

**UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA**



**SÍNTESIS Y FOTOFÍSICA DEL
2,5-DIOXOPIRROLIDIN-1-IL-4-(3-HIDROXI-6-
OXO-6H-XANTEN-9-IL)-3-METILBENZOATO.
APLICACIÓN EN LA DETECCIÓN
FLUORESCENTE DE LA HIBRIDACIÓN DE ADN.**

TESIS DOCTORAL

PATRICIA LOZANO VÉLEZ

GRANADA, 2010

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Patricia Lozano Vélez
D.L.: GR 3594-2010
ISBN: 978-84-693-4299-2

D^a. EVA M^a TALAVERA RODRÍGUEZ, D. LUIS CROVETTO GONZÁLEZ Y
D^a. M^a JOSÉ RUEDAS RAMA

CERTIFICAN:

Que el trabajo desarrollado en la presente Memoria, con el título **“Síntesis y fotofísica del 2,5-dioxopirrolidin-1-il-4-(3-hidroxi-6-oxo-6h-xanten-9-il)-3-metilbenzoato. Aplicación en la detección fluorescente de la hibridación de ADN”**, que presenta la Licenciada en Farmacia D^a. Patricia Lozano Vélez para optar al Grado de Doctor, ha sido realizado bajo nuestra dirección en los laboratorios del Departamento de Química Física de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada.

Y, para que así conste, firmamos la presente en Granada, a 14 de mayo de 2010.

Fdo.: Dra. D^a. Eva M^a Talavera Rodríguez
Profesora Titular de Química Física
Universidad de Granada

Fdo.: Dr. D. Luis Crovetto González
Profesor Ayudante Doctor
Universidad de Granada

Fdo.: Dra. D^a. M^a José Ruedas Rama
Doctor Contratado
Universidad de Granada

Tesis Doctoral presentada por Dña. Patricia Lozano Vélez, Licenciada en Farmacia,
para optar al grado de Doctor por la Universidad de Granada

Fdo.: Lda. Dña. Patricia Lozano Vélez

La presente Memoria se enmarca dentro del proyecto titulado “SMFS aplicada al estudio de reacciones de transferencia protónica en el estado excitado de nuevos colorantes xanténicos y a la transferencia resonante de energía entre estos colorantes e intercaladores de ADN”. Proyecto de excelencia P07-FQM-3091, financiado por la Junta de Andalucía.

Patricia Lozano Vélez agradece a la Junta de Andalucía el contrato, asociado al dicho Proyecto, como Técnico de Apoyo Licenciado.

Indice

I. INTRODUCCIÓN.....	1
I.1. JUSTIFICACION DEL TRABAJO.....	3
I.2. DERIVADOS DE LA FLUORESCÉINA. TOKYO GREEN-I, TOKYO GREEN-II Y OTROS DERIVADOS.....	7
I.2.1. Usos de la Fluoresceína.....	7
I.2.2. Limitaciones de la Fluoresceína.....	9
I.2.3. Derivados de la Fluoresceína.....	13
I.2.3.1. Familia de los Tokyo Green.....	19
I.3. ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA CON RESOLUCIÓN TEMPORAL: CONTEO DE FOTONES INDIVIDUALES CORRELACIONADOS EN EL TIEMPO.....	29
I.3.1. Fundamentos de la técnica TCSPC.....	29
I.3.2. Fuentes de luz para la técnica TCSPC.....	32
I.3.2.1. Lámparas de flash.....	33
I.3.2.2. Radiación de sincrotrón.....	33
I.3.2.3. Láseres de colorantes de picosegundos.....	34
I.3.3.4. Láseres de Titanio:Zafiro (Ti:Sa) de femtosegundos.....	35
I.3.3. Detectores para instrumentos de TCSPC.....	37
I.3.3.1. Fototubos de dínodos en cadena.....	37
I.3.3.2. Fototubos multiplicadores de platos de microcanales.....	37
I.3.3.3. Fotodiodos.....	38
I.3.4. Integral de convolución. Análisis de los decaimientos.....	39
I.4. REACCIONES DE TRANSFERENCIA PROTÓNICA EN EL ESTADO EXCITADO (ESPT).....	42
I.4.1. Antecedentes históricos sobre ESPT.....	42
I.4.2. Reacciones ESPT en presencia de un aceptor/dador protónico.....	55
I.4.3. Reacciones ESPT de la Fluoresceína.....	62
I.4.4. Identificabilidad del sistema compartimental	69
I.5. MÉTODOS DE ANÁLISIS.....	72
I.5.1. Análisis no lineal por mínimos cuadrados (NLLS).....	72
I.5.1.1. Requerimientos para un análisis NLLS.....	73
I.5.1.2. Mínimos cuadrados.....	73

I.5.1.3. Estimación de la bondad del ajuste.....	74
I.5.1.4. Análisis global.....	76
I.5.2. Análisis Global Compartimental.....	78
I.5.2.1. Definición de compartimento. Análisis compartimental.....	78
I.5.2.2. Análisis compartimental en fotofísica.....	82
I.5.2.3. Teoría del análisis global compartimental para procesos en el estado excitado.....	86
I.5.3. Comparación entre análisis global y análisis global compartimental.....	93
I.6. APLICACIÓN DEL ESTER SUCCINIMIDO DE TGIII AL ETIQUETADO DE ADN PARA LA DETECCIÓN DE LA HIBRIDACIÓN EN MEDIOS HOMOGÉNEOS.....	99
I.6.1. Breve historia sobre el desarrollo de las sondas de ADN.....	101
I.6.2. Métodos de detección de hibridación de ADN.....	106
I.6.2.1. Sondas de hibridación FRET.....	107
I.6.2.2. Sondas <i>Molecular Beacons</i>	109
I.6.2.3. Sondas <i>Molecular Beacons</i> con dos fluoróforos.....	111
I.6.2.4. Intercaladores de ADN.....	113
I.6.2.5. Combinación de intercaladores con FRET.....	114
I.6.3. Etiquetado covalente de ácidos nucleicos con fluoróforos.....	115
I.6.3.1. Esquemas de derivatización de polinucleótidos para su posterior etiquetado.....	115
I.6.3.2. Tipos principales de reacciones de etiquetado con fluoróforos.....	117
I.6.4. Características de hibridación del sistema modelo utilizado.....	122
II. MATERIAL Y MÉTODOS.....	125
II. 1. MATERIAL.....	127
II.1.1. Instrumentación.....	127
II.1.1.1. Balanza.....	127
II.1.1.2. Centrífuga.....	127
II.1.1.3. pH-metro.....	127
II.1.1.4. Rotavapor.....	127
II.1.1.5. Sonicator.....	128
II.1.1.6. Espectrofotómetro de absorción.....	128
II.1.1.7. Espectrofluorímetro en estado estacionario.....	128

II.1.1.8. Fluorímetro con resolución temporal y excitación láser.....	129
II.1.1.8.1. Fuente de excitación láser.....	129
II.1.1.8.1.1. Láser Modelo LDH (PicoQuant GmbH).....	129
II.1.1.8.1.2. Láser Modelo PicoTA 490 (PicoQuant GmbH)...	129
II.1.1.8.1.3. Controlador de la fuente de excitación.....	130
II.1.1.8.2. Sistema TCSPC.....	130
II.1.1.9. Espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear.....	132
II.1.2. Reactivos.....	133
II.2. MÉTODOS.....	135
II.2.1. Activación y etiquetado de poli(C).....	135
II.2.1.1. Activación de poli(C).....	135
II.2.1.2. Etiquetado de poli(C).....	136
II.2.2. Preparación de las disoluciones.....	137
II.2.3. Procedimientos experimentales.....	139
II.2.3.1. Medidas de absorción.....	139
II.2.3.2. Medidas de fluorescencia en estado estacionario.....	139
II.2.3.3. Fluorescencia resuelta en el tiempo.....	140
II.2.3.4. Espectroscopia de ¹ H-RMN.....	140
II.2.4. Tratamiento de los datos y métodos de análisis.....	141
II.2.4.1. Modelo compartimental.....	141
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	149
III.1. SÍNTESIS DE NUEVOS DERIVADOS TOKYO GREEN.....	151
III.1.1 Síntesis de TGIII (Ácido 4-(6-hidroxi-3-oxo-3H-xanten-9-il)-3-metil- benzoico).....	151
III.1.2. Síntesis del éster de succinimido del TGIII (2,5-dioxopirrolidin-1-il-4- (3-hidroxi-6-oxo-6H-xanten-9-il)-3-metilbenzoato).....	157
III.2. ESTUDIO FOTOFÍSICO DE TOKYO GREEN III (TGIII).....	158
III.2.1. Espectroscopia de absorción y equilibrio en el estado fundamental.....	158
III.2.1.1 Descripción del equilibrio ácido-base.....	158
III.2.1.2. Determinación de ϵ_D , ϵ_M y pK_a	161
III.2.1.3. Influencia de la fuerza iónica en las constantes de equilibrio.....	167

III.2.2. Espectroscopia de fluorescencia.....	169
III.2.2.1. Espectroscopia de Fluorescencia en estado estacionario.....	169
III.2.2.1.1. Caracterización de la emisión de las especies prototrópicas de equilibrio monoanión-dianión del TGIII..	169
III.2.2.1.2. Fluorescencia en estado estacionario en medios con baja concentración de dador-aceptor protónico.....	174
III.2.2.1.3. Fluorescencia en estado estacionario en medios con alta concentración de dador-aceptor protónico.....	178
III.2.2.2. Espectroscopia de Fluorescencia con resolución temporal.....	180
III.2.2.2.1. Sistema bicompartimental $M^* \rightleftharpoons D^*$ del TGIII en ausencia de tampón.....	181
III.2.2.2.2. Sistema bicompartimental $M^* \rightleftharpoons D^*$ del TGIII en presencia de altas concentraciones de tampón fosfato.....	184
III.2.3. Análisis global compartimental del sistema TGIII en presencia de tampón fosfato.....	192
III.3. APLICACIÓN COMO ETIQUETA FLUORESCENTE DE ADN.....	200
III.3.1. Etiquetado de Ácidos nucleicos con el derivado succinimido de TGIII..	200
III.3.1.1. Transaminación de ácidos nucleicos.....	200
III.3.1.2. Etiquetado fluorescente y extensión del marcaje.....	202
III.3.2. Aplicación del NHS-TGIII como sonda fluorescente útil en la detección de la hibridación de ácidos nucleicos en medios homogéneos.....	207
III.3.2.1. Variación de los parámetros fluorescentes del poli(C)-NHS-TGIII tras la hibridación con poli(I).....	207
IV. CONCLUSIONES.....	215
V. BIBLIOGRAFÍA.....	221

Introducción

I.1. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

Las sondas fluorescentes son ampliamente usadas para el etiquetado de células y tejidos, así como para modificar aminoácidos, péptidos, proteínas, oligonucleótidos, ácidos nucleicos, carbohidratos y otras moléculas biológicas, al objeto de que fluorezcan y puedan ser detectadas con técnicas espectrofluorimétricas y microscópicas. De entre todas las sondas, aquellas modificadas para reaccionar específicamente con grupos amino son las más usadas para preparar bioconjugados para inmunquímica, histoquímica, detección de hibridación *in situ* (FISH), detección de células, enlaces a receptores y otras aplicaciones biológicas (Lu *et al.*, 2009), aunque pueden sintetizarse con grupos reactivos selectivos a otros grupos funcionales, como tioles (Kunzelmann y Webb, 2010). Además, en la actualidad el uso de sondas fluorescentes también permite captar imágenes de tejidos y células de diferentes tipos. Estas técnicas fluorescentes se están desarrollando en los últimos años para obtener imágenes del interior de las células, por ejemplo, de células cancerígenas vivas sin que interfieran las sanas, algo muy útil para su estudio y diagnóstico (Kamiya *et al.*, 2007), siendo por tanto, el desarrollo de nuevas y mejoradas sondas fluorescentes un campo de especial importancia.

Históricamente, una de las moléculas más utilizadas como marcador biológico ha sido la fluoresceína, ya que posee un elevado rendimiento cuántico de fluorescencia junto a un alto coeficiente de absorción molar a 490 nm. Debido a su gran uso, nuestro grupo de investigación ha efectuado varios estudios en los que se emplea 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 formas prototrópicas diferentes 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 absorción molar 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

I. Introducción

de fluorescencia diferentes. El dianión posee mayor coeficiente de absorción molar y rendimiento cuántico 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 éstas 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-aspartico). Este sistema 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.*, 2005c). Se debe aclarar que las reacciones en el estado excitado en la 2',7'-difluorofluoresceína (OG-488) son promovidas por las especies dadoras/aceptoras 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.

En el año 2005 se sintetizaron varios derivados de fluoresceína llamados Tokyo Green (TG) (Urano *et al.*, 2005). En varios de estos 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 el 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 de estos derivados mediadas por un dador/aceptor de protones adecuado, ya que, en determinadas aplicaciones y condiciones experimentales pueden mostrar un solo tiempo de vida pudiéndose emplear como sondas fluorescentes.

