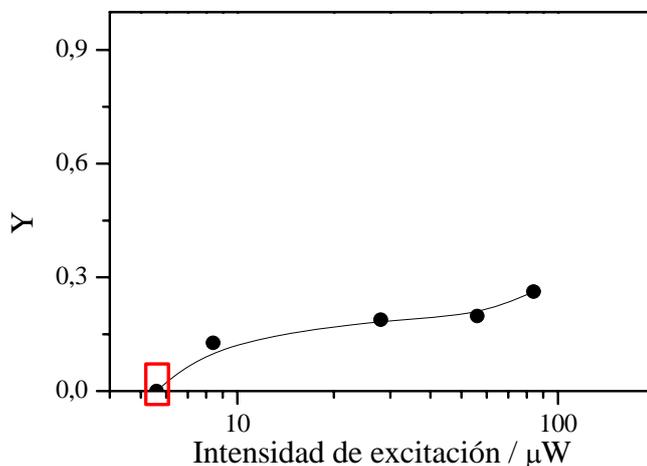
pudo ajustarse al modelo difusional con buenos parámetros estadísticos de ajuste.



**Figura III-36.** Función de correlación de fluorescencia de TG-II en disolución acuosa a pH 9.70 e intensidades crecientes de excitación: a)  $84 \mu W$  b)  $56 \mu W$  c)  $8.4 \mu W$  y d)  $5.6 \mu W$ . El ajuste de los datos se realizó para las curvas a, b y c, mediante la ecuación II-34 que corresponde al ajuste con un estado oscuro, y para la curva d, se ajustó a la ecuación II-27, correspondiente a la difusión pura.

La figura III-37 representa la fracción de fluoróforo que pasa al estado triplete ( $Y$ ) frente a la intensidad de excitación. El punto enmarcado en rojo, es el único que se pudo ajustar satisfactoriamente al modelo difusional, por lo tanto, se asume que a esa intensidad de excitación el paso de los electrones al estado triplete es tan bajo que resulta inapreciable en la función de correlación

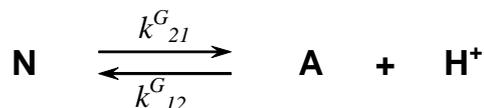
de fluorescencia. Por todo lo expuesto anteriormente, las medidas realizadas a nivel de moléculas individuales para obtener la función de correlación de fluorescencia se han realizado con una intensidad de excitación de  $5.6 \mu W$ .



**Figura III-37.** Fracción de moléculas en estado triplete en función de la intensidad de excitación del láser obtenidas en los ajustes de las curvas de autocorrelación de la figura III-36. El recuadro rojo indica la intensidad de excitación donde el modelo que representa el cruce entre sistemas no mejoró al ajuste del modelo difusional.

### III.7.2.2. Estudio de las constantes cinéticas del estado fundamental del equilibrio neutro – anión.

El equilibrio químico del estado fundamental  $N \rightleftharpoons A$  estará regido por las constantes de velocidad  $k_{12}^G, k_{21}^G$  según el esquema III-6.

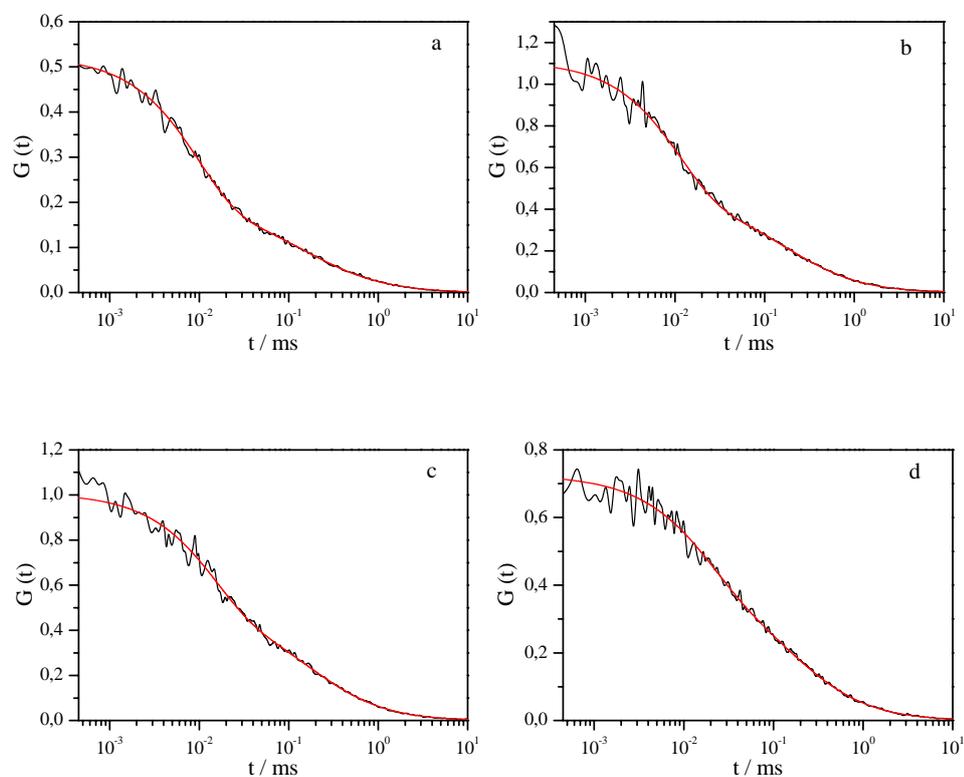


**Esquema III-6.-** Equilibrio químico de las especies neutra y aniónica del TG-II con las constantes de velocidad que rigen dicho equilibrio.

Las constantes cinéticas del estado fundamental de protonación y desprotonación del TG-II implicadas en este equilibrio serán accesibles por medio de curvas de correlación de fluorescencia a distintos valores de pH alrededor del valor del  $pK_a$ , ya que a estos valores es donde la transición neutro  $\rightleftharpoons$  anión es más evidente. Esta transición se verá reflejada en las curvas de correlación de fluorescencia como un tiempo adicional de relajación, ya que la especie neutra se comportará como un estado oscuro. Asimismo, la fracción de moléculas en estado oscuro obtenida en los ajustes de la función de autocorrelación representará la fracción de forma neutra en el equilibrio.

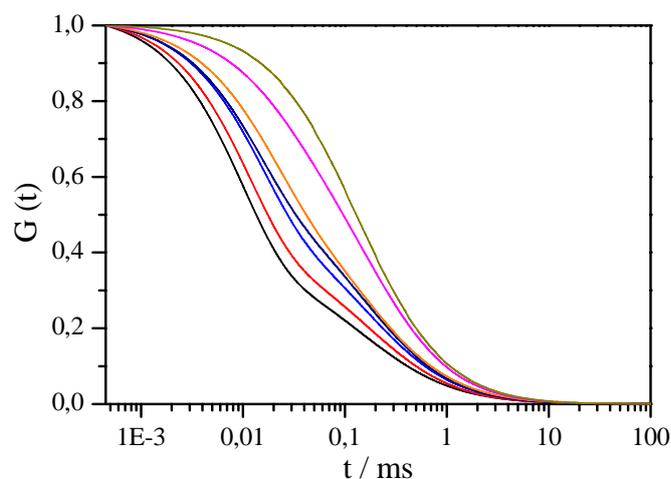
Para la obtención de las funciones de correlación de fluorescencia, se prepararon muestras de TG-II  $1 \times 10^{-9}$  M en disolución acuosa, a distintos valores de pH, obtenidos adicionando distintas proporciones de ácido perclórico e hidróxido de sodio diluidos. La instrumentación utilizada se describe en el apartado II.1.6, el modo de recogida de datos en la sección II-3-8 y la metodología de análisis de los espectros de correlación de fluorescencia en el apartado II-3-9. La frecuencia de repetición del láser ha sido de 20 MHz, y la intensidad se reguló para que no entrara más de  $5.6 \mu W$ , por los motivos expuestos anteriormente. El tiempo de recogida de datos fue de 1 hora para cada muestra. En la figura III-38 se observan algunas de las funciones de correlación obtenidas para un rango de valores de pH alrededor del valor del  $pK_a$ . En esta figura se pueden apreciar dos procesos dinámicos distintos en las curvas de correlación de fluorescencia: en primer lugar se observa la fluctuación de fluorescencia ocasionada por los procesos de protonación y desprotonación en equilibrio químico, es decir la conversión entre las especies neutra y aniónica del TG-II, en el rango del tiempo alrededor del microsegundo; por otro lado, en el rango del tiempo por debajo del milisegundo, aparece la transición debida a la difusión traslacional. Estas funciones se pueden ajustar a la ecuación III-38, considerando el estado oscuro como la formación de especie neutra. A partir del ajuste de la ecuación, es posible determinar la fracción de especie que no emite

(neutra) y el tiempo de protonación (tiempo de relajación de la reacción asociación-disociación). Para los ajustes y cálculos posteriores, se considerará que la especie neutra, no emite nada de fluorescencia.



**Figura III-38.** Curvas de correlación de fluorescencia de TG-II a concentración 1 nM, en disolución acuosa a valores de pH de: **a)** 5.72 **b)** 5.82 **c)** 6.09 y **d)** 6.42. Las curvas fueron ajustadas a la ecuación II-34, donde se implica la presencia de un estado oscuro en el proceso difusional.

En la figura III-39, se muestran todos los ajustes normalizados, de las funciones de correlación de fluorescencia medidas. Como se puede observar, existe un aumento de la proporción de la fracción oscura y un aumento de la velocidad de relajación del equilibrio químico, con la disminución del valor de pH.



**Figura III-39.** Curvas normalizadas de ajuste del modelo II-38 a las funciones de correlación de fluorescencia obtenidas valores de pH de: (—) 5.72, (—) 5.80, (—) 5.82, (—) 6.09, (—) 6.42, (—) 7.00 y (—) 9.00.

En la tabla III-18 se recogen los datos obtenidos de fracción de estado neutro ( $Y$ ) y del tiempo de relajación del equilibrio químico ( $\tau_p$ ), de las funciones de correlación de fluorescencia realizadas a seis valores de pH, ubicados alrededor del valor del  $pK_a$ .

**Tabla III-18.** Fracción de especie neutra y tiempo de relajación del equilibrio químico entre las especies neutra y aniónica del TG-II, obtenidos en el ajuste de la ecuación II-34 a las funciones de correlación obtenidas.

pH	$Y$	$\tau_p$ (s)
5.72	0.6074	$1.039 \times 10^{-5}$
5.80	0.5700	$1.163 \times 10^{-5}$
5.82	0.5696	$1.187 \times 10^{-5}$
6.09	0.4737	$1.558 \times 10^{-5}$
6.42	0.3205	$2.002 \times 10^{-5}$
7.00	0.1312	$2.380 \times 10^{-5}$

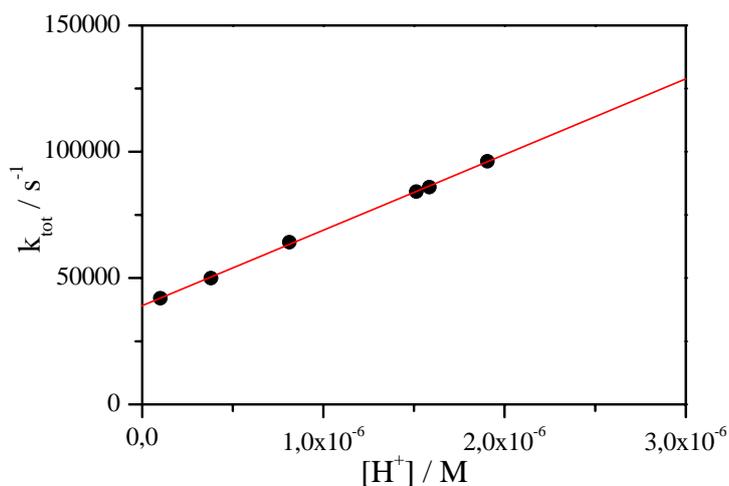
En un sistema simple, en el que el modelo del esquema III-6 sea correcto, la velocidad de relajación dependerá únicamente de las constantes del equilibrio químico y de la concentración de hidrogeniones. Así, la variación de dicho tiempo es debida únicamente al cambio en cada muestra del pH, ya que las constantes del equilibrio  $k_{12}^G$  y  $k_{21}^G$  (ver esquema III-6) permanecen invariables. A continuación veremos como se pueden obtener los valores de las constantes cinéticas a través de los ajustes de las funciones de autocorrelación. Denominaremos  $k_{tot}$  a la inversa del tiempo de relajación, y que representa la suma de todos los procesos implicados en el equilibrio ácido – base en el estado fundamental:

$$k_{tot} = 1 / \tau_p \quad \text{(III-25)}$$

Por lo tanto, dicho parámetro vendrá dado por:

$$k_{tot} = k_{12}^G \cdot [H^+] + k_{21}^G \quad \text{(III-26)}$$

De esta manera, es posible calcular las constantes del equilibrio neutro-anión,  $k_{12}^G$  y  $k_{21}^G$ , a través de un ajuste lineal de la ecuación III-26, representando los datos experimentales de la inversa del tiempo de relajación, en el eje de ordenadas, frente a la concentración de protones, en el eje de abcisas. Este análisis se muestra en la figura III-40, obteniéndose unos valores para las constantes  $k_{12}^G$  y  $k_{21}^G$  que se muestran en la tabla III-19. El valor obtenido para la constante de protonación  $k_{12}^G$  se encuentra en el rango de las constantes calculadas para cualquier otro proceso controlado por difusión, en similares condiciones experimentales, que presentaría valores típicos alrededor de  $2-8 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (Rice, 1985; Lima et al., 1998; Genosar et al., 2000), por lo que se debe considerar como aceptable.

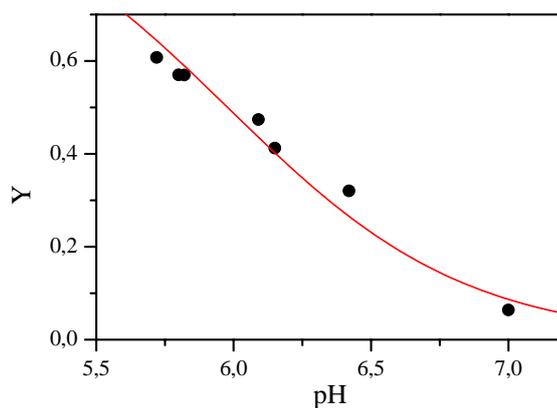


**Figura III-40.** Representación de la inversa de los tiempos de relajación ( $k_{tot}$ ) frente a la concentración de protones. La línea roja representa el ajuste lineal de la ecuación III-26 a los puntos experimentales.

**Tabla III-19.** Valores obtenidos de las constantes de velocidad, a partir de la ecuación III-26.

$k_{12}^G$	$(2.99 \pm 0.03) \times 10^{10} M^{-1} s^{-1}$
$k_{21}^G$	$(3.90 \pm 0.04) \times 10^4 s^{-1}$

El ajuste de la ecuación II-34 a las funciones de correlación obtenidas, también permite obtener, como ya se ha mencionado, los resultados de la fracción de especie en forma oscura  $Y$ , es decir de especie neutra, de cada muestra. En la figura III-41 se muestran estos valores en función del pH.



**Figura III-41.** Fracción de especie neutra de TG-II en función del valor de pH obtenidos a partir de ajustes de las funciones de correlación de fluorescencia a la ecuación II-38. La línea roja representa la mejor curva de ajuste de la ecuación III-28 a dichos valores.

### III.7.2.3. Obtención del valor de $pK_a$ .

A partir de los resultados obtenidos en la sección anterior es posible el valor de  $pK_a$  implicado en el equilibrio químico neutro  $\rightleftharpoons$  anión por dos diferentes vías:

- Por un lado a través de las constantes cinéticas. El equilibrio químico se da cuando las velocidades de la reacción directa e inversa son iguales. Por tanto se cumple que  $v_{12} = k_{12}^G \cdot [H^+] \cdot [2] = k_{21}^G \cdot [1] = v_{21}$ . Además, el valor de  $pK_a$  coincidirá con el valor de pH en el cual las dos especies implicadas se encuentren en igual concentración en equilibrio. Por tanto,  $[1] = [2]$ . Así, la concentración de protones en la que esto se cumple, y por tanto el valor de  $K_a$ , vienen dados por:

$$K_a = \frac{k_{21}^G}{k_{12}^G} \quad \text{(III-27)}$$

Utilizando los valores de las constantes  $k_{12}^G$  y  $k_{21}^G$  en la tabla III-19, se obtiene un valor de  $K_a$  de  $(1.30 \pm 0.02) \times 10^{-6}$  y por tanto un valor de  $pK_a$  de  $5.89 \pm 0.01$ .

- Es posible también determinar el valor del  $pK_a$  a través de las fracciones de especie neutra  $Y$  obtenidas, ya que, dicho valor viene determinado por la teoría del equilibrio químico y dado por la siguiente ecuación:

$$Y = \frac{[H^+]}{[H^+] + K_a} \quad \text{(III-28)}$$

Se podrá por tanto obtener el valor de  $K_a$  mediante un ajuste no lineal por mínimos cuadrados de la ecuación III-28 a los valores representados en la figura III-41. Se obtuvo un valor de  $K_a$  de  $(1.05 \pm 0.07) \times 10^{-6}$  y por tanto un valor de  $pK_a$  de  $5.98 \pm 0.03$ .

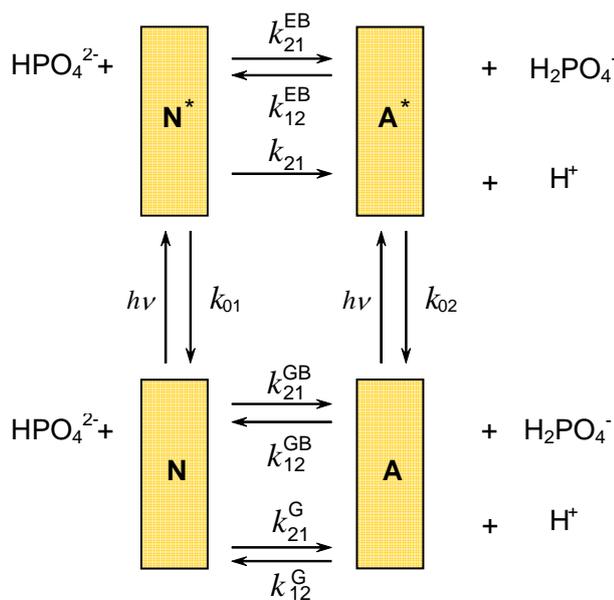
Cabe destacar que ambos resultados son muy similares a aquel obtenido en la sección III-4-2 por medio de medidas de absorbancia y cuyo valor fue de 5.97. En la tabla III-20 se comparan los distintos valores de  $pK_a$  alcanzados por diferentes métodos en esta memoria. La coincidencia de estos valores de  $pK_a$ , obtenidos en diferentes experimentos o por distintos métodos, refuerza la exactitud de los datos calculados, y la validez de la metodología utilizada en cada caso.

**Tabla III-20.** Valores de  $pK_a$  del colorante TG-II obtenidos a lo largo de esta memoria.

Método	$pK_a$
Nivel de conjunto – a través de medidas de absorbancia	$5.97 \pm 0.03$
FCS – a través de constantes cinéticas	$5.89 \pm 0.01$
FCS – a través de la fracción de especie neutra	$5.98 \pm 0.03$

III.7.2.4. Estudio de la influencia del tampón fosfato en las constantes cinéticas del equilibrio  $N \rightleftharpoons A$  del TG-II.

Como hemos visto en apartados anteriores, cuando excitamos el colorante TG-II en presencia de un aceptor/dador protónico adecuado como las especies del tampón fosfato, se produce la reacción de transferencia protónica en el estado excitado, provocando un cambio en las concentraciones de las especies prototrópicas implicadas. Se puede, por tanto, suponer que, al igual que ocurre en el estado excitado, es posible que un aceptor/dador protónico adecuado afecte el equilibrio químico del estado fundamental. Por lo que, es muy importante, estudiar en detalle la influencia que ocasiona la presencia de tampón en la función de correlación de fluorescencia. El efecto adicional de las especies del tampón fosfato sobre las especies de TG-II en el estado fundamental se muestran en el esquema III-7.



**Esquema III-7.** Esquema completo del modelo propuesto de transferencia protónica de los estados fundamental y excitado entre las especies neutra y aniónica del TG-II promovidas por el sistema de tampón fosfato.

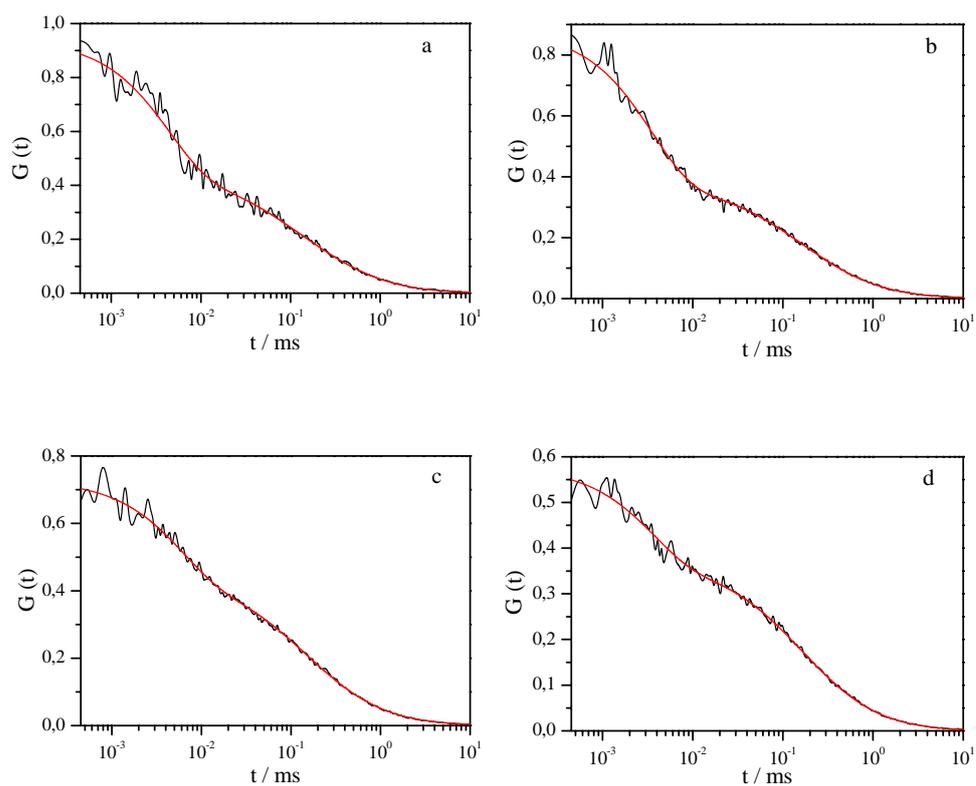
El superíndice  $B$  en la nomenclatura de las constantes cinéticas indica por lo tanto la mediación de las especies del tampón tanto en las reacciones de protonación ( $k_{12}^B$ ) como de desprotonación ( $k_{21}^B$ ), ya sean en el estado fundamental ( $k_{12}^{GB}$  y  $k_{21}^{GB}$ ) como en el excitado ( $k_{12}^{EB}$  y  $k_{21}^{EB}$ ). Al agregar una cantidad determinada de tampón fosfato en el medio, la capacidad de aceptar/donar protones de éste se sumará, como demostramos en apartados anteriores, a la capacidad de intercambio de hidrogeniones en el estado fundamental del sistema, pero también se adicionará a la capacidad de intercambio que tenga en el estado excitado siempre y cuando la concentración de tampón fosfato sea lo suficientemente elevada como para provocar que la reacción en el estado excitado sea lo suficientemente rápida como para competir con la emisión de fluorescencia (normalmente, a concentraciones mayores de 0.010 M).

En secciones anteriores, y mediante técnicas de fluorescencia con resolución temporal y análisis global compartimental, ya se obtuvieron estimaciones de los valores de  $k_{12}^{EB}$  y  $k_{21}^{EB}$ . Sin embargo, en el sub-apartado anterior ya se ha demostrado la posibilidad de obtener constantes cinéticas de intercambio protónico en el estado fundamental por medio de FCS. Así, en esta sección se empleará FCS para la obtención de las constantes cinéticas de intercambio protónico en estado fundamental mediadas por las especies del tampón fosfato,  $k_{12}^{GB}$  y  $k_{21}^{GB}$ .

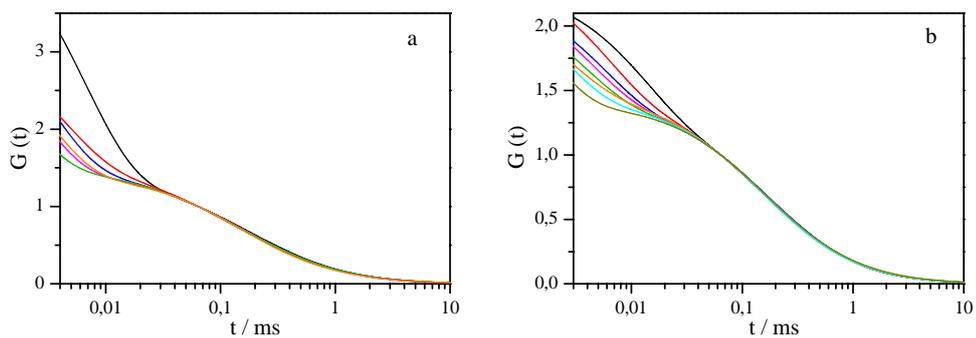
Para ello, se recogieron medidas de fluorescencia para obtener la función de autocorrelación de muestras de TG-II en disolución acuosa a concentración de  $1 \times 10^{-9}$  M, en cuatro series a valores de pH constantes (5.50, 6.00, 6.50 y 7.00), y concentraciones crecientes de tampón fosfato. Las condiciones utilizadas para la obtención de las funciones de correlación de fluorescencia fueron las mismas que las expuestas con anterioridad, en el apartado III.7.2.2; a saber, una frecuencia de repetición del láser de 20 MHz, y

una intensidad máxima de  $5.6 \mu W$ . El tiempo de recogida de datos fue de 1 hora para cada muestra. Se ajustó el modelo II-38, que pone de manifiesto la aparición de un estado oscuro, representado por la presencia del estado neutro (no fluorescente), a las funciones de correlación de fluorescencia obtenidas.

En la figura III-42 se muestran como ejemplo algunas de las funciones de correlación de fluorescencia obtenidas, así como la mejor curva de ajuste. Todos los ajustes realizados fueron recogidos y normalizados en la difusión de la molécula, con el objeto de poder comparar entre sí las diferencias existentes en los tiempos de protonación y la fracción de estado oscuro que presenta cada función de correlación de fluorescencia. Como puede observarse en la figura III-43, la función de correlación de fluorescencia se ve afectada por la presencia de tampón fosfato, de tal manera que los tiempos de relajación del equilibrio químico se hacen más rápidos conforme aumenta la concentración de tampón fosfato en el medio. En cambio, la fracción de estado neutro presente en el medio es más difícil de determinar, ya que en algunos casos la velocidad de protonación es tan rápida que en parte queda fuera del rango de tiempo detectable por nuestra instrumentación. Los resultados obtenidos en el ajuste del modelo II-34 a las funciones de correlación de fluorescencia recogidas, se muestran en la tabla III-21. Es destacable indicar la alta sensibilidad de la técnica, ya que incluso a concentraciones tan bajas como  $0.2 \text{ mM}$  de tampón fosfato es posible apreciar la diferencia entre los tiempos de protonación registrados, y por tanto entre las constantes de relajación obtenidas. De hecho, se pudieron realizar muestras por debajo de  $0.1 \text{ mM}$  de concentración de tampón fosfato, obteniéndose muy buenos resultados tal como aparece en la figura III-43b.



**Figura III-42.** Funciones de correlación de fluorescencia obtenidas para disoluciones acuosas de TG-II  $1 \times 10^{-9}$  M, a valores de pH de 6.00 (a y b) y 6.50 (c y d), en presencia de tampón fosfato: **a)** 0.490 mM **b)** 0.800 mM **c)** 0.215 mM **d)** 0.655 mM. La línea roja representa el mejor ajuste a la función de correlación del modelo II-34.



**Figura III-43.** Ajuste del modelo II-34 a las funciones de correlación de fluorescencia obtenidas de disoluciones acuosas de TG-II a concentración  $1 \times 10^{-9}$  M. A valores de pH de 6.00 y 6.50 para la figura a y b respectivamente, a concentración de tampón creciente. Figura **a**): 0.195 mM (—), 0.490 mM (—), 0.750 mM (—), 0.990 mM (—), 1.300 mM (—) y 1.920 mM (—). Figura **b**): 0.080 mM (—), 0.215 mM (—), 0.380 mM (—), 0.505 mM (—), 0.655 mM (—), 0.790 mM (—) y 1.500 mM (—).