Por todas las ventajas anteriormente citadas y en base a los motivos expuestos, en esta Memoria se propone la síntesis de un nuevo derivado de los TG anteriormente mencionados. En el diseño del citado derivado de los TG propuesto, se buscó la presencia en su estructura de un grupo éster, para su posible uso como

I. Introducción

colorante fluorescente intracelular (*Haugland et al., 2005*). Como es conocido, los derivados ésteres muestran una mayor permeabilidad celular, debido a la protección de los grupos hidrofílicos. Tras la permeabilización de éstos al interior de las células, los grupos ésteres pueden ser hidrolizados por las esterasas intracelulares, y en esta reacción de hidrólisis se originan ácidos carboxílicos que quedan retenidos en el interior de las células, debido a la imposibilidad de estos grupos hidrofílicos de atravesar las membranas celulares (*Woodroffe et al., 2005*). Además de la aplicación como marcadores celulares, las sondas sensibles a esterasas han sido aplicadas en multitud de estudios de viabilidad celular, citotoxicidad, etc. (*Haugland et al., 2005*), y en este sentido, muchas de las sondas fluorescentes desarrolladas sensibles a esterasas son derivadas de la fluoresceína (*Caturla et al., 2004*) o rodamina (*Chandran et al., 2005*).

Debido a que tras la reacción de hidrólisis de las esterasas celulares se origina el derivado ácido carboxílico de dicho fluoróforo, y además, debido a la escasa información disponible sobre estos compuestos, se plantea en esta Memoria el estudio fotofísico detallado del derivado ácido carboxílico, al objeto de aportar la información cuantitativa necesaria para su utilización como colorante fluorescente intracelular o como etiqueta fluorescente 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, tras la modificación de dicho derivado del TG para la obtención del éster de succinimido, muy activo frente a grupos aminas primarias, se etiquetarán cadenas sencillas de ácidos nucleicos para detectar su hibridación en medios homogéneos.

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 para ser utilizados como sondas fluorescentes en el etiquetado de moléculas de interés biológico.

I.2. DERIVADOS DE LA FLUORESCEÍNA. 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 un gran coeficiente de absorción molar, excelente rendimiento cuántico y buena solubilidad en agua. Tiene un máximo de absorción a 490 nm, cercano a la línea del láser de argón (488 nm) y un máximo de emisión a 514 nm (figura I.1). 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 en citometría de flujo (*Vermes et al., 1995; Feldhaus et al., 2003*). 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 succinimido, 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;*

I. Introducción

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*).

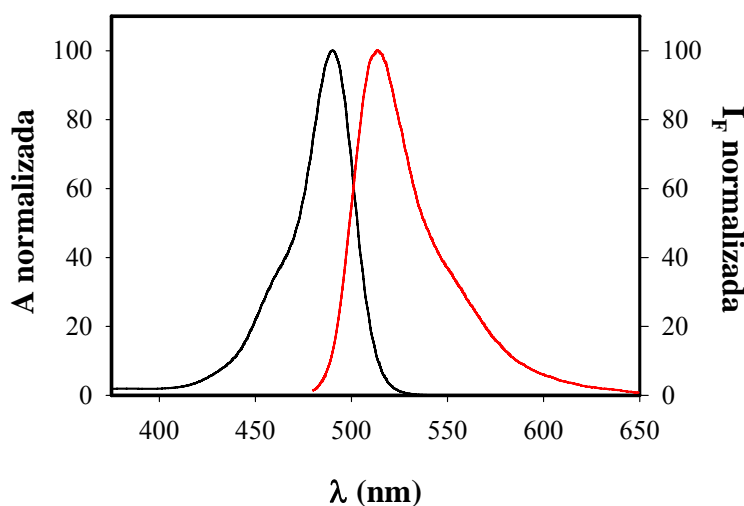


Figura I.1. Espectros normalizados de absorción (—) y emisión (—) de la fluoresceína a pH 9 (*Haugland, 2002*).

A continuación, y simplemente como ejemplos de su extendido uso, se citarán algunos campos de la Ciencia muy diferentes dónde se emplea la fluoresceína como son en conversión de energía solar (*Chan y Bolton, 1980*), biología (*Yu et al., 2002*), veterinaria (*Somanath y Gandhi, 2002*), contador cuántico (*Demas y Crosby, 1971*), microscopía confocal (*Miller et al., 1994*), citometría de flujo (*Cover et al., 1994; Kasaiyan 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 fondos 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 FLUORESCENCIA

La fluoresceína y sus conjugados en macromoléculas presentan algunos inconvenientes, entre éstos se pueden citar:

- Su velocidad de fotoblanqueamiento relativamente alta (*Song et al.*, 1995, 1996). En las figuras I.2, I.3, I.4 y I.5 se muestran algunos ejemplos de este efecto sobre la fluoresceína y derivados.

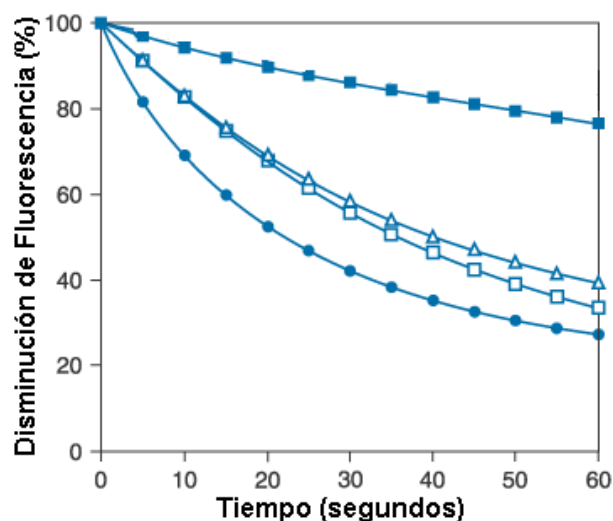


Figura I.2. Comparación de la fotoestabilidad de diferentes fluoróforos conjugados con anticuerpos. Oregon Green 514 (■), BODIPY FL (△), Oregon Green 488 (□) y fluoresceína (●) (*Haugland*, 2002).

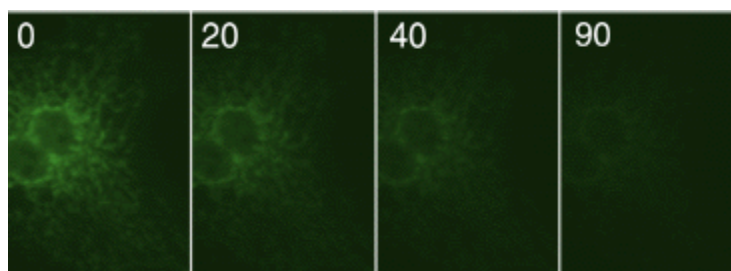


Figura I.3. Anticuerpos etiquetados con fluoresceína, observados mediante microscopía confocal. Las sucesivas imágenes se tomaron a los 0, 20, 40 y 90 segundos desde el comienzo de la iluminación de la muestra. Se observa la rápida pérdida de intensidad de fluorescencia (*Haugland, 2002*).

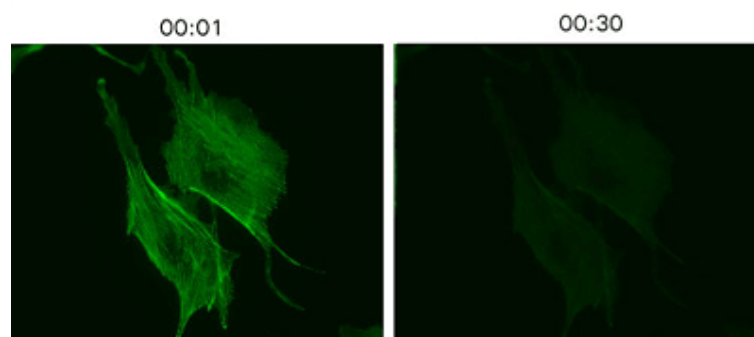


Figura I.4. Células del endotelio de arteria pulmonar bovina etiquetadas con fluoresceína-faloidina. Las imágenes fueron recogidas en el primer segundo y a los treinta segundos a partir del comienzo de la iluminación de la muestra (*Haugland, 2002*).

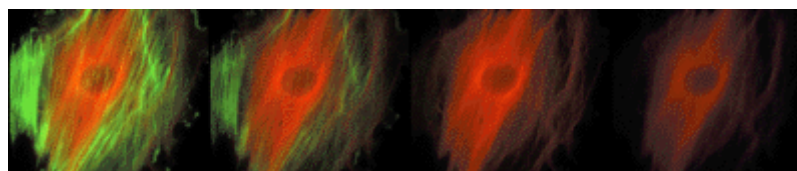


Figura I.5. Citoesqueleto de células endoteliales de arteria pulmonar bovina etiquetado con fluoresceína-faloidina (fluorescencia verde) y el fluoróforo Cy3 (fluorescencia roja). Las imágenes se recogieron en intervalos de 30 segundos tras el inicio de la exposición (*Haugland, 2002*).

- 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 como una ventaja utilizándose como sonda de pH intracelular (*Swietach et al., 2009*).

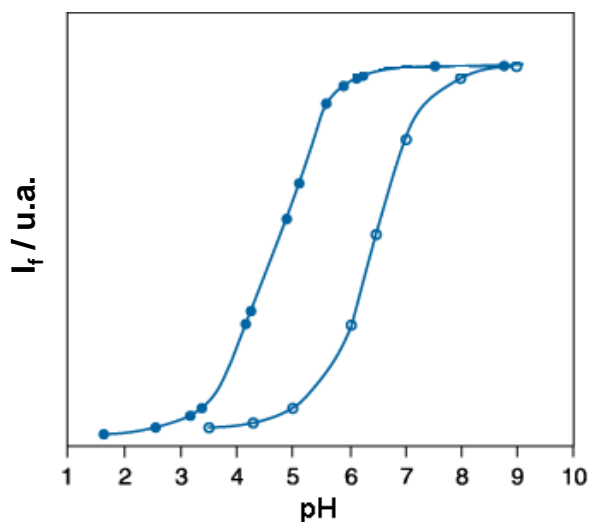


Figura I.6. Comparación de la dependencia de la fluorescencia con el pH de los fluoróforos Oregon Green 488 (●) y carboxifluoresceína (○). Las intensidades de fluorescencia se midieron a las mismas concentraciones de las dos moléculas con excitación a 490 nm y emisión a 520 nm (*Haugland, 2002*).

- 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 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).

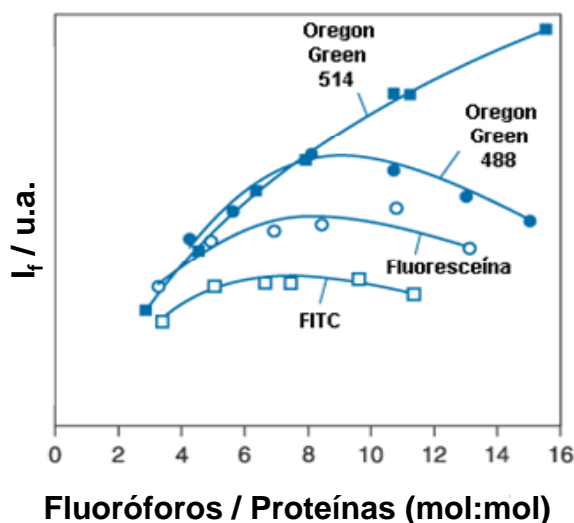


Figura I.7. Fluorescencia relativa en función del número de fluoróforos unidos por proteína, preparados empleando ésteres succinimidos de los ácidos carboxílicos del Oregon Green 514 (■), Oregon Green 488 (●), fluoresceína (○) e isotiocianato de fluoresceína (FITC), (□) (Haugland, 2002).

- 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).

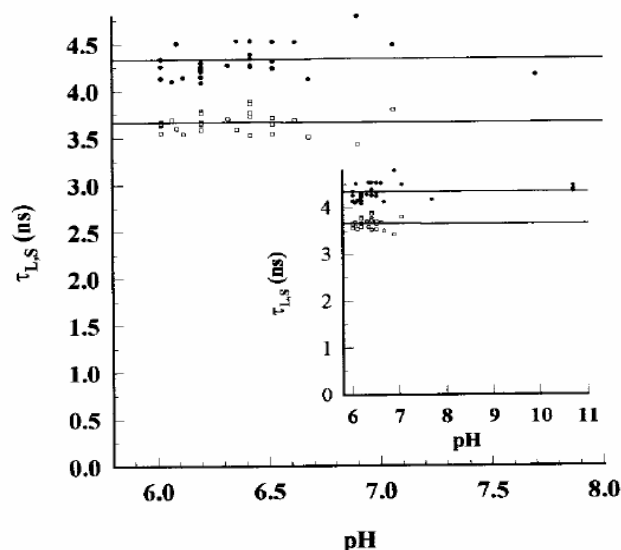


Figura I.8. Tiempos de vida de la fluoresceína en un rango de valores de pH alrededor de 7.00, regulado con tampón de fosfatos 1 mM. En la gráfica insertada, se observa un rango de valores de pH más amplio. A partir de un valor de pH 7.70 tiene un único tiempo de vida (Álvarez-Pez *et al.*, 2001).

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*). 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 (*Álvarez-Pez et al., 2001*).

Con objeto de aprovechar al máximo estas propiedades, se ha despertado 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.

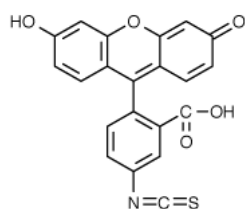
I.2.3. DERIVADOS DE LA FLUORESCEÍNA

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

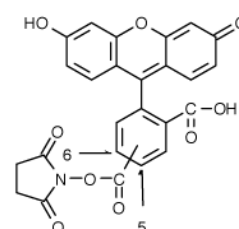
I. Introducción

estructura a etiquetar. Por otro lado, los derivados que muestran diferentes isómeros (sustituciones en las posiciones 5 ó 6) tras su síntesis, pueden presentar ciertas complicaciones. Los espectros de ambos isómeros son prácticamente indistinguibles, tanto en longitud de onda como en intensidad, 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.

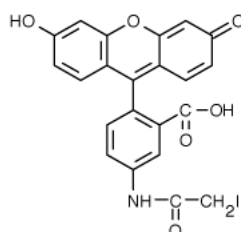
Como ejemplos de las aplicaciones más comunes del isotiocianato de fluoresceína se puede citar su empleo en estudios de hibridación de ácidos nucleicos (*Dirks et al., 1990; Talavera et al., 1997, 2000, 2003*). Asimismo, se han separado péptidos y aminoácidos etiquetados con isotiocianato de fluoresceína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



Fluoresceína-5-isotiocianato



Ésteres succinimidos de 5-(y 6-) carboxifluoresceína



5-iodoacetamidofluoresceína

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

Los ésteres succinimidos 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.

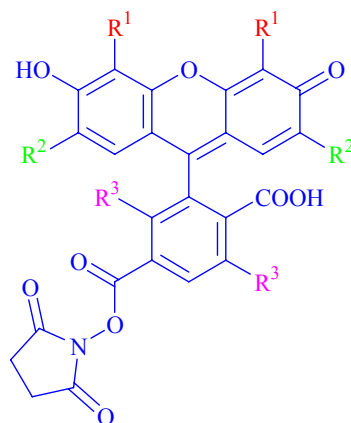
Otro derivado reactivo de fluoresceína es la 5-(4,6-diclorotriazinil)-aminofluoresceína, el cual reacciona bastante bien con proteínas (*Blakeslee y Baines*, 1976) y polisacáridos. Suele emplearse para etiquetar tubulina (*Wadsworth y Salmon*, 1986).

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 y en consecuencia sus rendimientos cuánticos de fluorescencia son bastante más pequeños, pero se pueden emplear eficazmente como sensibilizadores de oxígeno singlete (*Linden y Neckers*, 1988; *Neckers*, 1989) 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 secuenciación de ADN (*Lindqvist et al.*, 1996; *Poltl et al.*, 1997), en patología y medicina forense (*Lindqvist et al.*, 1996) o como sondas para detectar

I. Introducción

hibridación por transferencia de energía, actuando como dadores, mientras que los aceptores fueron derivados de la rodamina (Sevall, 2000).



COMPUESTO	R ¹	R ²	R ³
6-carboxi-4',5'-dicloro-2',7'-dimetoxifluoresceína	Cl	OCH ₃	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 succinimidos de algunos derivados clorados de fluoresceína (Haugland, 2002).

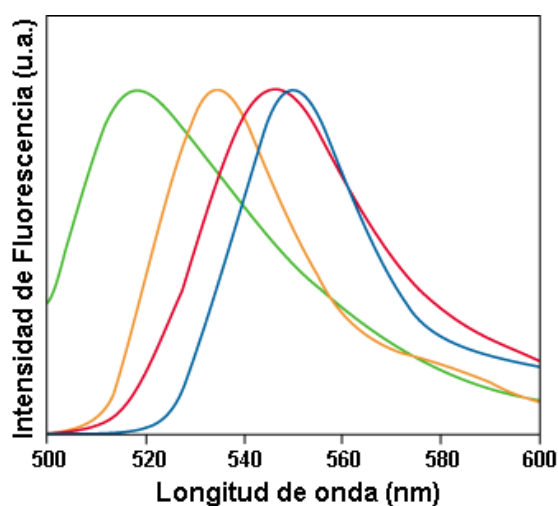


Figura I.9. Espectros de emisión normalizados de los ésteres succinimidos de 5-carboxifluoresceína (—), 6-carboxi-2',4,7,7'-tetraclorofluoresceína (—), 6-carboxi-4',5'-dicloro-2',7'-dimetoxifluoresceína (—) y 6-carboxi-2',4,4',5',7,7'-hexaclorofluoresceína (—) (Haugland, 2002).

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 los de emisión (*Haugland, 2002*). A principios de los años 70 *Leonhardt et al. (1971)* estudiaron 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; Kviety 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., como se evidencia por los 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 extensa al respecto.

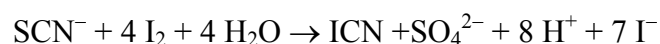
La medida del valor de pH de ciertos orgánulos celulares, cuyo pH es ácido, también es un uso común de la 2',7'-diclorofluoresceína. Debido a sus valores de

I. Introducción

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, así 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 ha empleado la 2',7'-diclorofluoresceína en química analítica. *Safavi* la utiliza 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 de la 2',7'-diclorofluoresceína, 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 basado 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 SCN^- presente en la mezcla con la fluorescencia de la disolución. Estos autores aplicaron este método a la determinación de 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. En la próxima sección nos centraremos en una nueva familia de fluoróforos, los Tokyo Green, recientemente sintetizados por *Urano et al.*, (2005).

I.2.3.1. Familia de los Tokyo Green

Los denominados Tokyo Green son unos nuevos colorantes derivados de la fluoresceína que se han sintetizado con 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. Hasta hace unos años, no era conocido el mecanismo de la característica “on/off” de algunos derivados de la fluoresceína, ya que solo estaba accesible una información empírica limitada de sus propiedades fluorescentes (*Munkholm et al.*, 1990). Sin embargo, recientemente se ha demostrado 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” derivados de ésta.

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 (figura I.10) y no existe ninguna interacción entre ellas ni en el estado fundamental ni en el excitado (*Orte et al.*, 2005c). Desde el trabajo de

I. Introducción

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 rebatida por *Urano et al. (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 (figura I.11). En su trabajo, los mencionados autores también calcularon los rendimientos cuánticos de algunos de los derivados de la fluoresceína que carecen del grupo carboxilo, y 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. Como se ha indicado anteriormente y tal como se muestra en la figura I.11, el hecho de que, tanto la fluoresceína como el 2-MeTokyo Green tengan idénticos rendimientos cuánticos, sugiere que el pequeño grupo metilo es suficiente para mantener las porciones bencénica y xanténica ortogonales.

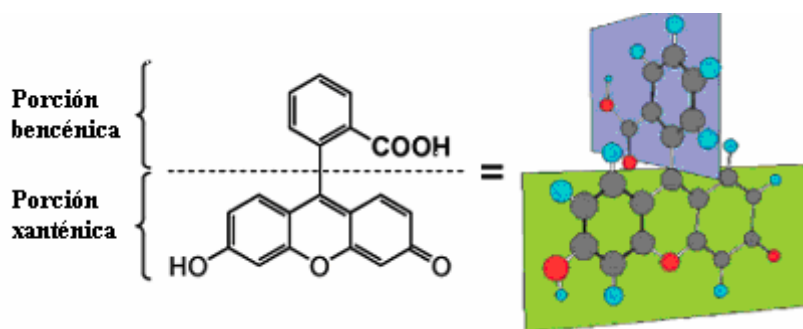


Figura I.10. Estructura de la fluoresceína dividida en dos partes: la porción bencénica y la porción xanténica.

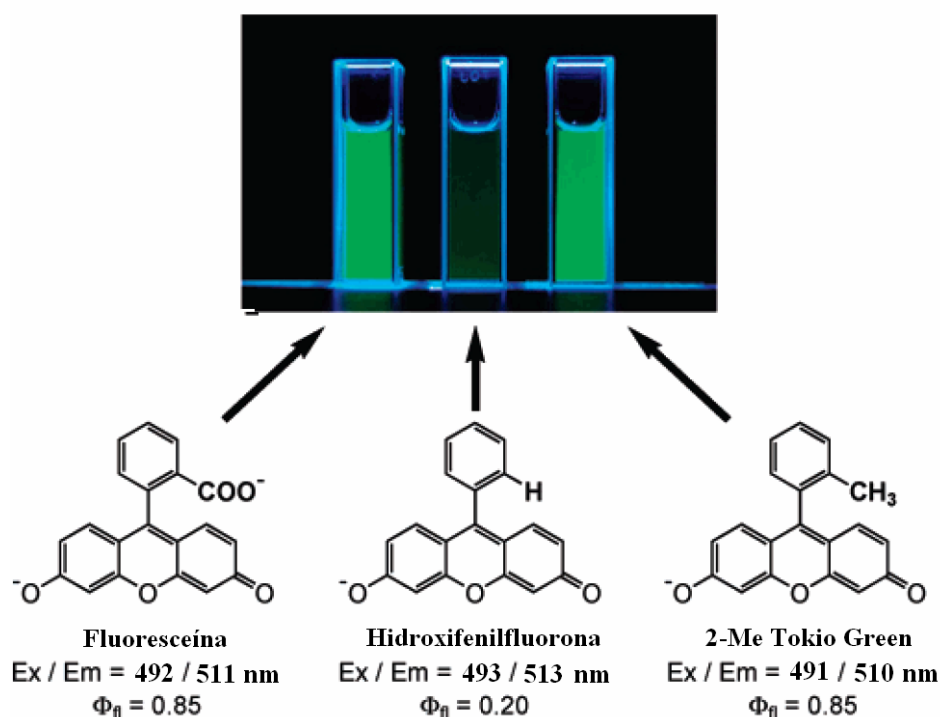


Figura I.11. Características espectrales tras la sustitución del grupo carboxílico de la fluoresceína por otros grupos funcionales. (Urano *et al.*, 2005).

En base a estas consideraciones, Urano *et al.* (2005) sintetizaron varios derivados a los que denominaron Tokyo Green, en los que modificaron la densidad electrónica de la porción bencénica introduciendo grupos metilo y metoxi (figura I.12). 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. Todas estas observaciones se recogieron en la tabla I.1.

Tabla I.1

Propiedades fotofísicas de los Tokyo Green. (*Urano et al., 2005*).

Derivado Tokyo Green	Excitación máx. (nm)	Emisión máx. (nm)	Potencial de oxidación (V vs ECS)	Energía HOMO (hartrees)	ϕ pH=13	ϕ pH=3.4
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 (TG-II)	492	509	1.66	-0.2141	0.840	0.010
2-OMe-5-Me (TG-I)	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	0.300

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. Como se puede observar en la tabla I.1 y en la figura I.12, de los nuevos Tokyo Green, el 2-Me-4-OMeTokyo Green, el 2-OMe-5-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.

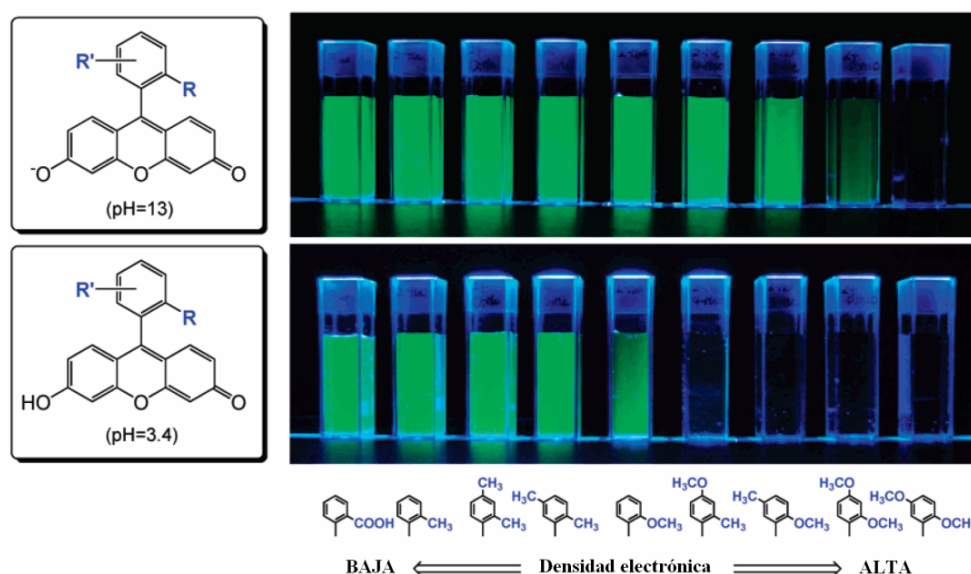


Figura I.12. Comparación de la fluorescencia de los Tokyo Green con distintos grupos en la porción bencénica. La parte bencénica completa junto con sus grupos sustituyentes se muestran debajo de las fotos (Urano *et al.*, 2005).