**Tabla III-21.** Tiempos de protonación del equilibrio  $N \rightleftharpoons A$  del TG-II en disolución acuosa, en presencia de tampón fosfato, obtenidos por el ajuste del modelo II-34 a las funciones de correlación de fluorescencia recogidas a distintos valores de pH.

pH	[Fosfato] / mM	Tiempo de protonación / s	$\chi_r^2$
5.50	0.154	$5.42 \times 10^{-6}$	1.163
	0.295	$4.10 \times 10^{-6}$	1.139
	0.609	$3.28 \times 10^{-6}$	1.200
	1.000	$2.55 \times 10^{-6}$	1.202
	1.410	$2.18 \times 10^{-6}$	1.165
	2.040	$1.63 \times 10^{-6}$	1.428
6.00	0.195	$7.71 \times 10^{-6}$	1.386
	0.490	$5.15 \times 10^{-6}$	1.233
	0.750	$3.59 \times 10^{-6}$	1.343
	0.990	$2.88 \times 10^{-6}$	1.113
	1.300	$2.32 \times 10^{-6}$	1.192
	1.920	$1.75 \times 10^{-6}$	1.144
6.50	0.080	$1.27 \times 10^{-5}$	1.265
	0.215	$6.48 \times 10^{-6}$	1.143
	0.380	$5.40 \times 10^{-6}$	1.359
	0.505	$4.15 \times 10^{-6}$	1.365
	0.655	$3.20 \times 10^{-6}$	1.075
	0.790	$2.69 \times 10^{-6}$	1.216
	0.970	$2.26 \times 10^{-6}$	1.182
	1.500	$1.48 \times 10^{-6}$	1.210
7.00	0.200	$4.86 \times 10^{-6}$	1.175
	0.450	$2.34 \times 10^{-6}$	1.231
	0.500	$2.70 \times 10^{-6}$	1.296
	1.000	$1.17 \times 10^{-6}$	1.073
	1.400	$8.50 \times 10^{-6}$	0.999

Para investigar los efectos de la concentración de tampón sobre la función de correlación de fluorescencia debemos considerar el equilibrio que se describe en el esquema III-7 en donde las concentraciones de  $HPO_4^{2-}$  y  $H_2PO_4^-$ , representadas a continuación por  $B^-$  y  $BH$ , vienen dadas por la constante de acidez del tampón  $K_a^B$ , la concentración total de tampón  $B_{tot}$  y la concentración de hidrogeniones  $[H^+]$  en el medio:

$$B^- = \frac{B_{tot} K_a^B}{[H^+] + K_a^B} \quad (III-29)$$

$$BH = \frac{B_{tot} [H^+]}{[H^+] + K_a^B} \quad (III-30)$$

El tiempo total de fotoconversión entre la especie aniónica brillante y la neutra oscura es la inversa de la suma de las constantes de velocidad para las reacciones de transferencia protónica directa e inversa. No obstante, los procesos accesibles en nuestra instrumentación por FCS son los que ocurren en el rango del  $\mu s$ , por tanto tan solo se consideran las constantes del estado fundamental y no del excitado. De esta manera la velocidad de protonación y de desprotonación mediada por las especies del tampón se adicionan a la velocidad de intercambio protónico de los fluoróforos en disolución acuosa sin tampón. Por tanto, la velocidad de relajación total vendrá dada por:

$$\tau_p^{-1} = k_{tot} = (k_{12}^{GB})[BH] + (k_{21}^{GB})[B^-] + (k_{12}^G)[H^+] + k_{21}^G \quad (III-31)$$

en el que después de insertar las ecuaciones III-29 y III-30, tenemos:

$$k_{tot} = B_{tot} \frac{k_{12}^{GB} \left( \frac{[H^+]}{K_a^B} \right) + k_{21}^{GB}}{\left( \frac{[H^+]}{K_a^B} \right) + 1} + k_{12}^G [H^+] + k_{21}^G \quad (\text{III-32})$$

La ecuación III-32 presenta una característica importante: a un valor de pH fijo, la representación de  $k_{tot}$  en función de la concentración de tampón  $B_{tot}$  da como resultante una línea recta, cuya pendiente vendrá representada por el término:

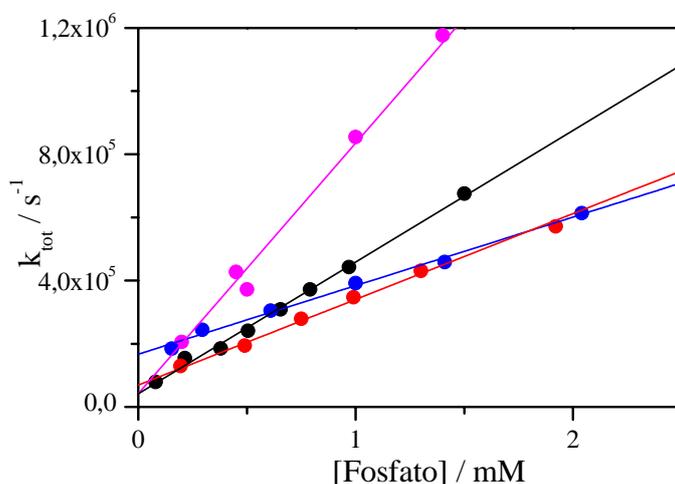
$$pendiente = \frac{k_{12}^{GB} \left( \frac{[H^+]}{K_a^B} \right) + k_{21}^{GB}}{\left( \frac{[H^+]}{K_a^B} \right) + 1} \quad (\text{III-33})$$

mientras que la ordenada en el origen viene dada por el término

$$ordenada \text{ en origen} = k_{12}^G [H^+] + k_{21}^G \quad (\text{III-34})$$

De esta manera, la diferencia en las pendientes de estas representaciones a valores diferentes de pH está directamente relacionada con los valores de las constantes  $k_{12}^{GB}$  y  $k_{21}^{GB}$ . Esto permite una metodología simple para obtener los valores de estas dos constantes cinéticas a partir de los valores de pendiente obtenidas en los ajustes lineales individuales de la  $k_{tot}$  frente a la concentración total de tampón, a diferentes valores de pH. En la figura III-44, se representan los valores de  $k_{tot}$  en función de la concentración de tampón fosfato obtenidos a cuatro valores de pH diferentes: 5.50, 6.00, 6.50 y 7.00. Es posible observar tal como se representa en la figura que la pendiente del ajuste del valor de la  $k_{tot}$  crece conforme aumenta el valor de pH. Estudiando la expresión de la

pendiente (ecuación III-33), la característica anteriormente mencionada indica que  $k_{21}^{GB}$  tiene un valor mayor que  $k_{12}^{GB}$ . \* Sin embargo, la ordenada en el origen disminuye con el aumento del pH tal y como predice la ecuación III-34.

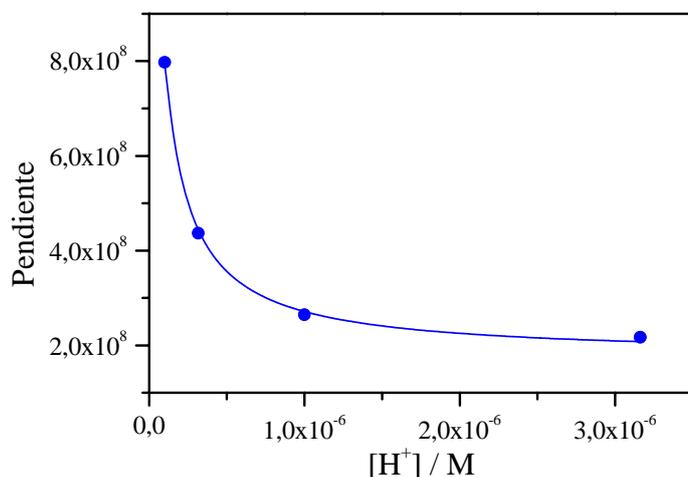


**Figura III-44.** Influencia del tampón fosfato sobre la constante de relajación total. La figura muestra los resultados recogidos a cuatro valores de pH diferentes: (●) 5.50, (●) 6.00, (●) 6.50 y (●) 7.00. Las líneas rectas representan el ajuste lineal de los datos obtenidos.

A través de los datos en la figura III-44 se obtuvieron los valores de las constantes  $k_{12}^{GB}$  y  $k_{21}^{GB}$ . En primer lugar, se ajustó cada serie mostrada en la figura a la ecuación de la recta:  $y = a + b \cdot x$ . A continuación, el valor obtenido de las pendientes de la recta se representó en función de la concentración de hidrogeniones, tal como se observa en la figura III-45. Finalmente, estos datos pueden ajustarse a la ecuación III-8-2-3-5, en la que la concentración de protones es la variable independiente,  $k_{12}^{GB}$  y  $k_{21}^{GB}$  son parámetros ajustables, y la constante del tampón fosfato  $K_a^B$  es conocida y vale  $1.5849 \times 10^{-7}$ . Los

\* La función de la pendiente (III-33) es monótonamente creciente con la concentración de  $H^+$ , por tanto monótonamente decreciente con el pH cuando  $k_{12}^{GB} > k_{21}^{GB}$ ; en cambio es monótonamente decreciente con  $[H^+]$  (creciente con el pH) cuando  $k_{12}^{GB} < k_{21}^{GB}$ .

resultados obtenidos se muestran en la tabla III-22, alcanzándose buenos parámetros estadísticos de ajuste ( $r^2 = 0.9992$ ).



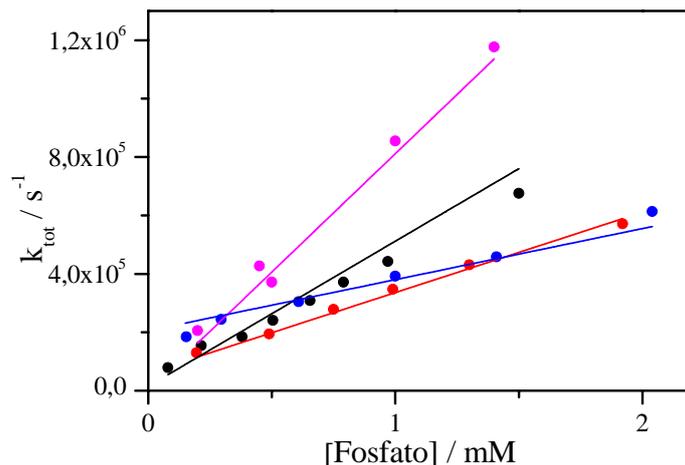
**Figura III-45.** Valores de las pendientes obtenidas en los ajustes lineales de las diferentes series mostradas en la figura III-44 (●). La línea azul representa el ajuste de la ecuación III-33 a los datos obtenidos.

**Tabla III-22.** Constantes de las reacciones de protonación y desprotonación mediadas por las especies del tampón fosfato en el equilibrio químico  $N \rightleftharpoons A$  del TG-II en disolución acuosa.

$k_{12}^{GB}$	$(1.77 \pm 0.07) \times 10^8 M^{-1}s^{-1}$
$k_{21}^{GB}$	$(1.77 \pm 0.03) \times 10^9 M^{-1}s^{-1}$

Además del cálculo de las constantes mediadas por tampón del estado fundamental  $k_{ij}^{GB}$  realizado en dos pasos (ajuste lineal de los datos y ajuste de la ecuación III-33 a la pendiente obtenida), es posible obtener directamente estas constantes a través del ajuste global de la ecuación III-32. En este análisis se fijaron los valores de  $k_{21}^G$  y  $k_{12}^G$  previamente calculados en la sección III-7-2,

así como los valores ya conocidos de  $K_a^B$  y la concentración de protones de cada muestra, de tal manera que las únicas variables fueron las constantes mediadas por el tampón  $k_{21}^{GB}$  y  $k_{12}^{GB}$ . En la figura III-46 se muestra el ajuste global realizado, y en la tabla III-23 se exponen los valores obtenidos así como sus errores asociados.



**Figura III-46.** Ajuste global de la ecuación III-8-2-3-4 a los datos obtenidos de la constante de relajación total para los valores de pH de (●) 5.50, (●) 6.00, (●) 6.50 y (●) 7.00.

**Tabla III-23.** Constantes de las reacciones de protonación y desprotonación mediadas por las especies del tampón fosfato en el equilibrio químico  $N \rightleftharpoons A$  del TG-II en disolución acuosa, calculadas a través del ajuste global de la ecuación III-32.

$k_{12}^{BG}$	$(1.90 \pm 0.09) \times 10^8 M^{-1}s^{-1}$
$k_{21}^{BG}$	$(1.72 \pm 0.05) \times 10^9 M^{-1}s^{-1}$

Los resultados obtenidos en el ajuste global son muy similares a los alcanzados anteriormente aunque con un margen de error ligeramente superior.

La similitud de los resultados obtenidos permite confirmar la exactitud de los valores calculados.

Una característica a destacar es que los valores de las constantes de las reacciones medidas por fosfato en el estado fundamental (accesibles mediante FCS) son muy parecidas a aquellas obtenidas para las mismas reacciones pero en el estado excitado del TG-II, obtenidas mediante análisis global compartimental de los decaimientos de fluorescencia a nivel de conjunto, y calculadas en la sección III.6.3. En la tabla III-24 se comparan directamente estos valores. Esta concordancia tiene implicaciones muy interesantes. Por un lado, al presentar valores muy parecidos para las reacciones en estado fundamental y excitado, se puede considerar que ambos procesos presentan la misma naturaleza independientemente de si suceden en uno u otro estado del TG-II, directamente controlados por los encuentros entre las moléculas implicadas, orientación, formación de puentes de hidrógeno, etc. Por otro lado, las concentraciones de tampón usadas para las medidas de los experimentos de espectroscopía de correlación de fluorescencia son muy bajas en comparación con las empleadas en los experimentos de estudio de la reacción de transferencia protónica en el estado excitado. A la vista de los valores de las constantes, se puede por tanto deducir que la reacción de transferencia protónica en el estado excitado únicamente se promueve cuando la concentración de tampón sea lo adecuadamente alta como para que la reacción se vuelva lo suficientemente rápida como para competir con la emisión fluorescente, es decir, suceda en el rango de los 3 o 4 nanosegundos en los que se produce la emisión de fluorescencia. Si la concentración de tampón no es tan alta, el equilibrio en el estado fundamental se verá influido, en cambio, en el estado excitado se producirá preferentemente la emisión de fluorescencia antes de sufrir ninguna reacción de intercambio protónico.

**Tabla III-24.** Constantes de protonación y desprotonación mediadas por las especies del tampón fosfato obtenidas para el estado excitado (obtenidas a nivel de conjunto mediante análisis global compartimental en la sección III.6.3) y para el estado fundamental del TG-II (a nivel molecular, mediante espectroscopía de correlación de fluorescencia (FCS) en esta sección).

	$k_{12}^B$	$k_{21}^B$
Estado excitado – Análisis Global Compartimental	$(3.80 \pm 0.10) \times 10^8 M^{-1}s^{-1}$	$(1.8 \pm 0.7) \times 10^9 M^{-1}s^{-1}$
Estado fundamental – FCS (Ajuste de las pendientes)	$(1.77 \pm 0.07) \times 10^8 M^{-1}s^{-1}$	$(1.77 \pm 0.03) \times 10^9 M^{-1}s^{-1}$
Estado fundamental – FCS (Ajuste global)	$(1.90 \pm 0.09) \times 10^8 M^{-1}s^{-1}$	$(1.72 \pm 0.05) \times 10^9 M^{-1}s^{-1}$

III.7.2.5. Estudio de la influencia de otros tampones en el equilibrio químico  $N \rightleftharpoons A$  mediante espectroscopía de correlación de fluorescencia.

Con el objeto de confirmar la igual naturaleza de la reacción de transferencia protónica en el estado excitado y del estado fundamental del TG-II se propone estudiar, de manera análoga al apartado anterior, la eficacia como promotores de la reacción de transferencia protónica de determinados tampones sobre el equilibrio químico neutro  $\rightleftharpoons$  anión del estado fundamental. Se han seleccionado para ello los tampones HEPES, trizma y el sistema acético/acetato. Éstos han sido anteriormente investigados a nivel de conjunto con diferentes colorantes, conociéndose que tanto los tampones HEPES y trizma no promueven la reacción de transferencia protónica en el estado excitado, mientras que el tampón acetato sí la promueve, tal como se mostró para el Oregon Green 488 (*Orte et al, 2005a*). Además, todos estos tampones son ampliamente utilizados en laboratorios de biología y bioquímica. El valor del  $pK_a$  de cada uno de ellos es: 7.55, 8.06 y 4.76 respectivamente.

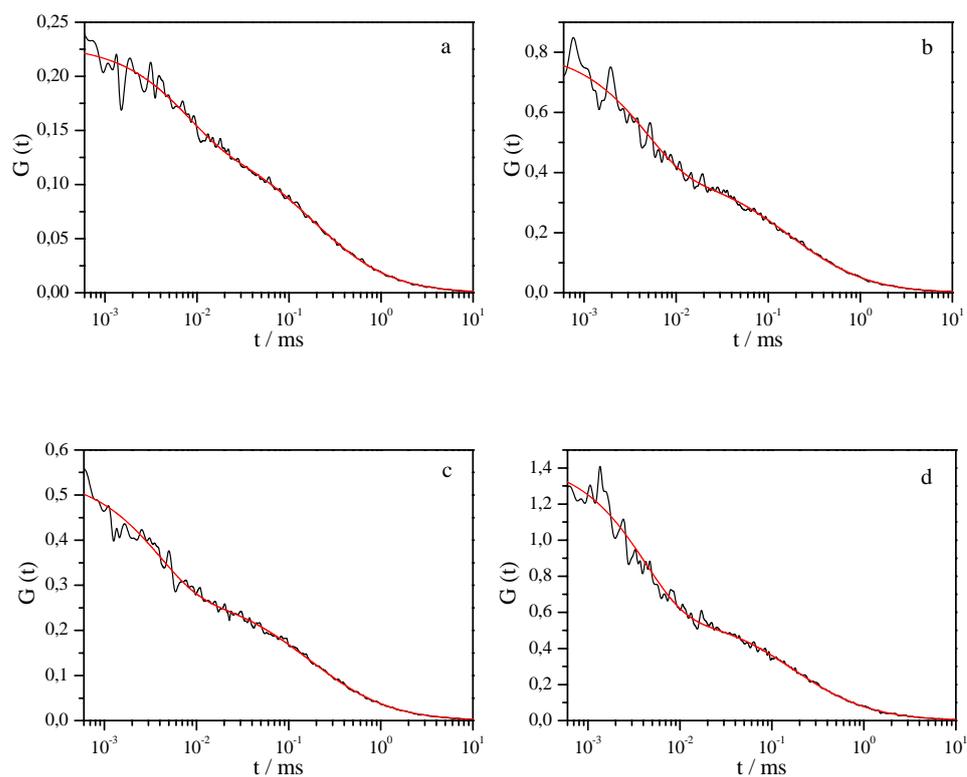
#### III.7.2.5.1. Influencia del tampón HEPES y trizma.

El tampón HEPES es un agente químico zwitteriónico ampliamente utilizado en cultivos celulares debido a su gran capacidad tamponante a valores de pH fisiológico, incluso a pesar de los cambios en el medio de la concentración de dióxido de carbono debido a la respiración celular. La disociación del tampón HEPES disminuye con la temperatura, esto hace del HEPES un agente tamponante muy efectivo para mantener la estructura y función de las enzimas a bajas temperaturas (*Baicu et al. 2002*). Sin embargo, el tampón HEPES presenta fototoxicidad cuando está sometido a ambientes muy

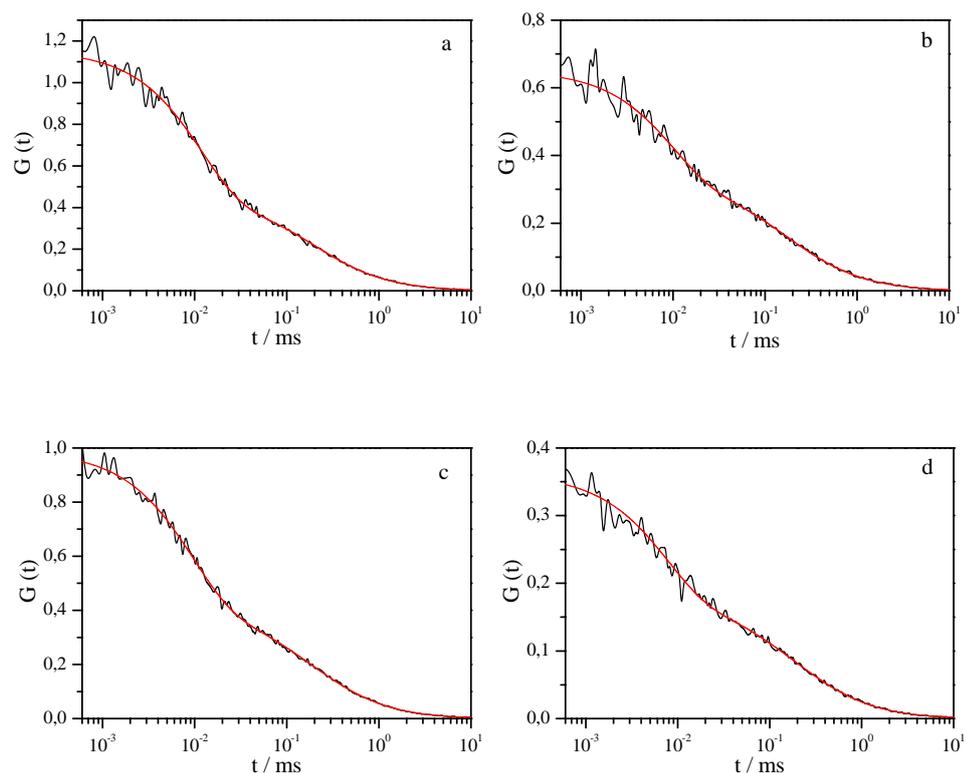
luminosos, ya que se produce peróxido de hidrógeno; es por ello que al utilizarse en medios de cultivo de células debe mantenerse en oscuridad.

El tampón tris-(hidroximetil)-aminometano (trizma) presenta un valor de  $pK_a$  de 8.06, y tiene un intervalo útil de tamponamiento de 7.00 a 9.00. Esto coincide con el valor de pH fisiológico de la mayoría de los seres vivos, que, sumado a su bajo coste, hace del trizma uno de los tampones más comunes en laboratorios de biología y bioquímica.

Se realizaron medidas de correlación de fluorescencia del colorante TG-II 1 nM en disolución acuosa en presencia de tampón HEPES y otra serie de medidas en presencia de tampón trizma, a concentraciones crecientes de tampón, y a un valor de pH de 6.00. En la figura III-47 y III-48 se observan a modo de ejemplo algunas de las funciones de correlación de fluorescencia recogidas, para las muestras tamponadas con HEPES y trizma, respectivamente. Las condiciones de medida fueron iguales que las utilizadas en apartados anteriores. El modelo de ajuste fue el II-34, donde se evidencia la presencia de un estado oscuro, representado por la formación de la especie neutra no emisiva. Los resultados obtenidos se muestran en las tablas III-25 y III-26, donde se representan los tiempos de relajación del equilibrio químico en presencia del tampón HEPES y trizma, respectivamente, así como el parámetro estadístico de ajuste  $\chi_r^2$ .



**Figura III-47.** Curvas de correlación de fluorescencia, obtenidos para el colorante TG-II, 1 nM, en disolución acuosa, a concentraciones de tampón HEPES crecientes: **a)** 1 mM, **b)** 3.36 mM, **c)** 4 mM y **d)** 5 mM. La línea roja representa la mejor curva de ajuste del modelo II-34 a la función de correlación de fluorescencia.



**Figura III-48.-** Curvas de correlación de fluorescencia obtenidas para el colorante TG-II, 1 nM, en disolución acuosa, a concentraciones de tampón trizma crecientes: **a)** 0.06 mM, **b)** 2.38 mM, **c)** 3.21 mM y **d)** 3.80 mM. La línea roja representa la mejor curva de ajuste del modelo II-34 a las funciones de correlación de fluorescencia obtenidas.

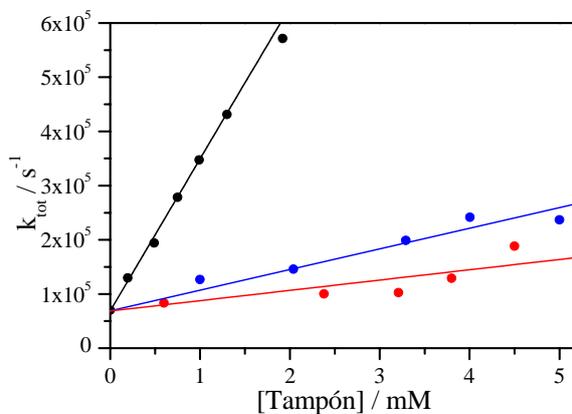
**Tabla III-25.** Tiempo total de relajación del equilibrio químico  $N \rightleftharpoons A$  del TG-II en disolución acuosa, en presencia de tampón HEPES, a valor de pH de 6.00. Los resultados se obtuvieron por el ajuste del modelo II-34 a las funciones de correlación de fluorescencia.

[HEPES] / mM	Tiempo de relajación / s	$\chi_r^2$
1.00	$7.55 \times 10^{-6}$	1.362
2.04	$6.64 \times 10^{-6}$	1.224
3.36	$4.79 \times 10^{-6}$	1.426
4.00	$3.92 \times 10^{-6}$	1.166
5.00	$4.22 \times 10^{-6}$	1.185

**Tabla III-26.** Tiempo total de relajación del equilibrio químico  $N \rightleftharpoons A$  del TG-II en disolución acuosa, en presencia de tampón trizma, a valor de pH de 6.00. Los resultados se obtuvieron por el modelo II-34 a las funciones de correlación de fluorescencia.

[Trizma] / mM	Tiempo protonación / s	$\chi_r^2$
0.06	$1.2 \times 10^{-5}$	1.062
2.38	$9.97 \times 10^{-6}$	1.216
3.21	$9.74 \times 10^{-6}$	1.182
3.80	$7.75 \times 10^{-6}$	1.204
4.50	$5.31 \times 10^{-6}$	1.239

Los resultados obtenidos en las medidas a nivel molecular, a través de la espectroscopía de correlación de fluorescencia, muestran que tanto el tampón HEPES como el trizma presentan una muy baja capacidad para la promoción de la transferencia protónica en el estado fundamental. A modo comparativo, la figura III-49 representa la inversa de los tiempos de relajación del tampón fosfato (con una alta pendiente) y de los tampones HEPES y trizma (con una baja pendiente), a igual valor de pH.



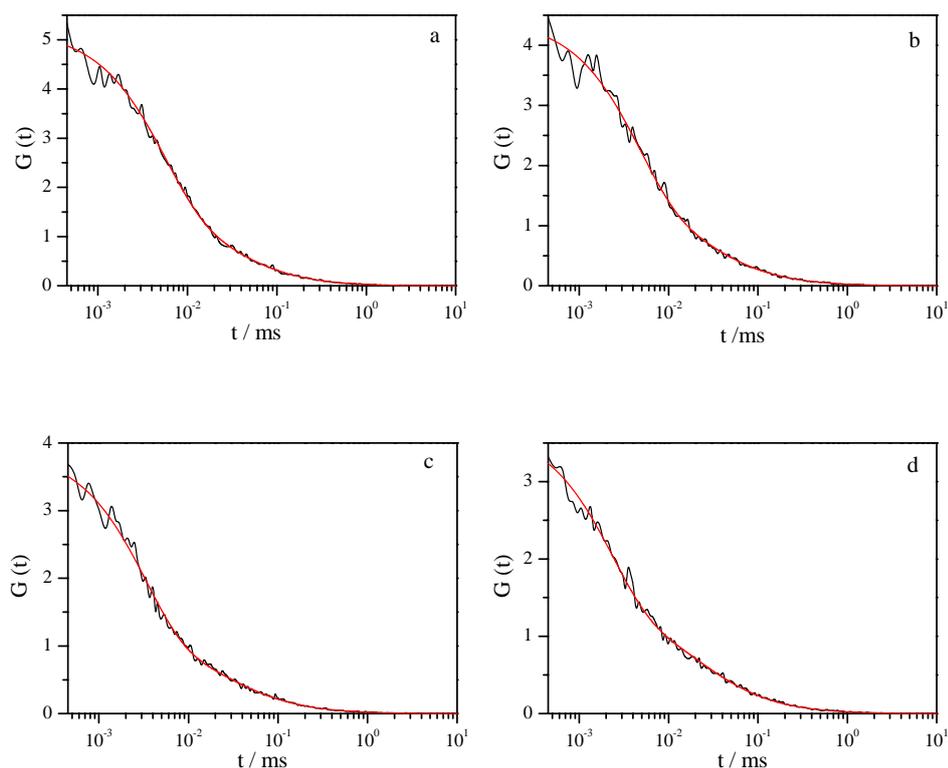
**Figura III-49. a)** Representación de la inversa de los tiempos de relajación en función de la concentración de tampón (●) fosfato, (●) HEPES y (●) trizma. La diferencia entre las pendientes de las rectas, indican la gran diferencia entre la efectividad para promover la transferencia protónica.