- **Características fundamentales de los Tokyo Green**

De la familia de los Tokyo Green, los colorantes más interesantes y empleados han sido el 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). 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 en todos los casos el TG-II presenta mayor rendimiento cuántico que el TG-I.

Al ser colorantes de una relativa 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). En la tabla I.1 se recoge la escasa información existente de estos colorantes, indicando los máximos de absorción y emisión. Urano *et al.* (2005) estimaron un valor del pK_a alrededor de 6.2, para ambos compuestos.

I. Introducción

En cuanto a las características ácido-base en disolución acuosa del TG-I y el 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. Sin embargo, en la bibliografía no existía ninguna información sobre las estructuras de las especies prototrópicas o tautoméricas presentes en disolución.

Investigaciones más recientes con colorantes de la familia de los Tokyo Green son las llevadas a cabo por nuestro grupo de investigación. Así, se ha realizado un estudio detallado de la fotofísica del TG-I y TG-II, y de las reacciones de transferencia protónica en el estado excitado (ESPT) mediados por un tampón de fosfato entre la forma aniónica (fluorescente) y la forma neutra (poco fluorescente), obteniéndose mediante la aplicación del análisis global compartimental las constantes de velocidad que describen el comportamiento dinámico del sistema. (*Crovetto et al., 2007; Paredes et al., 2009*). Además, mediante espectroscopia de absorción y de fluorescencia en estado estacionario, se ha analizado la sensibilidad del pK_a aparente a la fuerza iónica del medio. El trabajo se complementó con el estudio de la reacción de transferencia protónica a nivel de moléculas individuales, que proporcionó similares resultados a aquellos obtenidos a nivel de conjunto (*Paredes et al., 2009*).

En un artículo posterior se realizó un estudio comparativo de las reacciones de transferencia protónica mediadas por aceptor/dador protónico del TG-II en el estado excitado mediante técnicas fluorescentes convencionales, y en el estado fundamental mediante la técnica de fluorescencia de moléculas individuales, conocida como espectroscopia de correlación de fluorescencia (FCS). El valor de las constantes cinéticas obtenidas por ambos métodos indicaba la uniformidad del proceso en estado fundamental y estado excitado, y la necesidad del uso de aceptores/dadores protónicos adecuados para promover las reacciones en el estado excitado (*Paredes et al., 2010*). Este trabajo es de gran importancia, ya que anteriormente nunca se habían tenido en cuenta las consecuencias que tienen las reacciones en el estado excitado sobre la función de autocorrelación.

- **Aplicaciones de los Tokio Green**

Al ser tan reciente la síntesis de los derivados TG, 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 β -galactosidasa, uniendo el colorante a la galactosa y formando un TG- β -Gal, que tiene un rendimiento cuántico muy bajo cuando el grupo alcoholico de la porción xanténica permanece unido a la β -galactosa. Sin embargo, si la β -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, lo que origina una fluorescencia muy intensa a valores de pH alrededor del fisiológico como muestra la figura I.13.

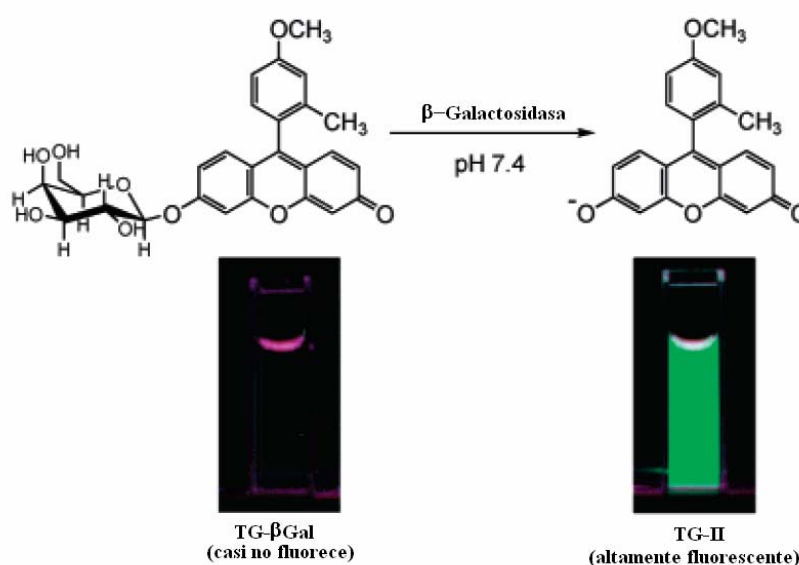


Figura I.13. Esquema de la reacción del TG- β -Gal e imágenes antes y después de la reacción con β -galactosidasa. (*Urano et al., 2005*)

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- β -galactosa fluoresceína (FDG). La reacción de ésta ocurre en dos pasos: primero el FDG se transforma en la mono-O- β -galactosa

I. Introducción

fluoresceína (FMG), de mediana fluorescencia, que finalmente pasa a fluoresceína (Hofmann *et al.*, 1983; Huang, 1991). Además, este incremento de la señal fluorescente es muy lento, 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 en el caso de TG- β -Gal.

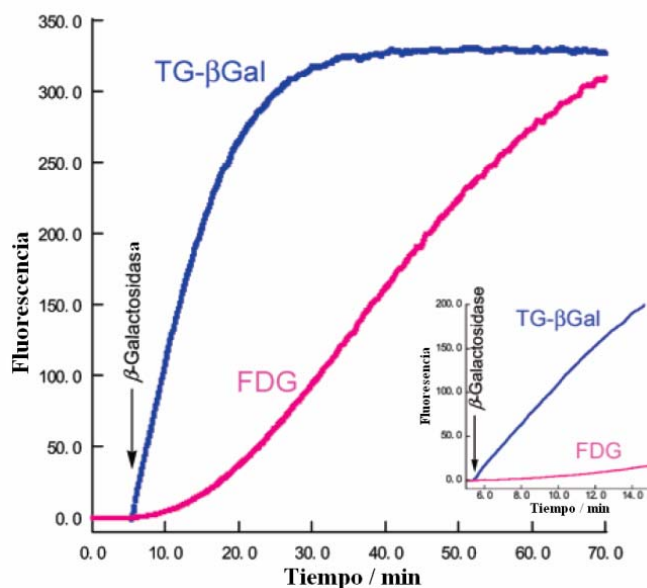


Figura I.14. Comparación del incremento de la fluorescencia entre el TG- β Gal (—) y la FDG (—) con la adición de β -galactosidasa. En la gráfica insertada se muestra el aumento inicial de la fluorescencia. *Urano et al.* (2005).

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 (*Urano et al.*, 2005). La figura I.15 muestra la aplicación del TG- β -Gal y FDG en células GP293, en los que se ha expresado el gen LNCX2-LacZ (*lacZ*-positivas), usando las *lacZ*-negativas como control. Este gen LacZ codifica la enzima β -Galactosidasa.

Como se comprueba, 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.

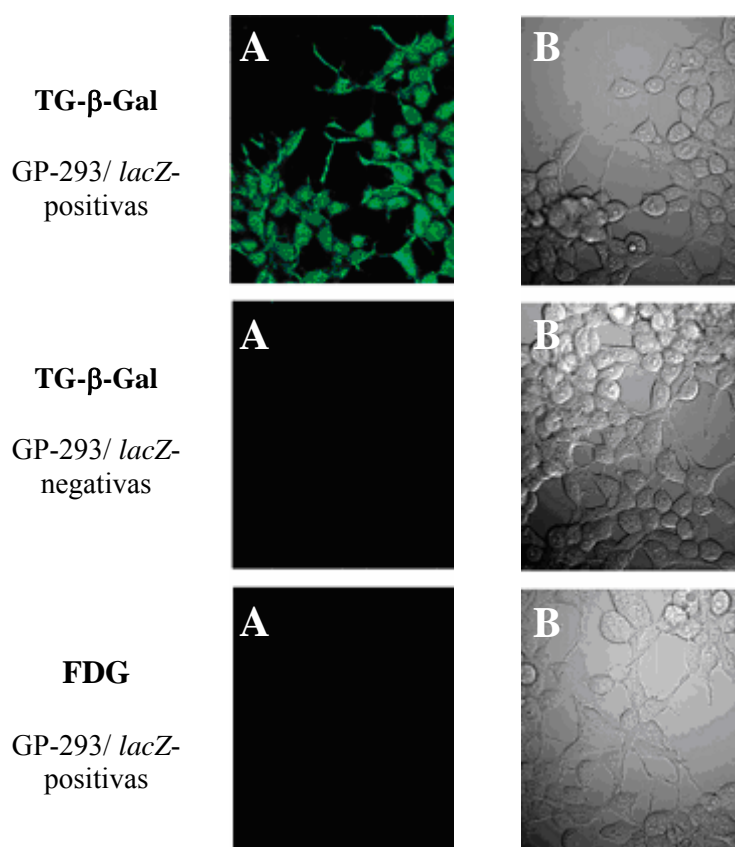
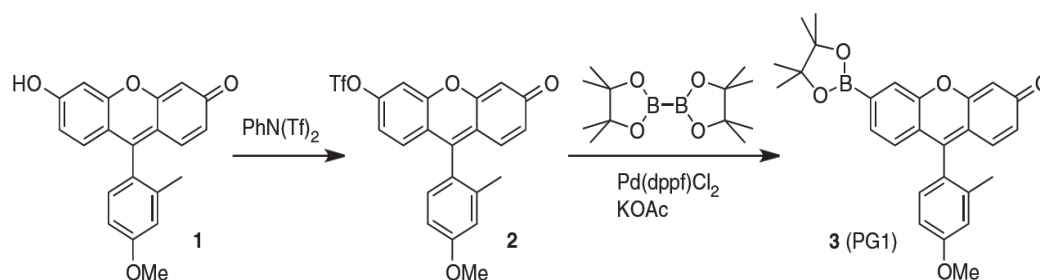


Figura I.15. Imagen de microscopía de fluorescencia que muestra la actividad β -galactosidasa en células vivas *lacZ*-positiva y *lacZ*-negativas con TG- β -Gal y FDG. En las dos imágenes de la parte superior se muestra el TG- β -gal en células *lacZ*-positivas y en las intermedias se observa el TG- β -gal en células *lacZ*-negativas. En las dos imágenes de la parte inferior se muestra el FDG en células *lacZ*-positivas. **A)** Imágenes de fluorescencia, **B)** imágenes en campo de luz. Se puede observar que el TG- β -gal presenta una mayor sensibilidad con respecto a FDG. *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 en su intensidad de fluorescencia, lo que se utiliza para detectar la producción de H_2O_2 en diferentes sistemas biológicos.



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

Como último ejemplo, se muestra la capacidad de detección de la producción natural de H_2O_2 celular que se realizó con células A431, elegidas por su alta expresión de receptores de factores de crecimiento epidérmico. 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 factores de crecimiento fisiológico mostraron un sensible aumento de la fluorescencia relativa (figura I.16b). Los controles de factor de crecimiento sin colorante no mostraron ninguna señal fluorescente, concluyendo que PG-I es capaz de detectar H_2O_2 intracelular producida por el factor de activación del crecimiento (EGF) (*Miller et al., 2007*).

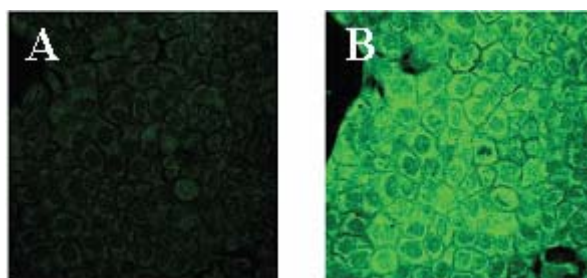


Figura I.16. Detección del H_2O_2 producido en células A431: Imagen confocal fluorescente de: A) células incubadas con 5 mM de PG-I durante 15 min a 37 °C. (B) células incubadas con 5 mM de PG-I y estimuladas con 500 ng/mL de EGF durante 15 min a 37 °C.

I.3. ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA CON RESOLUCIÓN TEMPORAL: CONTEO 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 también se encuentran 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 comparativamente 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. 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

I. Introducción

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*). 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 detalla 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. El dispositivo fundamental en un instrumento de TCSPC es el convertidor tiempo-amplitud (TAC), que se puede considerar como un rapidísimo “cronómetro”. La señal START 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 ambas señales. En el caso de que no se detecte el fotón, el voltaje alcanza un nivel máximo y vuelve a cero, 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 Material 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 conteo 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 ± 0.3 ps) y en benceno (8.1 ± 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 conocidos como “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 también presentan problemas como son el que abarcan 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. Este tipo de lámparas comenzaron a emplearse en TCSPC a mediados de los años 70 (*Birch e Imhof, 1977*), y consisten en dos electrodos separados por una distancia crítica y situados en el interior de un bulbo de cuarzo. Existen dos modalidades diferentes, compartimentadas y de recorrido libre. En las lámparas compartimentadas uno de los electrodos se conecta a una fuente de alto voltaje a través de una resistencia, y el otro se conecta a tierra a través de un tiratrón o tubo de gas de cátodo caliente. Los pulsos de luz se van generando 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 4.0×10^4 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 50Ω 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 ya se ha comentado, de unos 40 kHz. Por tanto y debido a la limitación de detección de un fotón cada 100 pulsos, la adquisición de un único decaimiento lleva un tiempo bastante considerable.