Como indicamos en el apartado anterior, la pendiente de la recta representa la eficacia como promotores de la transferencia de protones, y viene dada por la ecuación III-33 del apartado anterior. Por tanto, el valor de la pendiente viene determinado por el valor de las constantes  $k_{12}^B$  y  $k_{21}^B$ . La pendiente de la recta calculada para el tampón HEPES ha sido de  $(3.81 \pm 0.24) \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , para el tampón trizma de  $(1.9 \pm 0.3) \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  mientras que para el tampón fosfato, la pendiente calculada fue de  $2.80 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . Esta menor influencia de los tampones HEPES y trizma sobre el equilibrio químico del estado fundamental, resultará en menores valores de las constantes dependientes del tampón,  $k_{ij}^B$ , de tal manera que a nivel de conjunto, donde se utilizan concentraciones mayores de tampón, la reacción no se vuelve lo suficientemente rápida como para competir con la emisión fluorescente, y por tanto, sin observar reacción en el estado excitado.

III.7.2.5.2.-Influencia del tampón acético/acetato en el equilibrio químico  $N \rightleftharpoons A$ .

El tampón formado por el ácido acético y su base conjugada, el acetato, es también ampliamente empleado en estudios químicos, aunque su capacidad de tamponamiento se encuentra entre los valores de pH entre 4 y 6, en base a su valor de  $pK_a$  de 4.756 (*Lide, 2003*).

Es estudios anteriores se ha demostrado que el tampón es capaz de promover reacciones en el estado excitado en colorantes xanténicos (*Orte et al. 2005*), por lo tanto es también interesante estudiar su efecto sobre las funciones de correlación de nuestro fluoróforo TG-II. Para la realización de las curvas de correlación de fluorescencia del TG-II en disolución acuosa en presencia de tampón acetato se prepararon muestras de concentración 2 nM de TG-II a concentraciones crecientes de tampón acetato, en un rango de concentraciones similares a aquellas realizadas con tampón fosfato, y a dos valores de pH diferentes (5.50 y 5.70); manteniendo el tiempo de toma de datos de una hora y la intensidad de láser en 5.6  $\mu W$ .



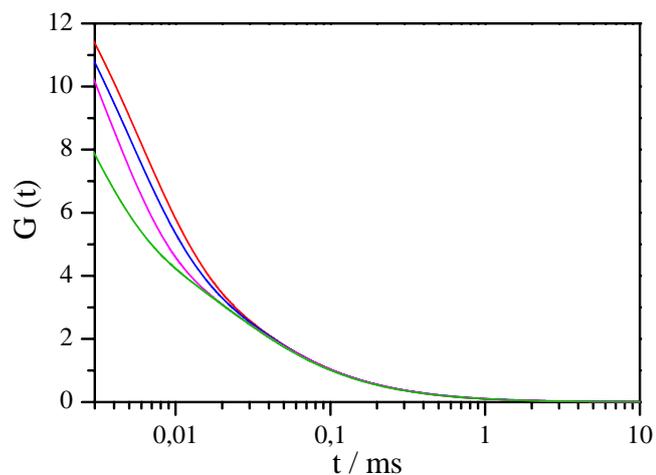
**Figura III-50.** Curvas de correlación de fluorescencia, obtenidas para el colorante TG-II, 2 nM, en disolución acuosa a concentraciones de tampón acetato crecientes: **a)** 0.237 mM, **b)** 0.367 mM, **c)** 0.740 mM y **d)** 1.180 mM, a pH 5.70. La línea roja representa la mejor curva de ajuste del modelo II-34 a la función de correlación de fluorescencia.

En la figura III-50, se muestran algunas de estas funciones de correlación de fluorescencia junto con las curvas de ajuste. Los resultados de los ajustes obtenidos se muestran en la tabla III-27, donde se representan los tiempos de relajación del equilibrio químico en presencia del tampón acetato, así como el parámetro estadístico de ajuste  $\chi_r^2$ . Cabe destacar que la relajación química en presencia del tampón acetato es aun mas rápida que en medios tamponados con fosfato.

**Tabla III-27.** Tiempo de relajación del equilibrio  $N \rightleftharpoons A$  del TG-II en disolución acuosa, en presencia de tampón acetato. Los resultados se obtuvieron por el ajuste del modelo II-34 a las funciones de correlación de fluorescencia.

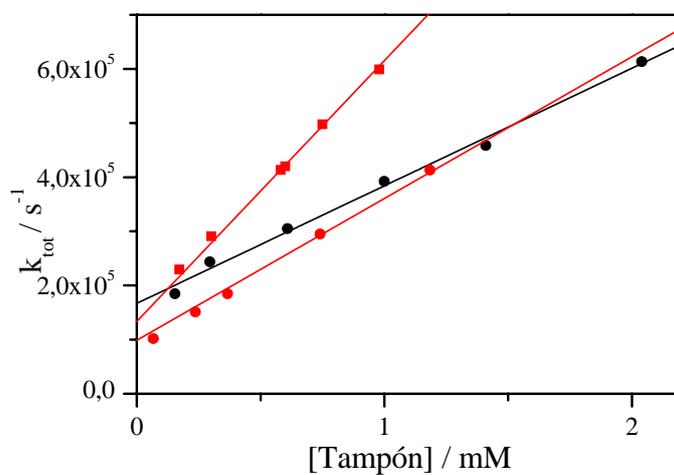
pH	[Acetato / mM]	Tiempo de relajación / s	$\chi_r^2$
5.50	0.172	$4.36 \times 10^{-6}$	1.346
	0.300	$3.44 \times 10^{-6}$	1.114
	0.390	$2.60 \times 10^{-6}$	1.317
	0.581	$2.42 \times 10^{-6}$	0.986
	0.585	$2.18 \times 10^{-6}$	1.409
	0.600	$2.38 \times 10^{-6}$	1.455
	0.750	$2.01 \times 10^{-6}$	1.144
	0.980	$1.67 \times 10^{-6}$	1.051
5.70	0.067	$9.81 \times 10^{-6}$	1.468
	0.237	$6.63 \times 10^{-6}$	1.269
	0.367	$5.42 \times 10^{-6}$	1.283
	0.740	$3.39 \times 10^{-6}$	1.036
	1.180	$2.42 \times 10^{-6}$	1.071

Los resultados obtenidos en las medidas a nivel molecular, a través de la espectroscopía de correlación de fluorescencia, muestra que el tampón acetato presenta una alta capacidad para la promoción de la transferencia protónica. Ya que las pendientes de las constantes totales obtenidas están en el mismo orden de magnitud que aquellas en presencia de tampón fosfato. En la figura III-51 se muestran a modo de ejemplo algunos de los ajustes a las funciones de correlación registradas para el TG-II en disolución acuosa y en presencia de concentraciones crecientes de tampón acetato a valor de pH de 5.70.



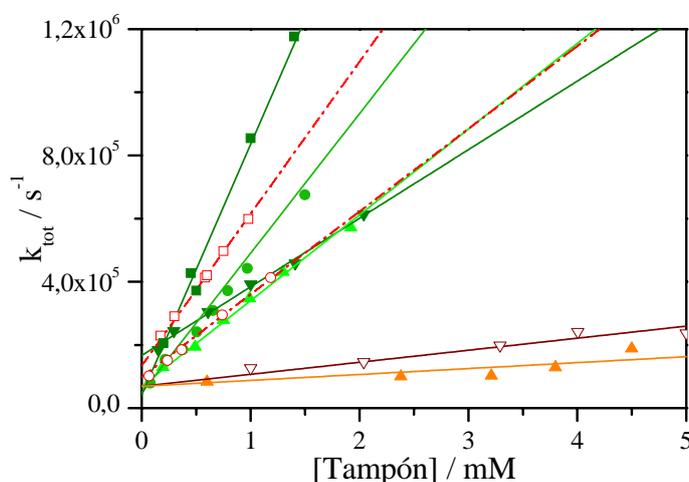
**Figura III-51.** Ajuste obtenido por medio de la ecuación II-38 a las funciones de correlación de fluorescencia del TG-II en disolución acuosa a valor de pH de 5.70 en presencia de tampón acetato a concentraciones de: (—) 0.237, (—) 0.367, (—) 0.740 y (—) 1.184 mM.

A modo comparativo, la figura III-52, representa la constante de relajación del tampón fosfato y del tampón acetato.



**Figura III-52.** Representación de la constante de relajación en función de la concentración de tampón fosfato (●) a pH 5.50 y acetato a valores de pH de 5.50 (■) y 5.70 (●). Las pendientes obtenidas se encuentran en el mismo orden de magnitud.

En suma, los resultados obtenidos a nivel molecular con los tampones acetato, trizma y HEPES se muestran en la figura III-53. En ella se recogen la inversa de los tiempos de relajación obtenidos en función de la concentración de tampón de cada una de las sustancias estudiadas en esta memoria. Estos resultados son concordantes con la teoría expuesta anteriormente, es decir, el tampón produce una influencia en el equilibrio químico tanto del estado fundamental como del excitado, siendo solo visible en el estado excitado a nivel de conjunto cuando la reacción es lo suficientemente rápida como para competir con la emisión fluorescente. Esto confirma la igual naturaleza de los procesos cinéticos del estado fundamental y del estado excitado.



**Figura III-53.** Dependencia de la  $k_{tot}$  para la reacción de transferencia protónica en el estado fundamental directa e inversa, en función del tampón añadido y su concentración, a varios valores de pH: (verde) tampón fosfato a valores de pH (■) 7.00, (●) 6.50, (▲) 6.00 y (▼) 5.50. (rojo) tampón acetato a valores de pH de: (□) 5.50 y (○) 5.70. Tampones HEPES (▽) y trizma (▲), ambos a valor de pH de 6.00. La estimación de la  $k_{tot}$  fue obtenida por medio del ajuste de la ecuación II-38 a las funciones de correlación de fluorescencia.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en esta Memoria, se ha comprobado un evidente comportamiento distinto entre los diferentes tampones. Esto puede deberse a la naturaleza química de los mismos y su capacidad para

promover enlaces de hidrógeno. Según Marcus, los iones fosfato y acetato pueden clasificarse como sustancias estabilizadoras de enlaces de hidrógeno; mientras que los tampones HEPES o trizma presentan un carácter desestabilizador de estructuras, y por consiguiente promueven menos enlaces de hidrógeno que el agua pura (Marcus, 1985). Otros autores también señalan que los iones de fosfato mejoran la transferencia protónica en agua (Turckeman et al., 1999, Zelent et al. 2006). Asimismo, estudios recientes por espectroscopía infrarroja han propuesto un modelo de transferencia protónica asistido por interacciones de enlaces de hidrógeno entre el agua y el tampón fosfato (Zelent et al. 2009). Teniendo en cuenta este modelo y las constantes de transferencia protónica obtenidas en esta Memoria, se puede sugerir una escala de tampones dependiendo de su capacidad donadora/aceptora de protones, relacionadas con su habilidad de ordenar o desorganizar el medio acuoso en términos de los enlaces de hidrógeno. Esta escala puede determinarse a través de las constantes de velocidad de transferencia protónica obtenidas por análisis de FCS de las fluctuaciones de fluorescencia de derivados xanténicos. Además, se ha demostrado que la reacción mediada por tampón causa una relajación química a tiempos cortos, haciendo que la función de correlación de fluorescencia, alrededor del valor de pH fisiológico, sea altamente sensible a la concentración de fosfato. Esta elevada sensibilidad junto con los cambios en los tiempos de vida de fluorescencia descritos en secciones anteriores podrían ser considerados como un método sensible y directo de investigar la concentración de fosfato ambiental, en volúmenes confinados, a valores de pH cercanos al fisiológico.

## *IV. Conclusiones*



A continuación, de acuerdo con los resultados experimentales obtenidos, con la bibliografía consultada y con la discusión que se ha efectuado en esta Memoria, se expondrán las conclusiones que se han podido establecer:

Por una parte, se han descrito los equilibrios ácido-base en estado fundamental de los fluoróforos 9-[1-(2-metoxi-5metilfenil)]-6-hidroxi-3H-xantén-3-ona (**Tokyo Green-I**) y 9-[1-(2-metil-4-metoxifenil)]-6-hidroxi-3H-xanten-3-ona (**Tokyo Green-II**), a través de medidas absorciométricas. Con respecto a estos estudios se pudo concluir:

- Se ha establecido la presencia de tres especies prototrópicas diferentes, a saber: catión, neutra y aniónica, en cada fluoróforo. Mediante la aplicación de la metodología de ajustes no lineales por mínimos cuadrados, se han calculado las dos constantes ácido-base implicadas en los equilibrios de cada colorante. Los resultados obtenidos fueron; para el Tokyo Green-I;  $pK_C = 3.01 \pm 0.03$  y  $pK_N = 6.04 \pm 0.03$ . Y para el Tokyo Green-II;  $pK_C = 3.01 \pm 0.03$  y  $pK_N = 5.97 \pm 0.02$ .

- Asimismo, empleando la metodología de análisis utilizada, se obtuvieron los perfiles espectrales de absorción de las tres especies prototrópicas de los dos fluoróforos estudiados, así como los coeficientes de absorptividad molar de cada una de ellas.

Por otro lado, el comportamiento en estado excitado de los colorantes y su efecto en los equilibrios ácido – base se estudió mediante fluorimetría en estado estacionario y con resolución temporal. De los mencionados estudios se obtuvieron las siguientes conclusiones:

- Se estudió el efecto de la variación del pH en los espectros de emisión de fluorescencia, y se obtuvieron los perfiles de emisión de fluorescencia de las tres especies prototrópicas. Por un lado, el análisis de las curvas de intensidad de fluorescencia ha demostrado el carácter de “super-fotoácido” de la especie catiónica de ambos colorantes. Por otro lado, pudo concluirse que en ausencia de aceptor/dador adecuado no se produce reacción de intercambio protónico en el estado excitado entre las especies neutra y aniónica. Por lo tanto, en estas condiciones las curvas de intensidad de fluorescencia frente al pH reportan información sobre el  $pK_N$  del estado fundamental.

- Junto con medidas absorciométricas, se estudió en detalle la influencia de la fuerza iónica sobre el valor del  $pK_a^{app}$  aparente de los colorantes Tokyo Green-I y Tokyo Green-II. De los resultados obtenidos se concluyó que el valor del  $pK_a^{app}$  aumenta ligeramente con la subida de la fuerza iónica. (de ~6.2 a ~6.7 para el TG-I y de ~6.2 a ~6.5 para el TG-II), por comparación, este efecto es muy reducido; ya que en este caso, el número de cargas de las especies prototrópicas envueltas en el equilibrio químico es reducido, haciendo el valor de  $pK_a^{app}$  menos sensible a la concentración salina.

También se ha estudiado el efecto de un aceptor/dador protónico, como es el sistema tampón fosfato, sobre los equilibrios ácido-base, así como su capacidad para promover la reacción de transferencia protónica en el estado excitado entre las especies neutra y aniónica de los colorantes Tokyo Green-I y Tokyo Green-II. Sobre este punto se han establecido las siguientes conclusiones:

- La adición del sistema tampón fosfato no tiene efectos significativos sobre los espectros de absorción y las leves alteraciones

encontradas han podido asignarse a efectos de la fuerza iónica. Por lo tanto, la adición del mencionado tampón no modifica el estado fundamental de los colorantes Tokyo Green-I y Tokyo Green-II.

- En cambio, la adición de concentraciones crecientes del aceptor/dador protónico origina una mayor contribución de la especie neutra en los espectros de emisión. Esto demuestra que las especies del tampón se comportan como aceptor y dador de protones adecuado, en la transferencia protónica en el estado excitado de las especies neutra y aniónica de los colorantes Tokyo Green-I y Tokyo Green-II.

- La cinética de la reacción de transferencia protónica en el estado excitado entre las especies neutra y aniónica de los colorantes Tokyo Green-I y Tokyo Green-II promovida por tampón fosfato, 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 las constantes que rigen el sistema de equilibrio de: para el **Tokyo Green-I**;  $k_{01} = (12.9 \pm 0.3) \times 10^9 \text{ s}^{-1}$  (correspondiendo a un tiempo de vida de la especie neutra de  $78 \pm 2 \text{ ps}$ ),  $k_{02} = (0.421 \pm 0.003) \times 10^9 \text{ s}^{-1}$  (lo que representa un tiempo de vida de la especie aniónica de  $2.38 \pm 0.02 \text{ ns}$ ),  $k_{21} = (0.003 \pm 0.003) \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,  $k_{12}^B = (0.640 \pm 0.041) \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  y  $k_{21}^B = (0.0261 \pm 0.0053) \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . Y para el **Tokyo Green-II**;  $k_{01} = (5.2 \pm 0.2) \times 10^9 \text{ s}^{-1}$  (tiempo de vida de fluorescencia de la forma neutra de  $192 \pm 7 \text{ ps}$ ),  $k_{02} = (0.271 \pm 0.002) \times 10^9 \text{ s}^{-1}$  (tiempo de vida de fluorescencia del anión de  $3.69 \pm 0.03 \text{ ns}$ ),  $k_{21} = (0.011 \pm 0.009) \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,  $k_{12}^B = (0.38 \pm 0.01) \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  y  $k_{21}^B = (1.8 \pm 0.7) \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ .

- La excelente concordancia entre los parámetros espectrales recuperados en el análisis global compartimental 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.

Finalmente, el efecto del aceptor/dador protónico sobre los equilibrios ácido – base en estado fundamental se ha estudiado para el colorante Tokyo Green-II a nivel molecular, a través de técnicas de espectroscopía de fluorescencia de moléculas individuales y espectroscopía de correlación de fluorescencia (FCS). Las conclusiones a las que se llegaron son las siguientes:

- La técnica TTTR permite reconstruir decaimientos de fluorescencia a partir de medidas de FCS. Así, se han recuperado los tiempos de vida de fluorescencia a nivel molecular en presencia de distintas concentraciones de tampón fosfato, estando en muy buena concordancia con aquellos obtenidos a nivel de conjunto por análisis global y análisis global compartimental de los decaimientos de fluorescencia.

- Se ha mostrado que la reacción mediada por el tampón fosfato, causa una relajación química a tiempos muy cortos, de manera que la modificación en la función de correlación de fluorescencia es altamente sensible a la adición de tampón fosfato alrededor del valor de pH fisiológico.

- El análisis de los tiempos de protonación mediante los ajustes de las curvas de correlación de fluorescencia ha permitido recuperar las constantes del equilibrio químico del estado fundamental, tanto de las reacciones que no implican la presencia de un aceptor/dador protónico, como de aquellas mediadas por tampón fosfato, obteniéndose los siguientes resultados:  $k_{12} = (2.99 \pm 0.03) \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,  $k_{21} = (3.90 \pm 0.04) \times 10^4 \text{ s}^{-1}$ ,  $k_{12}^B = (1.77 \pm 0.07) \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  y  $k_{21}^B = (1.77 \pm 0.03) \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ .

- La similitud de los valores de las constantes cinéticas de intercambio protónico mediado por las especies del tampón fosfato tanto en

estado fundamental (obtenidas por FCS) como en estado excitado (obtenidas por GCA a nivel de conjunto) confirma la igual naturaleza del proceso. Es decir, la cinética del intercambio protónico mediado por el tampón fosfato es independiente del estado fundamental o excitado del fluoróforo.

- Además, se han utilizado otros aceptores/dadores de protones para comprobar que la naturaleza del mismo tiene un efecto crucial en la cinética de estas reacciones, en particular la habilidad para generar enlaces de hidrógeno.



## *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.; Catalán, J.; Costela, A.; Dhoula, 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).
- Agmon, N. *J. Phys. Chem. A* **109**, 13 (2005).
- Agmon, N, *J. Chem. Phys.* **88**, 5639 (1988).
- Ainsworth, S. *J. Phys. Chem.* **65**, 1968 (1961).
- Al-Soufi, W.; Novo, M.; Mosquera, M. *Appl. Spectrosc.* **55**, 630 (2001).
- Alvarez-Pez, J. M.; Ballesteros, L.; Talavera E. M.; Yguerabide, J. J. *Phys. Chem. A* **105**, 6320 (2001).
- 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).
- Ameloot, M. *Methods Enzymol.*, **210**, 237 (1992).
- Ameloot, M.; Beechem, J. M.; Brand, L. *Chem. Phys. Lett.* **129**, 211 (1986).
- 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. Photochem. Photobiol. A* **75**, 1 (1993).
- Arnaut, L. G.; Formosinho, S. J. *J. Phys. Chem.* **92**, 685 (1988).
- 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).
- Baicu, S. C.; Taylor, M. J. *Cryobiology*, **45**, 33 (2002).
- 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.; Hidalgo, J.; Guardado, P.; Muñoz, M. A.; Carmona, C. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **2**, 91 (1993).
- Balón, M.; Muñoz, M. A.; Hidalgo, J.; Carmona, M. C.; Sánchez, M. J. *Photochem.* **36**, 193 (1987).
- Bard, Y. En *Nonlinear Parameter Estimation*, Academic Press, New York, 201 (1974).
- Bardez, A.; Chatelain, A.; Larrey, B.; Valeur, B. *J. Phys. Chem.* **98**, 2357 (1994).
- 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).
- Becquerel, H. *Acad. Sci. (Paris)* **122**, 420 (1896).
- Beechem, J. M. *Methods Enzymol.*, **210**, 37 (1992).
- Beechem, J. M.; Ameloot, M.; Brand, L. *Anal. Instrum.* **14**, 379 (1985).
- 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).
- Berland, K. M.; So, P. T. C.; Chen, Y.; Mantulin, W. W.; Gratton, E. *Biophys. J.* **71**, 410 (1996).
- 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).

- Betzig, E.; Chichester, R. J. *Science* **262**, 1422 (1993).
- Bevington, P.; Robinson, D. K. *Data Reduction and Error Analysis for the Physical Sciences*, 2<sup>a</sup> ed., McGraw-Hill, New York (1993).
- Bian, R. X.; Dunn, R. C.; Xie, X. S. *Physical Review Letters* **75**, 4772 (1995).
- Birch, D. J. S.; Hungerford, G.; Imhof, R. E.; *Rev. Sci. Instrum.* **62**, 2045 (1991).
- 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.; McLoskey, D.; Sanderson, A.; Suhling, K.; Holmes, A.S. *J. Fluores.*, **4**, 91 (1994).
- Bkaity, G.; Jacques, D.; Pothier, P. *Methods Enzymol.* **307**, 119 (1999).
- Blakeslee, D.; Baines, M.G. *J. Immunol. Methods*, **13**, 305 (1976).
- Boens, N. Ameloot, M. Yamazaki, I. De Schryver, F. C. *Chem. Phys.* **121**, 73 (1988).
- Boens, N. *In Luminescence Techniques in Chemical and Biochemical Analysis*; Baeyens, W. R. G., De Keukeleire, D., Korkidis, K., Eds.; Marcel Dekker: New York, 21 (1991).
- 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.; Alvarez-Pez, J. M. *J. Phys. Chem. A* **108**, 8180 (2004).
- Boens, N.; De Schryver, F. C. *Chem. Phys.* **325**, 461 (2006).
- 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.; Novikov, E.; Van der Auweraer, M. *Math. Bio.* **209**, 624 (2007).
- Boens, N.; Qin, W.; Basarić, N.; Orte, A.; Talavera, E. M.; Alvarez-Pez, J. M. *J. Phys. Chem. A* **110**, 9334 (2006).
- 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).
- Bohmer, M.; Wahl, M.; Rahn, H. J.; Erdmann, R.; Enderlein, J. *Chem.*

*Phys. Lett.* **353**, 439 (2002).

- Bollinger L. M.; Thomas, G. E. *Rev. Sci. Instr.* **32**, 1044 (1961).
- Bonnet, G.; Krichevsky, O.; Libchaver, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 8602 (1998).
- Boutot, J. P.; Delmonte, 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).
- Brand, L.; Laws, W. R. *NATO ASI Ser., Ser. A* **69**, 319 (1983).
- Brigham, K.L.; Meyrick, B.; Berry, L.C.; Repine, J.E. *J. Al. Physiol.*, **63**, 840 (1987).
- Brochon, J. C.; *Methods Enzymol.* **240**, 262 (1994).
- Brownelly, 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.; Clarck, 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).
- Chapple, M.R.; Johnson, G.D.; Davidson, R.S. *J. Microsc.*, **159**, 254 (1990).
- Chan, M.S.; Bolton, J.R. *Solar Energ.*, **24**, 561 (1980).
- Chattopadhyay, N. *Int. J. Mol. Sci.* **4**, 460 (2003).
- Chattopadhyay, N. *J. Photochem. Photobiol. A* **88**, 1 (1995).
- Chattopadhyay, N. J.; Chowdury, M. *J. Photochem.* **38**, 301 (1987).
- Chattopadhyay, N.; Chakraborty, T.; Nag, A.; Chowdhury, M. *J. Photochem. Photobiol. A.* **52**, 199 (1990).
- 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).
- Cielen, E.; Stobiecka, A.; Tahri, A.; Hoornaert, G. J.; De Schryver, F. C.; Gallay, J.; Vincent, M.; Boens, N. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1197 (2002).
- Cielen, E.; Tahri, A.; Ver Heyen, K.; Hoornaert, G. J.; De Schryver F. C.; Boens, N. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1573 (1998).
- Clark, J. H. Shapiro, S. L.; Campillo, A. J.; Winn, K. R. *J. Am. Chem. Soc.* **101**, 746 (1979).
- Clark, M.; Cramer, R. D., III; Van Opdenbosch, N. *J. Comput. Chem.* **10**, 982 (1989).
- 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).
- 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.; Alvarez-Pez, J. M. *Luminiscence* **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. B* **108**, 6082 (2004).
- Crovetto, L.; Paredes, J. M.; Rios, R.; Talavera, E. M.; Alvarez-Pez, J. M. *J. Phys. Chem. A* **111**, 13311 (2007).
- Crovetto, L.; Rios, R.; Alvarez-Pez, J.M.; Paredes, J. M.; Lozano-Velez, P.; del Valle, C.; Talavera, E. M. *J. Phys. Chem. B*, **112**, 10082 (2008).
- Cukier, R. I.; Zhu, J. *J. Chem. Phys.* **110**, 9587 (1999).
- Culbertson, C. T.; Jacobson, S. C.; Ramsey, J. C.; *Talanta* **56**, 365 (2002).

## D

- Davenport, L.M 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).
- Demas, J.N.; Crosby, G.A. *J. Phys. Chem.* **75**, 991 (1971).
- Deniz, A. A.; Dahan, M.; Grunwell, J. R.; Ha, T. J.; Faulhaber, A. E.; Chemla, D. S.; Weiss, S.; Schultz, P. G. *PNAS* **96**, 3670 (1999).
- Denk, W.; Strickler, J. H.; Webb, W. W. *Science*, **248**, 73 (1990).
- 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).
- Dias, F. B.; Lima, J. C.; Maçanita, A. L.; Horta, A.; Piérola, I. F. *J. Phys. Chem. A* **104**, 17 (2000).
- Diehl, H.; Horchak-Morris, N. *Talanta* **34**, 739 (1987).
- Diehl, H.; Horchak-Morris, N.; Hefley, A. J.; Munson, L. F.; Markuszewski, R. *Talanta* **33**, 901 (1986).
- Diehl, H.; Markuszewski, R. *Talanta* **32**, 159 (1985).
- Dimitriadis, G.; Drysdale, A.; Myers, J. K.; Arora, P.; Radford, S. E.; Oas, T. G.; *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 3809 (2004).
- 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).
- Dovichi, N. J.; Martin, J. C.; Jett, J. H.; Keller, R. A. *Science* **219**, 845 (1983).
- Draper, N. R.; Smith, R. En *Alied Regression Analysis*, 2<sup>a</sup> ed., Wiley, NewYork, 153 (1981).
- Draxler, S.; Lippitsch, 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).