I.3.2.2. Radiación de sincrotrón

En un sincrotrón un cañón de electrones produce un haz inicial que se acelera hasta velocidades próximas a la luz. Los electrones circulando a estas velocidades

emiten radiación en un amplio intervalo de longitudes de onda. Estos pulsos son bastante intensos y tienen perfiles gaussianos, pudiendo emplearse 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 de ión de argón, aunque también pueden usarse de neodimio:YAG y en este caso hay que doblar o triplicar su frecuencia para excitar al 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 (*Berg y Lee, 1983*). Este fenómeno opto-acústico es muy dependiente de la temperatura, por lo que normalmente el cristal está termostatzado.

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 δ . 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, aunque estos procesos son bastantes ineficaces, ya 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 a distintas longitudes de onda, utilizando diferentes colorantes y los segundos armónicos.

I.3.3.4. Láseres de Titanio:Zafiro (Ti:Sa) de femtosegundos

Son los láseres utilizados recientemente en TCSPC. Los pulsos que proporcionan tienen una anchura de unos 100 fs, necesitando 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.

I. Introducción

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. Éste es un proceso predicho en los años 30 y fue demostrado empíricamente con la aparición de los láseres (*Lakowicz, 1999*). Requiere altas intensidades locales de luz y consiste en la absorción de dos o más fotones de longitud de onda larga para producir la excitación. Recientemente, se han estudiado mediante excitación multifotónica varios compuesto aromáticos (*Lakowicz et al., 1992*), sondas de ADN (*Lakowicz y Gryczynski, 1992*) y 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*) pudiendo emplearse para estudiar estados excitados “prohibidos” por excitación monofotónica. Otro ejemplo, es el llevado a cabo por *Montero et al, (2009)* quienes estudian distintos procesos de relajación dinámica del naftaleno mediante espectroscopia de masas a través de un sistema generador de oscilaciones de Ti:Sa, 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.

Existen muchos tipos de detectores; los más empleados son los fototubos de dínodos en cadena, los fototubos de platos de microcanales, los fotodiodos y los detectores multicanal (varias líneas de detección simultánea). Éste último tiene la particularidad de aumentar la velocidad de adquisición de decaimientos al poder aumentar el número de fotones detectados (cuentas por segundo), evitando así 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 áodos (*Howorth et al., 1995*), aunque de forma usual, están disponibles platos de microcanales funcionando como 10-16 detectores. Para estas detecciones multicanales, cada canal de detección está asociado a un discriminador de fracción constante y a un segmento de memoria independiente del MCA (*Birch et al., 1994; McLoskey et al., 1996*).

I.3.3.1. Fototubos de dínodos en cadena

Los fototubos de dínodos son adecuados para la mayoría de los experimentos de TCSPC, especialmente si la fuente es una lámpara de flash. Valores típicos de anchura de pulsos son 1-2 ns, aunque se han llegado a alcanzar anchuras entre 112-700 ps en tubos de dínodos con ventana lateral. La característica principal de estos detectores y 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

I. Introducción

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 (*Muraio 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 μm 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. Sin embargo, una desventaja 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) son asequibles económicamente y pueden responder incluso más rápido que los fototubos MCP, pero su principal problema 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. Tienen la desventaja de que el área activa es una superficie muy pequeña y por tanto es muy difícil enfocar en ella la emisión fluorescente, lo que disminuye su sensibilidad. Otra desventaja es la aparición de largas colas en el perfil instrumental, dependientes de la longitud de onda, lo que crea problemas en el análisis de datos, ya que la función respuesta instrumental depende de la longitud de onda.

Sin embargo, cuando la fuente de excitación es un láser, los fotodiodos son muy utilizados como detector “disparador” dando la señal START en el TAC. 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 δ , 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 δ con diferentes amplitudes, que van a producir diferentes respuestas de intensidades proporcionales a cada función δ . El histograma medido sería la suma de todas estas funciones respuesta. Esta suma viene expresada por la llamada *integral de convolución*:

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

donde $F(t)$ es el decaimiento medido experimentalmente, $D(t')$ 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, β 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 por medio de la integral de convolución (ecuación I.1) la función experimental $F(t_k)$ con la función calculada $F_{calc}(t)$ a través de la función impulso respuesta $I(t)$ y el perfil instrumental $L(t)$, se denominan métodos de reconvolución iterativa.

Los métodos más empleados en el análisis de resultados son, entre otros, el análisis no lineal por mínimos cuadrados (*Ware et al., 1973; Grinvald y Steinberg, 1974; Johnson y Frasier, 1985*), el método de los momentos (*Yguerabide, 1972; Small, 1992*), la transformada de Laplace (*Ameloot y Hendrickx, 1983; Ameloot, 1992*), el método de máxima entropía (*Brochon, 1994*), el 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*), el método de Prony (*Zhang et al., 1996*), el método de máxima probabilidad (*Bajzer y Prendergast, 1992*) y la transformación sinusoidal (*López et al., 1992*). Los métodos de los momentos y de Laplace no son muy empleados actualmente, mientras que el método de la máxima entropía si se utiliza 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 absorción. *Förster (1950)* investigó este fenómeno proponiendo un método, el que lleva su nombre, 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 estas 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→0 de la base y el ácido respectivamente y T la temperatura en grados Kelvin.

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

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 extendiéndose el interés en el estudio de estas reacciones en la siguiente década. Existen revisiones como la de *Vander Donckt (1970)* sobre ESPT intermoleculares, basadas en las teorías de transferencia de carga y resonancia. Por su parte, *Schulman y Winefordner (1970)* trataron las aplicaciones analíticas de estas reacciones.

Por esta época se comenzó a informar sobre la utilidad de estas reacciones. Así, *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 la velocidad de la reacción ESPT. También, se estudió la influencia de diferentes entornos y cómo afectan a la velocidad de estas reacciones. En este sentido, *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 Wyatt (1976)* y *Klöpper (1977)*, quienes estudiaron 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 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 en estado estacionario y que se sigue utilizando actualmente (*Kelly y Schulman, 1988; Mironczyk y Jankowski, 2002*). Sin embargo, no siempre la

I. Introducción

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 supuso que el equilibrio debía alcanzarse en el estado excitado y por otro, que los tiempos de vida del par ácido-base excitados tenían que ser idénticos (*Samanta et al., 1985*). De ahí que las ecuaciones de Weller necesitaran modificarse 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. (1989)*. 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 β -carbólinas (*Sakurovs y Ghigginio, 1982; Vert et al., 1983; Ghigginio 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) y 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., (1986a,b, 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

I. Introducción

de fotoácidos, como el 8-hidroxipireno-1,3,6-trisulfonato, que fueron estudiados por *Pines y Huppert (1986a,b)*, *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., 1994, 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. (1989a)*, o *Sarkar y Sengupta (1991)*. Un estudio 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. Estos investigadores 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, descienden en presencia de electrolitos. La mayoría de las interpretaciones de estos estudios presentan la necesidad de un aceptor protónico, que en general consiste en un *cluster* de moléculas de agua. *Huppert et al. (1982)* sugirieron que el descenso de la velocidad en la ESPT en presencia de electrolitos se debe principalmente a una disminución de las moléculas de agua libres necesarias para hidratar los iones H_3O^+ creados con la disociación en el estado excitado, ya que estarían hidratando a los iones del electrolito. Para fotoácidos no excesivamente fuertes, *Lee et al. (1985)* propusieron un *cluster* de cuatro moléculas de agua funcionando como aceptor del protón y posteriormente, *Lee (1989)* propuso igualmente que el decrecimiento en la velocidad de la ESPT debida a la presencia de electrolitos era consecuencia de una disminución de las moléculas de agua libres para la producción de las especies H_9O_4^+ tras la desprotonación. Mientras que sobre el mismo modelo de *clusters* de cuatro moléculas de agua como especie aceptora de protones, *Shizuka et al. (1986)* establecieron que la hidratación de los iones del electrolito producía la ruptura de *clusters* H_8O_4 , disminuyendo así la velocidad de las

I. Introducción

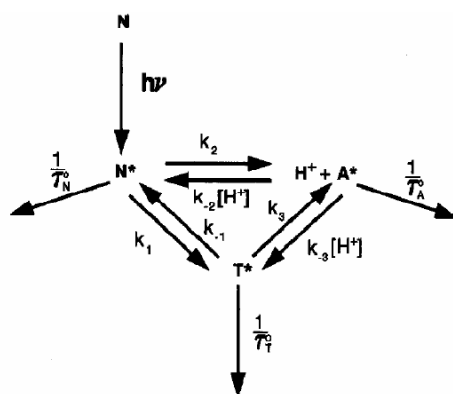
ESPT. Por el contrario, *Suwaiyan et al. (1990)* encontraron un incremento en la velocidad de la reacción ESPT en presencia de pequeñas cantidades de electrolito. Para ácidos muy fuertes en el estado excitado ($pK_a^* < 0$) se han propuesto especies dimeras de agua como los aceptores protónicos efectivos (*Tolbert y Haubrich, 1994; Htun et al., 1995*). En este tipo de fotoácidos, la desprotonación y 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 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 reacciones 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 β -carbolinas (*Dias et al., 1992*) o el estudio de la influencia de la fluoración en las ESPT de la salicilaldimina (*Forés y Scheiner, 1999*). Otro aspecto muy interesante y que sigue muy en boga, es la aplicación de láseres pulsados con resolución de femtosegundos a las reacciones ESPT (*Wiechmann et al., 1990; Schwartz et al., 1992; Kim et al., 1995; Genosar et al., 2000*). Se han llegado a estudiar las ESPT del 2-naftol en agua supercrítica (*Ryan et al., 1996*).

Las β -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 β -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 excitadas, ácido y base. Sin embargo, el avance en los instrumentos de medida con resolución temporal y las herramientas informáticas han permitido 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”, 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 y 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 estados para la harmina, otra β -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 y la dificultad de discriminar tiempos de decaimientos similares 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 β -

carbonilas, demostraron igualmente las carencias del tratamiento de *Draxler y Lippitsch (1993)*.

Otras revisiones sobre cinéticas de reacciones ESPT fueron 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 reacciones 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 constante de desprotonación encontrada hasta esa fecha 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-hidroxi-4-metilflavilio. 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 proporciona 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., 1992b*). Como se tratará en un apartado posterior (sección I.5.2.2), el análisis global compartimental (GCA) 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. Una de las primeras aplicaciones que sirvió de “validación” de este tipo de análisis, fue el estudio de la ESPT del 2-naftol/naftolato (*Beechem et al., 1985b; 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-acetilaspártico se añade como aceptor/dador protónico (*Crovetto et al., 2004*). Aplicaciones posteriores 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)-carboxyfluorescein (BCECF). Recientemente, *Crovetto et al., (2007)* y *Paredes et al., (2009)* han estudiado ESPT entre las distintas especies prototrópicas de algunos nuevos colorantes Tokyo Green, el TG-I y TG-II.

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 las

reacciones ESPT. Como ejemplo, se citarán las simulaciones de superficies de potencial en ESPT de *Cukier y Zhu (1999)*, los trabajos sobre oxacinas de *Grofcsik et al. (2000)* o sobre los derivados de la 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, también se han estudiado (*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 reacciones ESPT (ruptura y formación de los enlaces de hidrógeno, 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 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 difusiva de los H_3O^+ con el fluoróforo. También, mediante fluorimetría con resolución temporal, a través de la técnica TCSPC con un láser de

I. Introducción

femtosegundos, *Shiobara et al. (2002)* han estudiado las reacciones ESPT de derivados de anilina en disoluciones acuosas, y el efecto de sustituyentes alquilo sobre la cinética de la reacción. Estos autores encontraron un tiempo de desprotonación de estas anilinas protonadas de 70 ps, la cinética más rápida encontrada hasta esa fecha para aminas protonadas.

Son abundantes también las publicaciones sobre reacciones ESPT de fluoróforos en medios micelares (*Pina et al., 2001; Cohen et al., 2002; Giestas et al., 2003*), liposomas y 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 sistemas microheterogéneos. En este trabajo, basándose en sus estudios precedentes en micelas catiónicas, neutras y aniónicas *Chattopadhyay et al., (1989a)*, exponen la posibilidad de emplear la reacción 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 reacción 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 reacción 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, 2009). Finalmente, Agmon (2005) en una revisión recopila todos los pasos implicados en las reacciones ESPT estudiados por técnicas teóricas y/o experimentales.