- Edel, J. B.; Eid J. S.; Meller, A. *J. Phys. Chem. B* **111**, 2986 (2007).
- Eisenfeld, J.; Ford, C. C. *Biophys. J.* **26**, 73 (1979).
- Ellouze, C.; Piot, F.; Takahashi, M. *J. Biochem.*, **121**, 521 (1997).
- Elsaesser, T. En *Femtosecond Chemistry*, (Manz, J; Woste L. Eds.) VCH, Weinheim (1995).
- Escabi-Pérez, J. R.; Fendler, J. H. *J. Am. Chem. Soc.* **100**, 2234 (1978).

## F

- Feldhaus, M. J.; Siegel, R.W.; Opreco, L.K.; Coleman, J.R.; Weaver-Feldhaus, J.M.; Yeung Y.A.; Cochran, J.R.; Heinzelman, P.; Colby, D.; Swers, J.; Graff, C.; Wiley, H. S.; Wittrup K.D. *Nat. Biotech.*, **21**, 163 (2003)
- 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. Scheiner, S. *Chem. Phys.* **246**, 65 (1999).
- Forés, M.; Durán, M.; Solà, M. *Chem. Phys.* **260**, 53 (2000).
- Formosinho, S.J.; Arnaut, L.G. *J. Photochem. Photobiol., A*, **75**, 21 (1993).
- Förster, T. *Z. Elektrochem.*, **54**, 42 (1950).
- Frauenfelder, H.; McMahon, B. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **95**, 4795 (1998).
- Freeman, B.A.; Rosen, G.M.; Barber, M.J. *J. Biol. Chem.*, **261**, 6590 (1986).
- 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).
- Gasteiger, J.; Marsili, M. *Org. Magn. Reson.* **15**, 353 (1981).
- Gasteiger, J.; Marsili, M. *Tetrahedron* **36**, 3219 (1980).
- Gell, C.; Brockwell, D. J.; Beddard, G. S.; Radford, S.E.; Kalverda, A. P.; Smith D. A. *Single Mol.* **3**, 177 (2001).
- Gell, C.; Brockwell, D. J.; Smith, A. *Handbook of Single Molecule Fluorescence Spectroscopy* Oxford University Press (2006).
- Genosar, L.; Cohen, B.; Huppert, D. *J. Chem. Phys. A.* **104**, 6689

(2000).

- George, L.D.; Ponta, G.M. *Eng. Geol.*, **65**, 159 (2002).
- Ghiggino, 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 Al. Chem.*, **9**, 507 (1964).
- Gong, B.; Gong, G. *Anal. Chim. Acta*, **394**, 171 (1999).
- Goudier, I.; Del Rio, M.; Crabbé, L.; Copois, V.; Ychou, M.; Auffray, C.; Martineau, P.; Mechtí, N.; Pommier, Y.; Pau, B. *FEBS Letters*, **529**, 232 (2002).
- Gratama, J.W.; Kraan, J.; Levering, W.; Vanbockstaele, D.R.; Rijkers, G.T.; Vanderschoot, C.E. *Cytometry*, **30**, 109 (1997).
- Grinvald, A.; Kubinyi, M.; Ruzsinszky, A.; Veszpremi, T.; Jones W. J. *J. Mol. Struct.* **555**, 15 (2000).
- Grinvald, A.; Steinberg, I.Z. *Anal. Biochem.*, **59**, 583 (1974).
- Grofcsik, A.; Kubinkyi, 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.; Lokawicz, J. R. *Biospectroscopy* **2**, 9 (1996).
- Gurunathan, K.; Levitus, M. *J. Phys. Chem. B* **114**, (2) 980 (2010)
- Guyot, G.; Arnaud, R.; Lemaire, J. *J. Chem. Phys.* **72**, 648 (1975).

## H

- Ha, T.; Enderle, T.; Ogletree, D. F.; Chemla, D. S.; Selvin, P. R.; Weiss, S. *PNAS* **93**, 6264 (1996).
- Ha, T. J.; Ting, A. Y.; Liang, J.; Caldwell, W. B.; Deniz, A. A.; Chemla, D. S.; Schultz, P. G.; Weiss, S. *PNAS* **96**, 893(1999).
- 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, 9th ed.*, Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, USA (2002).

- Haupts, U; Maiti, S.; Schwille P.; Webb, W. W. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 13573 (1998).
- Haustein, E.; Schwille P. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **36**, 151 (2008).
- 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).
- Hess, S. T.; Huang, S. H.; Heikal, A.A.; Webb, W. W. *Biochemistry* **41**, 697 (2002).
- Hillisch, A.; Lorenz, M.; Diekmann, S. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **11**, 201 (2001).
- Hoffman, J.; Sernetz, M. *Anal. Biochem.*, **131**, 180 (1983).
- Houghtan, R.W. *J. Marine Syst.*, **37**, 31 (2002).
- Houston, B.; Peddie, D. *Anal. Biochem.*, **177**, 263 (1989).
- Howort, J. R.; Ferguson, I.; Wilcox, D. *Proc. SPIE* **2388**, 356 (1995).
- Htun, M. T. *Chem. Phys. Lett.* **328**, 437 (2000).
- Htun, M. T.; Suwaiyan, A.; Baig, A.; Klein, U. K. A. *Chem. Phys. Lett.* **243**, 71 (1995).
- Htun, M. T.; Suwaiyan, A.; Baig, A.; Klein, U. K. A. *Chem. Phys. Lett.* **264**, 285 (1997).
- Htun, M. T.; Suwaiyan, A.; Baig, A.; Klein, U. K. A. *J. Phys. Chem. A* **102**, 8230 (1998).
- Htun, T. *J. Fluoresc.* **13**, 323 (2003).
- Huang, W.E.; Smith, C.C.; Lerner, D.N.; Thronton, S.F.; Oram, A. *Water Research*, **36**, 1843 (2002).
- Huang, Z. *Biochemistry*, **30**, 8535 (1991).
- Huang, Z.; Thompson, N. L. *Biophys. J.* **70**, 2001 (1996).
- 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.; Kuzmi, M. G. *J. Phys. Chem.* **95**, 3438 (1991).
- Illsley, N. P.; Verkman, A. S. *Biochemistry* **26**, 1215 (1987).
- Inoue, K.; Okumura, H.; Higuchi, T.; Oka, H.; Yoshimura, Y.;

Nakazawa, H. *Clin. Chim. Acta*, **325**, 157 (2002).

- Irchfield, T. (a) *Applied Optics* **15**, 2965 (1976).
- Irchfield, T. (b) *Applied Optics* **15**, 3135 (1976).
- 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).
- Jankowski, A. Dobryszyci, P.; Lipiski, J.; Stefanowicz, P. *J. Fluoresc.* **8**, 103 (1998).
- Jankowski, A.; Stefanowicz, P. *J. Photochem. Photobiol. A.* **84**, 143 (1994).
- Jankowski, A.; Stefanowicz, P.; Dobryszyci, P. *J. Photochem. Photobiol. A* **69**, 57 (1992).
- Jankowski, A.; Wicz, 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).
- Jia, Y. W.; Talaga, D. S.; Lau, W. L.; Lu, H. S. M.; DeGrado, W. F.; Hochstrasser, R. M. *Chem. Phys.* **247**, 69 (1999).
- 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, M.; Kobayashi, T.; Hama, Y.; Koyama, Y.; Bernardo, M.; Nagano, T.; Choyke, P. L.; Urano, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 3918 (2007).
- Kaneko, S.; Yotoriyama, S.; Koda, H.; Tobita, S. *J. Phys. Chem. A* **113** (13), 3021 (2009).
- Kankare, J. J. *Anal. Chem.* **42**, 1322 (1970).
- Kapusta, P.; Patting, M.; *PicoQuant Application Note*, <http://www.picoquant.com> (2008).
- Kapusta, P.; Wahl, M.; Benda, A.; Hof, M.; Enderlein, J. *J. Fluoresc.* **17**, 43 (2007).
- 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).
- Kawata, Y.; Xu, C.; Denk, W. *J. Appl. Phys.* **85**, 1294 (1999).
- 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 Scryver, 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).
- Klöpffer, W. *Adv. Photochem.* **10**, 311 (1977).
- Knutson, J. R.; Beechem, J. M.; Brand, L. *Chem. Phys. Lett.* **102**, 501 (1983).
- Kobayashi, T.; Urano, Y.; Kamiya, M.; Ueno, T.; Kojima, H.; Nagano, T. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 6696 (2007).
- Koide, Y.; Urano, Y.; Kenmoku, S.; Kojima, H.; Nagano, T. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 10324 (2007).
- Koppel, D. E. *Phys. Rev. A* **10**, 1938 (1974).
- Kowalczyk, A.; Boens N.; Ameloot, M.; *Methods Enzymol.* **278**, 94 (1997).
- 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).
- Krämer, B.; Koberling, F.; *PicoQuantApplication Note*, <http://www.picoquant.com> (2006).
- Krichevsky, O.; Bonnet, G. *Rep. Prog. Phys.* **65**, 251 (2002).
- Kumar, S.; Ma, B.; Tsai, C. J.; Sinha, N.; Nussinov, R. *Protein Sci.* **9**, 10 (2000).
- 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.; Balter, A. *Chem. Phys. Lett.* **92**, 117 (1982).
- Lakowicz, J. R.; Gruczynski, I. *J. Fluoresc.* **2**, 247 (1992).
- Lakowicz, J. R.; Gruczynski, I.; Danielsen, E. *Chem. Phys. Lett.* **191**, 47 (1992).
- Lakowicz, J. R.; *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Kluwer Academic/Plenum Publisher, New York (1999).
- Lamb, D. C.; Schenk, A.; Röcker, C.; Scalfi-Happ, C.; Nienhaus, G. U. *Biophys. J.* **79**, 1129 (2000).
- 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).
- 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).
- Leger, J. F.; Robert, J.; Bourdieu, L.; Chatenay, D.; Marko, J. F. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **95**, 12295 (1998).
- Leonhardt, H.; Gordon, L.; Livingston, T. *J. Phys. Chem.* **75**, 245 (1971).
- Levene, M.; Larson, D.; Korlach, J.; Foquet, M.; Turner, S. W.; Craighead, H. G.; Webb, W. W. *Biophys. J.* **78**, 2368 (2000).
- 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, 84th Edition*. CRC Press, Inc., Florida (2003).
- Lima, J. C.; Abreu, I.; Brouillard, R.; Maçanita, A. L. *Chem. Phys. Lett.* **298**, 189 (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).
- 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, E.; Kelsey, M. S. *Anal. Chem.* **46**, 855 (1974).
- Lytle, F. E.; Dinke, D. M.; Fisher, W. G. *Appl. Spectrosc.* **47**, 2002 (1993).

## 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).
- Macklin, J. J.; Trautman, J. K.; Harris, T. D.; Brus, L. E. *Science* **272**, 255 (1996).
- Magde, D.; Elson, E. L.; Webb, W. W. *Biopolymers* **29**, 705 (1972).
- Makrigiorgos, G.M.; Kassis, A.I.; Mahmood, A.; Bump, E.A.; Savvides, P. *Free Radical Biol. Med.*, **22**, 93 (1997).
- Malval, J. P.; Diemer, V.; Savary, F. M.; Jaques, P.; Allonas, X.; Chaumeil, H.; Defoin, A.; Carré, C. *Chem. Phys. Lett.* **455**, 238 (2008).
- Marcus, Y. *Ion Solvation*. Willey, Chichester. (1985).
- Marquardt, D. W. *J. Soc. Indust. Al. Math.* **11**, 431 (1963).
- Martin, M.; Lindqvist, L. *J. Lumin.* **10**, 381 (1975).
- Martynov, I. Y.; Demyashkeevich, A. B.; Kuzmin, M. G. *Russ. Chem. Rev.* **46**, 1 (1977).
- Mashanov, G. I.; Tacon, D.; Knight, A. E.; Peckham, M.; Molloy, J. E. *Methods* **29**, 142 (2003).
- Mashanov, G. I.; Tacon, D.; Peckham, M.; Molloy, J. E. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 15274 (2004).
- 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.; Cotlet, M.; Hofkens, J.; Gensch, T.; De Schryver, F. C.; Schaffer, J.; Seidel, C. A. M. *Anal. Chem.* **73**, 2078 (2001).
- Maus, M.; Rousseau, E.; Cotlet, M.; Schweitzer, G.; Hofkens, J. Van der Auweraer, M.; De Schryver, F. C. *Rev. Sci. Instrum.* **72**, 36 (2001).
- 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.; 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).
- Meuwis, K.; Depuydt, G.; Boens, N.; De Schryver, F. C. (a) *Chem. Phys. Lett.*, **246**, 641 (1995).
- Miller, D.S.; Barnes, D.M.; Pritchard, J.B. *Amer. J. Physiol.*, **267**, R16 (1994).
- Miller, E.; Tulyanthan, O.; Isacoff, E. Y.; Chang, C. J. *Nat. Chem. Biol.* **3**, 263 (2007).
- Minta, A.; Kao, J. P. Y.; Tsien, R. Y. *J. Biol. Chem.* **264**, 8171 (1989).
- Minta, A.; Tsien, R. Y. *J. Biol. Chem.* **264**, 19449 (1989).
- Miralles, E.; Prat, D.; Compano, R.; Granados, M. *Analyst*, **122**, 553 (1997).
- Mirończyk, A.; Jankowski, A. *J. Photochem. Photobiol. A* **153**, 89 (2002).
- Mishra, A. K.; *Mol. Supramol. Photochem.* **8**, 577 (2001).
- Miura, T.; Urano, Y.; Tanaka, K.; Nagano, T.; Ohkubo, K.; Fukuzumi, S. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 8666 (2003).
- Moerner, W. E.; Kador, L. (a) *Analytical Chemistry* **61**, A1217 (1989).
- Moerner, W. E.; Kador, L. (a) *Physical Review Letter* **61**, 2535 (1989).
- Montcourrier, P.; Mangeat, P.H.; Valembos, C.; Salazar, G.; Sahuquet, A.; Duperray, C.; Rochefort, H. *J. Cell. Sci.*, **107**, 2381 (1994).
- Montero, R.; Castaño, F.; Martínez, R.; Longarte, A. *J. Phys. Chem. A*, **113**, 952 (2009).
- Montero, R.; Longarte, A.; Martínez, R.; Sánchez-Rayó, M.N.; Castaño, F. *Chem. Phys. Lett.*, **468**, 134 (2009).
- 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).
- Munkholm, C.; Parkinson, D. R.; Walt, D. R. *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 2608 (1990).
- Murao, T.; Yamazaki, I.; Yoshihara, K. *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).