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 reacción 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 reacciones ESPT es un campo de

I. Introducción

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)* describieron también el efecto de las especies de un tampón en las reacciones 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 el estado excitado de la especie 2^* y de la especie RH del aceptor/dador protónico fueron denominadas respectivamente k_{12} y k_{21}^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 manera, 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:

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

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 $\gamma_i = -\frac{1}{\tau_i}$, 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

I. Introducción

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, $C^{buff} = K_a + [H^+]$ la representación de $\gamma_1 + \gamma_2$ frente a $[H^+]$ sería lineal, obteniéndose en cualquier caso a través de la pendiente $k_{12} + k_{12}^b$, en lugar de k_{12} como afirmaban *Laws* y *Brand*.

De la misma forma se puede concluir que las representaciones de $\gamma_1 + \gamma_2$ frente a $[R]$ o $[RH]$, manteniendo el resto de los parámetros constantes son imposibles. Sin embargo, aunque la propuesta de obtención de las constantes cinéticas no fue la correcta, el modelo cinético sí que se ajusta a las características del comportamiento de estos sistemas y 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., 2005a,b; Boens et al., 2006; Paredes et al., 2009*).

Posteriormente a *Laws* y *Brand*, se ha continuado 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 dihidroequilenina tanto en disolución como en vesículas. Estos autores también analizaron el efecto de la adición de acetato, actuando como aceptor/dador protónico. El estudio en vesículas resulta bastante interesante ya que, a los resultados obtenidos por las técnicas de fluorimetría en estado estacionario y 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 reacción 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 reacciones ESPT adiabáticas por su rapidez, como los efectos no adiabáticos de las especies del tampón. Las aplicaron a las ESPT del fenol, 1-naftol, 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., 2005a,b,c*), la BCECF (*Boens et al., 2006*) y derivados del TG (*Crovetto et al., 2007; Paredes et al., 2009*), aunque de esto se tratará con mayor amplitud en el epígrafe siguiente.

I. Introducción

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. (1991)* 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 un valor de $(1.3 \pm 0.3) \times 10^{11} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, siendo éste uno de los más altos de las constantes cinéticas bimoleculares en transferencias protónicas en el estado excitado para el 5-ciano-1-naftol descrito hasta esa fecha, 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 posterior de las reacciones 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.17 y I.18) y en definitiva, emplear estos fluoróforos como sondas de pH o indicadores de la concentración de un aceptor/dador protónico.

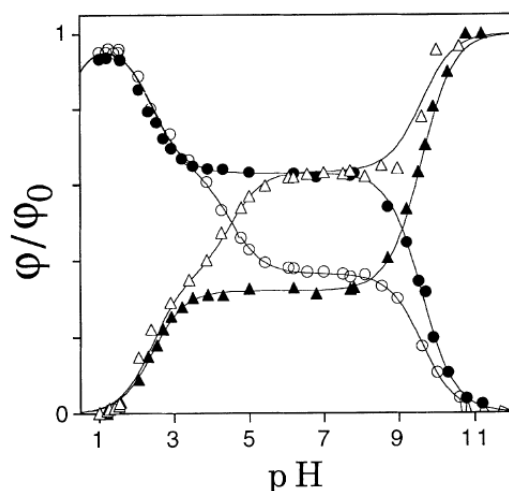


Figura I.17. Curvas de valoración normalizadas de emisión de fluorescencia del 2-naftol: (●) forma ácida en ausencia de tampón, (▲) forma básica en ausencia de tampón, (○) forma ácida en presencia de tampón acetato 0.1 M, (Δ) especie básica con tampón acetato 0.1 M (Pina *et al.*, 1999).

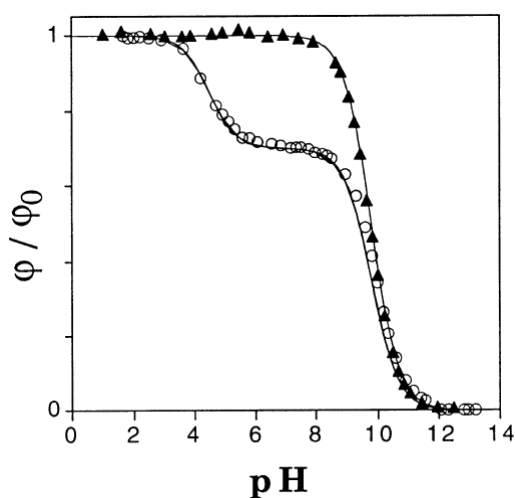
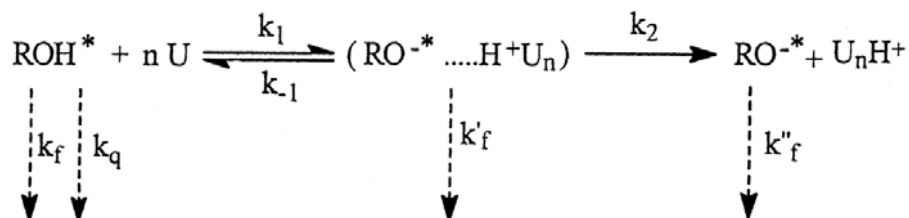


Figura I.18. Curva de valoración de emisión de fluorescencia del fenol en ausencia (▲) y presencia (○) de tampón acetato 0.1 M (Pina *et al.*, 1999).

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

I. Introducción

reacción ESPT debida 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 posterior de *Goldberg et al. (1992)*, quienes describen el efecto “acelerador” que produce el aceptor/dador protónico sobre las reacciones ESPT.

I.4.3. REACCIONES ESPT DE LA FLUORESCÉINA

Por analogía con el compuesto que se trata en esta Memoria, el Ácido 4-(6-hidroxi-3-oxo-3H-xanten-9-il)-3-metil-benzoico, Tokyo Green III (TGIII), 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)*, quien 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, estos 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, proponiendo 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

I. Introducción

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 el 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 disminuyera 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 para la reprotonación $9 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, lo que significaba un valor de $\text{p}K_a^*$ de 0.6, en contraste con el de -1.3 obtenido en el ciclo de Förster.

Dada la confusión 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 reacción 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 $\text{p}K_a^*$ de 6.31 (figura

I.19). En esta ecuación, los factores ϕ_M y ϕ_D están relacionados con los rendimientos cuánticos de cada especie, aunque su valor numérico es relativo a los de intensidad de fluorescencia.

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

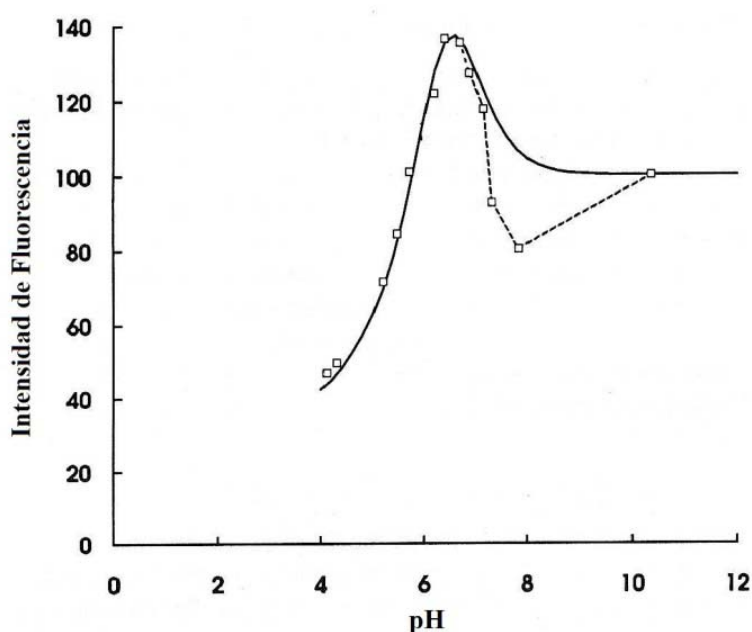


Figura I.19. Intensidad de fluorescencia (\square) frente al valor de pH de disoluciones de fluoresceína a alta concentración de tampón de fosfatos (1 M). La concentración de fluoresceína fue de 10^{-6} M y las longitudes de onda de excitación y emisión fueron 437 y 512 nm respectivamente. La línea sólida 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, *Álvarez-Pez et al.* (2001) propusieron 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 reacción 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 resolvieron la cinética de la reacción ESPT entre el

I. Introducción

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 I.2 recoge los resultados de las constantes cinéticas obtenidas, mientras que la figura I.20 muestra estos ajustes.

Tabla I.2

Constantes cinéticas para la reacción ESPT entre el monoanión y el dianión de la fluoresceína en presencia de tampón de fosfatos 1M^a.

τ_D (ns)	τ_M (ns)	k_{DM} (ns ⁻¹)	k_{MD} (ns ⁻¹)	k_{MD}^b (M ⁻¹ ns ⁻¹)	k_{DM}^b (M ⁻¹ ns ⁻¹)
4.34 ± 0.02	3.70 ± 0.03	(2.6 ± 1.3) × 10 ⁻³	0 ^b	0.92 ± 0.04	0.304 ± 0.009

$pK_a^* = 6.4^c$

^a Álvarez-Pez *et al.*, 2001

^b Tendió a cero en el proceso de ajuste

^c Calculado en la zona de concentraciones constantes en equilibrio de $[M^*]$ y $[D^*]$

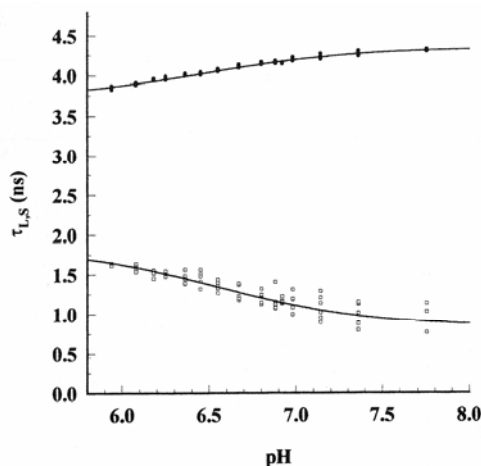


Figura I.20. Tiempos de decaimiento largo τ_L (●) y corto τ_S (□) para disoluciones de fluoresceína en presencia de tampón de fosfatos, obtenidos mediante análisis global. Las líneas representan los tiempos de decaimiento calculados con los valores de las constantes cinéticas determinadas por Álvarez-Pez *et al.* (2001).

Hay sustancias que actúan como aceptores/dadores protónicos adecuados para favorecer las reacciones 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 I.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^a.

$K_{0M} + k_{DM} \text{ (ns}^{-1}\text{)}$	$K_{0D} \text{ (ns}^{-1}\text{)}$	$k_{MD} \text{ (M}^{-1}\text{ns}^{-1}\text{)}$	$k_{DM}^b \text{ (M}^{-1}\text{ns}^{-1}\text{)}$	$k_{MD}^b \text{ (M}^{-1}\text{ns}^{-1}\text{)}$
0.2765 ± 0.004	0.231^b	0^b	0.0336 ± 0.0015	0.0120 ± 0.0015

^a *Crovetto et al., 2004*

^b 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 OG-488 que, además, presenta valores de pK_a 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

I. Introducción

estados excitados sucesivos fue realizada por *Orte et al. (2005a,b)* con disoluciones ácidas de OG-488. 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., 2005c*). Los valores de las constantes cinéticas obtenidas por *Orte et al. (2005a)* se muestran en la tabla I.4.

Tabla I.4

Constantes cinéticas para la reacción ESPT entre el monoanión y el dianión del OG-488 en presencia de tampón acetato 1M^a.

$k_{0M} + k_{0D}$ (ns ⁻¹)	k_{0D} (ns ⁻¹)	k_{MD} (M ⁻¹ ns ⁻¹)	k_{DM}^b (M ⁻¹ ns ⁻¹)	k_{MD}^b (M ⁻¹ ns ⁻¹)
0.297 ± 0.001	0.247 ± 0.001	0 ^b	0.970 ± 0.002	0.179 ± 0.001

^a *Orte et al., 2005a*

^b 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 (*Szmacinski y Lakowicz, 1993*). Recientemente, se ha publicado un estudio sobre la fotofísica de BCECF en donde se aplicó el GCA para la obtención de los parámetros cinéticos y espectrales de la reacción ESTP entre el tetra-anión y el 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 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), 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. Así como el TG-I (*Crovetto et al.*, 2007) y el TG-II (*Paredes et al.*, 2009) ambos en presencia de tampón fosfato.

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:

I. Introducción

- 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 inequívoco a las constantes cinéticas.
- *Boens y Kowalczyk (1996)* realizaron el estudio de identificabilidad de un proceso intermolecular competitivo en tres estados excitados (la especie 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 λ^{em} y λ^{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 $k_{0(ref)}$ 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 del fundamento de este método.