- Nguyen, D. C.; Keller, R. A.; Trkula, M. *Journal of the Optical Society of America B-Optical Physics* **4**, 138 (1987).
- 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. *Tesis Doctoral*, Universidad de Granada (2004).
- Orte, A.; Bermejo, R.; Talavera, E. M.; Crovetto, L.; Alvarez-Pez, J. M. *J. Phys. Chem. A* (b) **109**, 2840 (2005).
- Orte, A.; Crovetto, L.; Bermejo, R.; Talavera, E. M.; Álvarez-Pez, J. M. *Luminiscence* **17**, 233 (2002).
- Orte, A.; Crovetto, L.; Talavera, E. M.; Boens, N.; Alvarez-Pez, J. M. *J. Phys. Chem. A* (a) **109**, 734 (2005).
- Orte, A.; Talavera, E. M.; Maçanita, A. L.; Orte J. C.; Alvarez-Pez, J. M. *J. Phys. Chem. A* (c) **109**, 8705 (2005).
- Ohsugi, Y.; Saito, K.; Tamura, M.; Kinjo, M. *Biophys. J.* **91**, 3456 (2006).

**P**

- Palmer, A. G.; Thompson, N. L.; *Biophys. J.* **51**, 339 (1987).
- Pappayee, N.; Mishra, A. K. *Spectrochim. Acta, Part A* **56A**, 1027 (2000).
- Paradiso, A. M.; Tsien, R. Y.; Machen, T. E. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **81**, 7436 (1984).
- Pardo, A.; Reyman, D.; Martín, E.; Poyato, J. M. L. *J. Lumin.* **51**, 269 (1992).
- Paredes, J. M.; Crovetto, L.; Rios, R.; Orte, A.; Alvarez-Pez, J. M.; Talavera, E. M. *Phys. Chem. Chem. Phys.* DOI:10.1039/B820742A. (2009).
- 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).
- Petersen, N. O. *Biophys. J.* **49**, (1986).

- Petersen, N. O.; Hoddellius, P. L.; Wiseman, P. W.; Seger, O.; Magnusson, K. E. *Biophys. J.* **49**, 1135 (1993).
- Petersen, N. O.; Johnson, D. C.; Schlesinger, M. J. *Biophys. J.* **49**, 809 (1986).
- Petrov, V.; Seifert, F.; Noack, F. *Al. Phys. Lett.*, **65**, 268 (1994).
- Pina, F.; Melo, M. J.; Alves, S.; Ballardini, R.; Maestri, M.; Passaniti, P. *New J. Chem.* **25**, 747 (2001).
- Pina, F.; Melo, M. J.; Bernardo, M. A.; Luis, S. V.; García-España, E. *J. Photochem. Photobiol. A* **236**, 65 (1999).
- Pines, E.; Fleming, G. R. *J. Phys. Chem.* **95**, 10448 (1991).
- Pines, E.; Huppert, D. (a) *Chem. Phys. Lett.* **126**, 88 (1986).
- Pines, E.; Huppert, D. (b) *J. Chem. Phys.* **88**, 5620 (1988).
- Pines, E.; Huppert, D. (b) *J. Chem. Phys.*, **84**, 3576 (1986).
- Pines, E.; Magnes, B. Z.; Lang, M.; Fleming, G. R. *Chem. Phys. Lett.* **281**, 413 (1997).
- Politi, M. J.; Brandt, O.; Fendler, J. H. *J. Phys. Chem.* **89**, 2345 (1985).
- Pollack, L.; Tate, M. W.; Darnton, N. C.; Knight, J. B.; Gruner, S. M.; Eaton, W. A.; Austin, R. H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 10115 (1999).
- Poltl, R.; Luckenbach, C.; Fimmers, R.; Ritter, H. *Electrophoresis*, **18**, 2871 (1997).
- Pouget, J.; Mugnier, J.; Valeur, B. *J. Phys. E* **22**, 855 (1989).
- Powell, M. J. *D. Math. Prog.* **12**, 241 (1977).
- Prater, M.R.; Gogal, R.M.; Blaylock, B.L.; Longstreth, J.; Holladay, S.D. *Food Chem. Toxicol.* **40**, 1863 (2002).
- Petrásek, Z.; Hoege, C.; Mashaghi, A.; Ohrt, T.; Hyman, A. A.; Schwille, P. *Biophys. J.* **95**, 5476 (2008).
- Petrásek, Z.; Schwille, P. *Biophys. J.* **94**, 1437 (2008).
- Purkayastha, P.; Bera, S. Ch.; Chattopadhyay, N. *J. Mol. Liq.* **88**, 33 (2000).

## R

- Rami, B. R.; Udgaonkar, J. B. *Biochemistry* **40**, 15267 (2001).
- Regel, R.H.; Ferris, J.M.; Ganf, G.G.; Brookes, J. *Aquat. Toxicol.*, **59**, 209 (2002).
- 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).
- Rigler, R.; Mets, U. *Laser Spectroscopy of Biomolecules* **1921**, 239 (1992).
- Rigler, R.; Mets, U.; Widengren, J.; Kask, P. *Eur. J. Biophys.* **22**, 169 (1993).
- Rink, T. J.; Tsien, R. Y.; Pozzan, T. *J. Cell. Biol.* **95**, 189 (1982).
- 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).
- Roder, H.; Maki, K.; Cheng, H.; Shastry. M. C. R. *Methods***34**, 15 (2004).
- Rotman, N. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **47**, 1981 (1961).
- Royall, J.A.; Ischiropoulos, H. *Arch. Biochem. Biophys.*, **302**, 348 (1993).
- Rozwadowski, M. *Acta Phys. Pol.* **20**, 1005 (1961).
- 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.; Johnson, 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).

- Szmacinski, H.; Lakowicz, J. R. *Anal. Chem.* **65**, 1668 (1993)
- Schenk, A.; Ivanchenko, S.; Röcker, C.; Wiedenmann, J.; Nienhaus, U. *Biophys. J.* **86**, 384 (2004)
- 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, N. 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).
- Schwille, P.; Haupts, U.; Maiti, S.; Webb, W. W. *Biophys. J.* **77**, 2251 (1999).
- Schwille, P.; Kummer, S.; Heikal, A. A.; Moerner, W. E.; Webb, W. W. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 151 (2000).
- Schwille, P.; Meyer-Almes, F. J.; Rigler, R. *Biophys. J.* **72**, 1878 (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).
- Selvin, P. R. *Nat. Struct. Biol.* **7**, 730 (2000)
- Sevall, J.S. *Mol. Cell. Probes*, **14**, 249 (2000).
- 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).
- Sheppard, C. W. *J. Al. Phys.* **19**, 70 (1948).
- Shera, E. B.; Seitzinger, N. K.; Davis, L. M.; Keller, R. A.; Soper, S. A. *Chemical Physics Letters* **174**, 553 (1990).
- 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.; Fuju, 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.; Bartolo, E. A.; Pan, G.; Muller, G.; Bommireddy, S.; Huppert, D.; Tolbert, L. M. *Israel J. Chem.* **49** (2), 227 (2009).
- 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).
- Srivastava, M.; Petersen, N. O. *Biophys. Chem.* **75**, 201 (1998).
- 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).

- Sugawa, M.; Arai, Y.; Iwane, A. H.; Ishii, Y.; Yanagida T. *Biosystems* **88**, 243 (2007).
- Sujatha, J.; Mishra, A. K. *J. Fluoresc.* **7**, 169S (1997).
- Suwaiyan, A.; Al-Adel, F.; Hamdan, A.; Klein, U. K. A. *J. Phys. Chem.* **94**, 7423 (1990).
- *SYBYL Molecular Modelling Software*; Tripos Inc. S. Hanley Road, St. Louis, MO 63144; <http://www.tripos.com>. (1969).
- Szmecinski, H.; Lakowicz, J. R. *Anal. Chem.* **65**, 1668 (1993)

#### T

- Takahashi, P.; Camacho, J. D.; Lechleiter, B. H. *Physiol. Rev.* **79**, 1089 (1999).
- Talavera, E. M.; Afkir, M.; Salto, R.; Vargas, A. M.; Alvarez-Pez, J. M. *J. Photochem. Photobiol., B* **59**, 9 (2000).
- Talavera, E. M.; Álvarez-Pez, J. M.; Ballesteros, L.; Bermejo, R. *Appl. Spectrosc.* **51**, 401-406 (1997).
- Talavera, E. M.; Bermejo, R.; Crovetto, L.; Orte, A.; Alvarez-Pez, J. M. *Appl. Spectrosc.* **57**, 208 (2003).
- Tang, C. L.; Rosenberg, W. R.; Ukachi, T.; Lane, R. J.; Cheng, L. K. *Laser Focus World* **26**, 107 (1990).
- Teorell, T. (b) *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* **57**, 226 (1937).
- Teorell, T. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* **57**, 205 (1937).
- Thompson, N. L.; Axelrod, D. *Biophys. J.* **43**, 103 (1983).
- Thompson, N. L.; Burghardt, T. P.; Axelrod, D. *Biophys. J.* **33**, 435 (1981).
- 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.; Synes, J. T. *Chem. Phys. Lett.* **329**, 421 (2000).
- Turckeman, M. D.; Huttler, M. E.; Parrinello, M. *Nature* **397**, 601 (1999).
- 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

- Urano, Y.; Kamiya, M.; Kanda, K.; Ueno, T.; Hirose, K.; Nagano, T. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 4888 (2005).
- 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.; Dames, D.; De Schryver, F. C. *Chem. Phys.* **101**, 311 (1986).
- Van der Oord, C. J. R.; Gerritsen, H. C.; Rommerts, F. F. G.; Shawm D. A.; Munro, I. H.; Levine, Y. K. *Appl. Spectrosc.* **49**, 1469 (1995).
- Van Dommelen, L.; Boens, N.; Ameloot, M.; 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).
- Vermes, I.; Haanen, C.; Steffens-Nakken, H.; Reutelingsperger, C. *J. Immunol. Meth.*, **184**, 39 (1995).
- 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).
- Vilariño, T.; Fiol, S.; Armesto, X. L.; Brandariz, I.; Sastre de Vicente, M. E. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* **93**, 413 (1997).
- 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).
- Volkman, B. F.; Lipson, D.; Wemmer, D. E.; Kern, D. *Science* **291** 2429 (2001).
- Von Baeyer, A. *Chem. Ber.*, **5**, 255 (1871).

W

- Wachsmuth, M.; Waldeck, W.; Langowski, J. *J. Mol. Biol.* **298**, 677 (2000).
- Wadsworth, P.; Salmon, E.D. *Methods Enzymol.*, **134**, 519 (1986).
- Wahl, Ph.; Auchet, 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, M. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 4884 (1992).
- Webb, S. P.; Philips, L. A.; Yeh, S. W.; Tolbert, L. M.; Clark, J. H. *J. Phys. Chem.* **90**, 5154 (1986).
- Webb, S. P.; Yeh, S. W.; Phillips, L. A.; Tolbert, M. A.; Clark, J. H. *J. Am. Chem. Soc.* **106**, 7286 (1984).
- Webb, W. W.; Rigler, R.; Elson E. S. *Fluorescence Correlation Spectroscopy: Theory and Applications* 305 (2001).
- Weber, D. G. *Nature* **190**, 27 (1961).
- Weber, K. Z. *Phys. Chem.* **B15**, 18 (1931).
- Weiss, S. *Nat. Struct. Biol.* **7**, 724 (2000).
- Weller, A. *Naturwiss.* **42**, 175 (1955).
- Weller, A. *Prog. React. Kinet.*, **1**, 189 (1961).
- Weller, A. *Z. Electrochem.* **56**, 662 (1952).
- Weller, A. *Z. Electrochem.* **58**, 849 (1954).
- Weller, A. *Z. Physik. Chem.* **15**, 438 (1958).
- Wells, S.; Johnson, I. En *Three-Dimensional Confocal Microscopy: Volume Investigation of Biological Specimens*, pp101-129. Academic Press, London (1994).
- Wennmalm, S.; Thyberg, P.; Xu, L.; Widengren, J. *Anal. Chem.* **81**, 9209 (2009).
- Wenska, G.; Skalki, B.; Insinska, M.; Paszyc, S.; Verrall, R. E. *J. Photochem. Photobiol. A* **108**, 135 (1997).
- Widengren, J.; Kudryavtsev, V.; Antonik, M.; Berger, S.; Gerken M.; Seidel, C. A. M. *Anal. Chem.* **78**, 2039 (2006).

- Widengren, J.; Mets, Ü.; Rigler, R. *J. Phys. Chem.* **99**, 13368 (1995).
- Widengren, J.; Mets, Ü.; Rigler, R. *Chem. Phys.* (a) **250**, 171 (1999).
- Widengren, J.; Rigler, R. *Cell. Mol. Biol.* **44**, 857 (1998).
- Widengren, J.; Terry, B.; Rigler, R. *Chem. Phys.* (b) **249**, 259 (1999).
- Wiechmann, M.; Port, H.; Laermer, F.; Frey, W.; Elsaesser, T. *Chem. Phys. Lett.* **165**, 28 (1990).
- Winkler, T.; Kettling, U.; Koltermann, A.; Eigen, M. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **96**, 1375 (1999).
- Wiseman, P. W.; Petersen, N. O. *Biophys. J.* **76**, 963 (1999).
- 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

- 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. M.; Alvarez, J. M.; Quintero, B. *Photochem. Photobiol.* **60**, 435 (1994).
- Yguerabide, J.; Talavera, E.; Álvarez, J. M.; Afkir, M. *Anal. Biochem.*, **241**, 238 (1996).
- Yguerabide, J.; Yguerabide, E. E. En *Nanosecond Fluorescence Spectroscopy*, Optical Techniques in Biological Research, Bell Telephone Laboratories, **4**, 181 (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

- Zanker, V.; Peter, W. *Chem. Ber.* **91**, 572 (1958).
- Zelent, B.; Vanderkooi, J. M.; Coleman, R. G.; Gryczynski, I.; Gryczynski, Z. *Biophys. J.* **91**, 3864 (2006).
- Zelent, B.; Vanderkooi, J. M.; Nucci, N. V.; Gryczynski, I.; Gryczynski, Z. *J. Fluorescence* **19**, 21 (2009).
- 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).
- Zhou, M.; Diwu, Z.; Panchuk-Voloshina, N.; Haugland, R. P. *Anal. Biochem.* **253**, 162 (1997).
- Zhuang, X. W.; Bartley, L. E.; Babcock, H. P.; Russell, R.; Ha, T. J.; Herschlag, D.; Chu, S. *Science* **288**, 2048 (2000).
- 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).