El análisis NLLS comprende un grupo de procedimientos numéricos de los que se obtienen valores óptimos de los parámetros α_i de una ecuación $G(\alpha, x)$ (siendo α el vector de parámetros α_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 éstos van variando hasta obtenerse 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 χ^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

I. Introducción

ecuación (I.18) se minimiza el valor de χ^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 α en el punto de variable independiente x_k , y σ_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 χ^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 α , 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 χ^2 , y que éste llegue a un mínimo. Sin embargo, χ^2 depende del número de puntos (Bevington y Robinson, 1993), así que suele utilizarse el valor de χ^2 reducido (χ^2_ν):

$$\chi_v^2 = \frac{\chi^2}{n-p} = \frac{\chi^2}{\nu} \quad (1.19)$$

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 χ_v^2 cuando existe ausencia de errores sistemáticos ha de ser próximo a la unidad, indicando un buen ajuste. Este χ_v^2 , o χ^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):

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

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

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

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

Según la expresión de r^2 , si el modelo $G(\alpha, x_k)$ es una buena representación de los datos experimentales y_k , los residuales serán pequeños, por lo que el valor de χ_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 ellos 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 a tener en cuenta para juzgar la bondad del ajuste, como el test de Durbin–Watson (*Draper y Smith, 1981*) y el test de tendencia (*Bard, 1974*) entre 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 α_i puede compensarse casi totalmente con una variación en α_j . Así, no pueden asignarse valores únicos a los parámetros α_i y α_j , sin otros datos adicionales. Existe un valor crítico razonable de ± 0.96 por encima del cual, los parámetros obtenidos están claramente correlacionados (*Johnson et al., 1981; Johnson y Frasier, 1985*). Sin embargo, desafortunadamente, no está bien definido el grado en el que los coeficientes de correlación cruzada pueden acercarse a ± 1 sin suponer un claro inconveniente en la estimación de parámetros 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, λ^{ex} , λ^{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, 1985b, 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 (apartado I.5.1.). 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 τ 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, pueden existir verdaderos compartimentos, 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 posteriormente *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 las siguientes ecuaciones:

$$X_a(t) = X_a(t_0) e^{-K_a(t-t_0)}$$

$$X_b(t) = \frac{K_a}{K_d - K_a} X_a(t_0) e^{K_a(t-t_0)} + (K_b(t_0) + \frac{K_a}{K_a - K_b} X_a(t_0)) e^{-K_b(t-t_0)}$$

(I.23)

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

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 (1937a,b)* y *Artom et al. (1938)*. Son las primeras aplicaciones farmacocinéticas del análisis compartimental. En las referencias de Teorell aparece por primera vez la idea de la transformación química como una ruta entre compartimentos. La preocupación de Teorell era la desaparición del fármaco de la sangre o tejidos. La actividad del fármaco, dependiente de su forma química, podría disminuir, tanto por transporte a otra región espacial (eliminación) como por transformación en otro compuesto químico (desactivación). Ambos procesos suponen un tratamiento cinético equivalente en cuanto a la desaparición del fármaco. Así, un compartimento se define como un estado caracterizado por una localización espacial y naturaleza química.

Con el desarrollo actual de la teoría del análisis compartimental y sus múltiples aplicaciones, puede establecerse una definición más general de compartimento: “Un compartimento es una cantidad de material que actúa cinéticamente de forma homogénea y propia” (*Anderson, 1983*). *Rescigno* también

I. Introducción

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 materia. 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 físicoquímicas que gobiernan el intercambio de materia 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 materia con el exterior, en cambio, el sistema compartimental será abierto si existen entradas o salidas de materia 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 (Jacquez, 1972; Anderson, 1983; Godfrey, 1983). 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. (1985b)* introdujeron el concepto de los sistemas compartimentales en este sistema, llegando a resultados coherentes con los previos de *Laws y Brand (1979)*. Posteriormente, *Van den Bergh et al. (1992)* mediante análisis global compartimental en un solo paso llegaron también a resultados análogos a los ya obtenidos en la reacción ESPT del 2-naftol. Otro sistema fotofísico al que se aplicó inicialmente el análisis compartimental fue a la formación del excímero del pireno (*Andriessen et al., 1991*), mediante decaimientos simulados y reales.

Posteriormente se han estudiado otros sistemas fotofísicos mediante análisis global compartimental como es el caso de los sistemas de indicadores fluorescentes

de K^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} . Estos sistemas bicompartimentales se componen del fluoróforo libre y el complejo formado por éste con el ión correspondiente, tanto en el estado fundamental como en el excitado. Mediante la aplicación del análisis global compartimental se han conseguido recuperar constantes cinéticas de formación y disociación de los complejos en el estado excitado, constantes de desactivación y tiempos de vida de los fluoróforos libres y los complejos, así como las constantes de disociación de los complejos fluoróforo-cación en estado fundamental. Los sistemas que se han estudiado han sido el indicador 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. (1993)*. La identificabilidad de un proceso intermolecular irreversible en dos estados excitados (*Boens et al., 1996b*), 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

I. Introducción

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 (1996a)*. 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.

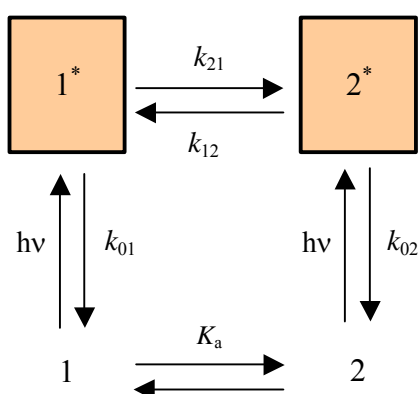
También se ha aplicado en fotofísica el análisis global tricompartmental (tres compartimentos implicados). El primer sistema fotofísico tricompartmental resuelto fue el estudiado por *Khalil et al. (1993)*, quienes describieron la formación del excímero del 1-cianopireno, simultáneamente con el exciplexo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

el 1,2-dimetilindol usando tolueno como disolvente. Las tres especies excitadas eran, por tanto, el 1-cianopireno, el excímero y el exciplejo. Inicialmente, mediante análisis global bicompartimental encontraron una constante de formación del exciplejo controlada por difusión, y una de disociación despreciable. Igualmente, por medio del análisis global bicompartimental, calcularon la constante de formación del excímero, siendo la disociación del mismo también despreciable. La aplicación del análisis global tricompartmental a la superficie de decaimientos de fluorescencia proporcionó unos valores de las constantes similares a los que estos autores habían obtenido en los análisis bicompartimentales. Otro sistema compartimental en tres estados excitados fue estudiado más tarde por *Hermans et al. (1995)*, este trabajo trata de un polímero con pireno enlazado en 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. (2005c)*.

El principal problema de los sistemas tricompartmentales, radica en la posible falta de identificabilidad (*Boens y Kowalczyk, 1996a*). 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., 1993*) 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.

Si las especies en el estado fundamental del esquema I.6 se excitan con un pulso δ , 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:

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

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

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

La derivada en el tiempo del vector de concentraciones viene expresada como $\dot{\mathbf{x}}(\mathbf{t})$, mientras que \mathbf{A} es la matriz compartimental 2×2 :

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

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

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

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} . γ_1 y γ_2 son los autovalores de \mathbf{A} correspondientes a los autovectores \mathbf{U}_1 y \mathbf{U}_2 respectivamente, de forma que:

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

$\tilde{b}(\lambda^{ex})$ es el vector 2×1 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 $\tilde{b}(\lambda^{ex})$ 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. $\tilde{c}(\lambda^{em})$ es el vector 1×2 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 λ^{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:

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

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

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 $t \geq 0$):

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

I. Introducción

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

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

y vienen dados por:

$$\gamma_i = \frac{a_{11} + a_{22} \pm \sqrt{(a_{22} - a_{11})^2 + 4a_{12}a_{21}}}{2} \quad (\text{I.35})$$

con:

$$X = k_{01} + k_{21} \quad (\text{I.36})$$

$$Y = k_{02} + k_{12}$$

Así, los factores exponenciales γ_i y consecuentemente los tiempos de decaimiento τ_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 $\tilde{b}_i(\chi^x)$ y $\tilde{c}_i(\chi^m)$:

$$p_i = \kappa(\tilde{c}_1\beta_{11} + \tilde{c}_2\beta_{21}) \quad (\text{I.37})$$

$$p_i = \kappa(\tilde{c}_1\beta_{12} + \tilde{c}_2\beta_{22})$$

siendo:

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

Es importante notar que cuando en la reacción en el estado excitado intervienen otras especies, como un co-reactante, los propios protones en reacciones de transferencia protónica, un aceptor/dador protónico, etc., la forma de la matriz \mathbf{A} y consecuentemente, el resto de las ecuaciones también se modificará. Puesto que es específica de cada esquema cinético será distinta, ya que representa las ecuaciones diferenciales derivadas del modelo.

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, k_{12} correspondería a la constante de desprotonación de primer orden y la protonación en el estado excitado vendría dada por $k_{21}[\text{H}^+]$, siendo k_{21} la constante cinética de segundo orden y la matriz \mathbf{A} de la ecuación I.26 se modificará, de forma que donde aparece k_{21} , debería encontrarse $k_{21}[\text{H}^+]$.

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 $\text{p}K_a$ 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: $\tilde{b}_i(\lambda^{ex}, \text{pH})$.

La ecuación I.36, donde se definen X e Y será:

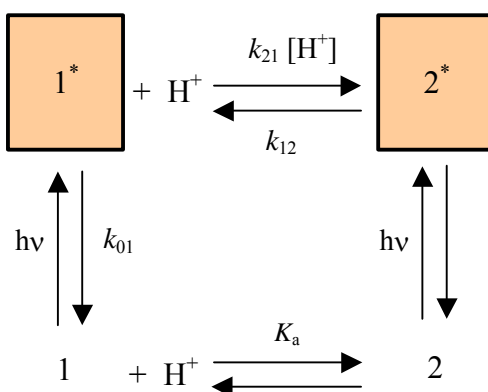
$$X = k_{01} + k_{21}[H^+] \tag{I.39}$$

$$Y = k_{02} + k_{12}$$

En esta situación, los tiempos de decaimiento τ_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:

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

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

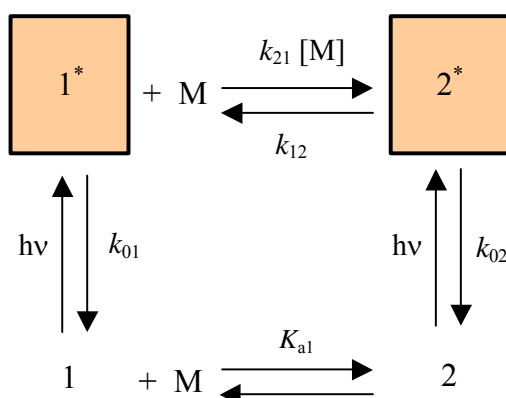
Ya en la década de los 80 se desarrolló el análisis simultáneo o global en el que se relacionan los distintos decaimientos (*Knutson y Beechem, 1983; Boens et al., 1989; Janssens et al., 1990; Beechem et al., 1991*), aprovechando los parámetros comunes que aparecen en ellos (sección I.5.1.4), con lo 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

I. Introducción

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., 1985b*); *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.

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



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

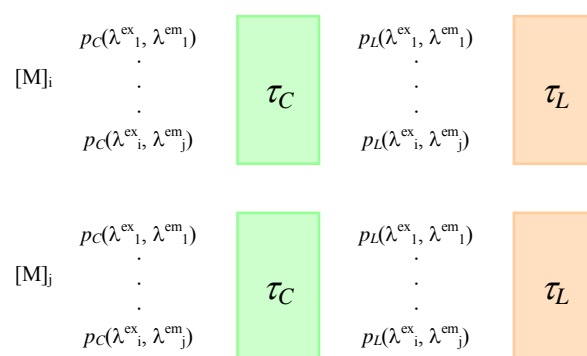
Una comparación entre análisis global y análisis global compartimental en procesos fotofísicos la realizaron *Meuwis et al. (1995a)* mediante superficies de decaimientos simulados de fluorescencia. Tuvieron en cuenta la diferente precisión y fiabilidad en la obtención de parámetros cinéticos por ambos 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 describirse como 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:

Como se ve en el esquema I.7, 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.

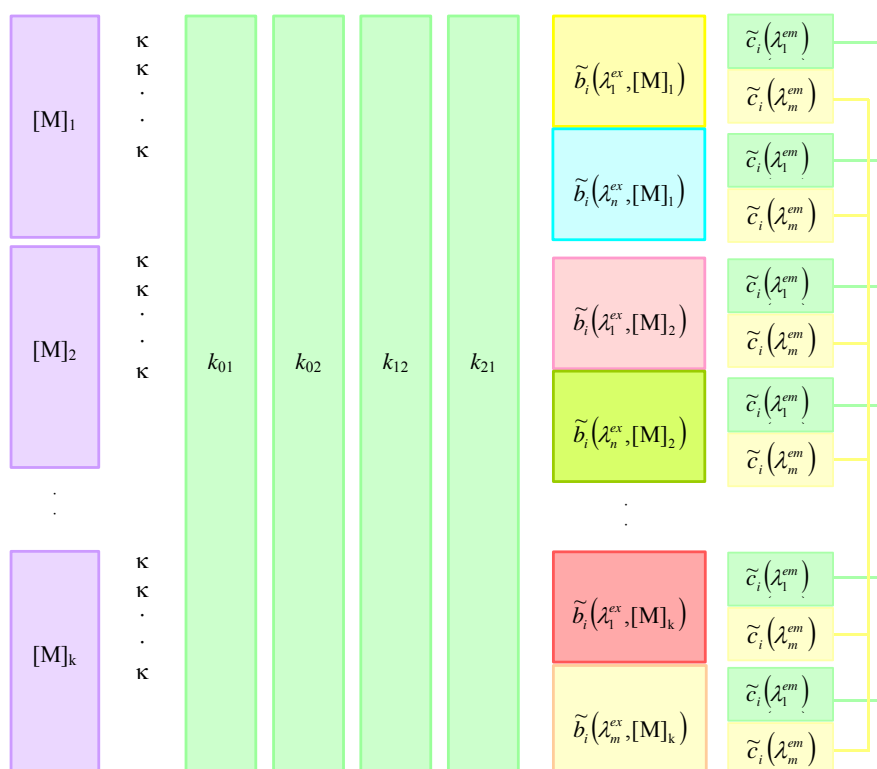
Mediante análisis global biexponencial los parámetros estimados son los tiempos de decaimiento, corto (τ_C) y largo (τ_L) y sus amplitudes asociadas $p_{C,L}$. El esquema de ligado de parámetros mediante análisis global en esta situación, se muestra en el esquema I.9. En este esquema los tiempos de vida,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

I. Introducción



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 B₁ ($k_{02} + k_{12} > k_{01} k_{02}$) y B₂ ($k_{01} > k_{02} + k_{12} > k_{02}$).

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 global 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 global. Cuando

I. Introducción

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 determinarían mediante análisis global, a través de las representaciones lineales de $-(\gamma_1 + \gamma_2)$ y $\gamma_1\gamma_2$ frente a $[M]$, obteniéndose 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 B₁ 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 mejoró y proporcionó 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. APLICACIÓN DEL ESTER SUCCINIMIDO DE TGIII AL ETIQUETADO DE ADN PARA LA DETECCIÓN DE LA HIBRIDACIÓN EN MEDIOS HOMOGÉNEOS

El trabajo de investigación llevado a cabo en esta Memoria está dirigido al desarrollo de nuevas sondas fluorescentes mejoradas para el etiquetado de biomoléculas, tales como proteínas o ácidos nucleicos. Por lo tanto, una de las aplicaciones del fluoróforo sintetizado y estudiado en este trabajo es su uso como etiqueta fluorescente que posea la suficiente sensibilidad para detectar la hibridación de ácidos nucleicos y que, al mismo tiempo, sea relativamente sencillo y permita el análisis en medios homogéneos, sin tediosas manipulaciones que requieran de personal especializado. Nuestro mayor esfuerzo se dedicará al estudio del mecanismo a través del cual se produce el cambio en la propiedad fluorescente, lo que permite la detección de la formación de la doble cadena.

Las extraordinarias propiedades fisicoquímicas del ADN y ARN, en lo que se refiere a las interacciones entre cadenas complementarias para formar la estructura híbrida, hacen de este proceso una técnica única en la identificación y localización de genes específicos o secuencias asociadas. Por este motivo, las sondas de ADN poseen gran potencial en un amplio rango de aplicaciones, entre las que se pueden destacar la detección de enfermedades infecciosas y genéticas en humanos, animales y plantas, la utilización cada vez más extensa en medicina forense y el nuevo campo farmacéutico de ADN y ARN antisentido (5'-3').

El interés que poseen las sondas de ADN ha hecho que se esté realizando un gran esfuerzo para trasladar técnicas de hibridación del laboratorio de investigación al laboratorio clínico, al objeto de poder diagnosticar enfermedades genéticas y patógenas. Sin embargo, la aceptación de métodos de hibridación en el laboratorio clínico no está totalmente generalizada debido a los inconvenientes que poseen las sondas radiactivas y enzimáticas, tales como su elevado costo, escaso tiempo de vida de reactivos y dificultades de manejo.

En contraste, las técnicas fluorimétricas que utilizan fluoróforos enlazados a ADN pueden permitir el análisis con empleo de reactivos más sencillos y baratos, a la vez que poseen mayor tiempo de validez, reduciendo los problemas de almacenamiento. Además, los factores ambientales (rendimiento cuántico, tiempo de vida, grado de polarización y transferencia de energía) y la sensibilidad de propiedades de emisión de un fluoróforo, permiten la posibilidad de desarrollar los denominados análisis homogéneos, en los que se reduce de forma considerable la complejidad del procedimiento al no ser necesaria la separación del exceso de sonda añadida que no resulte hibridada con el ADN objetivo. Los primeros métodos desarrollados (Watson *et al.*, 1976; Kobayashi *et al.*, 1979; Jolley *et al.*, 1981; Kronick y Grossman, 1983), demostraron que la fluorescencia poseía ventajas sobre los métodos convencionales basados en la detección radiactiva o enzimática. En algunos trabajos se utilizaban fluoróforos en la investigación de secuencias de ADN en hibridaciones *in situ*, o mediante el uso de intercaladores para observar bandas en geles de electroforesis (Rayburn y Gill, 1987; Cardullo *et al.*, 1988; Mathies *et al.*, 1990).

Debido a que las sondas de ADN con secuencias específicas de interés son caras y disponibles tan sólo en cantidades limitadas, en este trabajo se ha utilizado inicialmente un sistema modelo en el cual el ácido polirribocitidílico, poli(C), actúa como sonda y el ácido polirriboinosínico, poli(I), como diana. Usando este sencillo sistema como modelo se han examinado los procedimientos de marcaje con el ester succinimido de TGIII y se ha investigado el cambio en los parámetros fluorimétricos de las sondas etiquetadas después de hibridar con la secuencia diana, al objeto de escoger aquellas que evidencien las variaciones más acusadas tras la hibridación y por tanto, resulten más sensibles para la detección analítica.

Asimismo, es importante destacar que con anterioridad a este trabajo, el marcaje covalente de sondas de ADN se ha realizado fundamentalmente mediante etiquetado con fluoróforos en la posición 5' final, o a través del uso de mononucleótidos fluorescentes que son incorporados posteriormente dentro de la secuencia deseada con un sintetizador comercial de ADN. Estas técnicas utilizan

productos químicos de elevado precio, lo que origina que la generación de sondas fluorescentes de ácidos nucleicos sea bastante cara. En la programación de esta investigación se ha tenido en cuenta el anterior inconveniente, por lo que hemos utilizado un etiquetado mediante un procedimiento de transaminación que puede adaptarse a los grupos citosina de las cadenas de ácidos nucleicos. Con este procedimiento ha sido posible etiquetar rápida y económicamente las cadenas de ácido polirribocitídílico (poli(C)), usando productos químicos muy asequibles.

I.6.1. BREVE HISTORIA SOBRE EL DESARROLLO DE LAS SONDAS DE ADN

Los orígenes de la tecnología con sondas de ADN se remonta a los trabajos iniciales sobre las mismas propiedades del ADN. Así, el potencial de la hibridación de ácidos nucleicos se detectó por vez primera en 1961 por Hall y Spiegelman, cuando demostraron que los híbridos de doble cadena de secuencias complementarias de ácidos nucleicos se podían formar en presencia de otros ácidos nucleicos no complementarios (*Hall y Spiegelman, 1961*). Más tarde se observó que la absorbancia a 260 nm de una disolución de ADN aumentaba aproximadamente un tercio de su valor después de hervida y que podía volver a su valor inicial si la mencionada disolución era enfriada muy lentamente; mientras que esto no ocurría cuando el enfriamiento se realizaba de forma rápida. La explicación de estos hechos es que las cadenas de ADN, previamente separadas por calentamiento, se vuelven a reasociar por enfriamiento lento, no sucediendo así si se enfría rápidamente. Las condiciones que controlan este proceso fueron extensamente examinadas por *Marmur y Doty (1961)*, *Britten y Khone (1968)* y *Wetmur y Davidson (1968)*. Britten y Khone basaron sus estudios en un método que detecta la hibridación en disolución mediante un aislamiento selectivo de híbridos en una matriz sólida de hidroxapatito, en la que se enlazan preferentemente ácidos nucleicos de doble cadena. Por otro lado, Marmur, Doty, Wetmur y Davidson llevaron a cabo sus investigaciones midiendo la hipercromicidad a 260 nm.

El interés de la hibridación de ácidos nucleicos como herramienta en la detección e identificación de microorganismos infecciosos se comprobó por primera vez en los comienzos de la década de 1970 con estudios sobre virus cultivados en células animales. La capacidad de determinar y estimar, no sólo la fracción del genoma viral presente sino también el número de copias virales, provocó la amplia difusión del uso de esta técnica (*Gelb et al., 1971*). A partir de ahí, muchos investigadores reconocieron el enorme potencial de la técnica en la determinación de relaciones genéticas y taxonómicas entre microorganismos.

Se han desarrollado numerosos sistemas basados en la hibridación de ADN entre cadenas sencillas (dianas) y sus secuencias complementarias (sondas) tanto en disolución como en soporte sólido. La idea de inmovilizar la cadena diana en un soporte sólido se debe a McCarthy y Bolton (*McCarthy y Bolton, 1963; Hoyer et al., 1964*), quienes mezclaron las cadenas desnaturalizadas de ADN con agar caliente y dejaron polimerizar la disolución. Posteriormente utilizaron fragmentos de ADN etiquetados con isótopos radiactivos, que podían difundir a través del agar y formar estructuras híbridas. Finalmente, la sonda no hibridada se retiraba del soporte por repetidos lavados. La técnica fue sensiblemente mejorada posteriormente con la utilización de membranas de nitrocelulosa para inmovilizar el ADN diana (*Nygaard y Hall, 1963; Denhardt, 1966; Gillespie y Spiegelman, 1966*). El uso de estas técnicas de inmovilización, primero por *Grunstein y Hogness (1975)* para identificar colonias de bacterias y después por *Southern (1975)* para detectar secuencias específicas, marcó el comienzo de lo que podríamos denominar la “edad moderna” de la biología molecular. En la versátil técnica de Southern, el ADN se digiere con enzimas de restricción que dividen específicamente las moléculas de ADN hasta sus secuencias individuales de reconocimiento. Los fragmentos de ADN se separan por electroforesis, de acuerdo a su tamaño en un gel de agarosa y se transfieren a una membrana de nitrocelulosa o nylon (*Meinkoth y Wahl, 1984*). La electroforesis convencional puede separar fragmentos entre 100 y 30000 pares de bases, mientras que otras técnicas electroforéticas más sofisticadas, a base de campos pulsantes,

puede resolver fragmentos hasta de 200000 pares de bases (*Schwartz y Cantor, 1984; Carle y Olsen, 1985; Chu et al., 1986; Clark et al., 1988*).

Tan importante como la tecnología de inmovilización, fue el desarrollo de las sondas de hibridación. Inicialmente se utilizaron como sondas ácidos nucleicos marcados radiactivamente, los cuales fueron creados mediante simple introducción *in vivo* de (^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S). En 1970, Nelly y sus colaboradores (*Kelly et al., 1970*) describieron por primera vez las bases del método de “correr la muesca” (*nick-translation*) para preparar ADN etiquetado con ^{32}P que podía utilizarse como sonda de hibridación, aunque los detalles exactos del procedimiento no fueron descritos hasta 1977 (*Rigby et al., 1977*). El método se sigue usando aún para generar sondas de ADN etiquetadas radiactivamente. El marcaje con radioisótopos ofrece la posibilidad de incorporar varias etiquetas por cada sonda, incrementando así la sensibilidad en la detección. Entre las desventajas de los radioisótopos se pueden incluir la molesta naturaleza de los métodos de detección, la inestabilidad isotópica, la peligrosidad de su uso, los problemas de suministro, las instalaciones que se precisan y el personal especializado que debe de manipularlos. Además de las etiquetas radiactivas, se han sintetizado oligodesoxinucleótidos con una gran variedad de grupos reactivos tales como, aldehído y carboxilo (*Kremsky et al., 1987*), amino (*Connolly, 1987*) o sulhidrilo (*Zuckermann et al., 1987*).

De entre los métodos no radiactivos, el método más clásico fue desarrollado por Ward y colaboradores (*Langer et al., 1981; Leary et al., 1983*) y utiliza una desoxiuridina-5' trifosfato derivatizada químicamente para introducir un grupo alilamino en la posición 5 del anillo pirimidínico. Este grupo amino sirve para fijar la etiqueta detectable, típicamente un grupo biotina separado del anillo por una cadena de 11 átomos (bio-11-dUTP). Bio-11-dUTP es un sustrato para la ADN polimerasa y puede incorporarse en el ADN en lugar del dUTP. Las sondas biotiniladas están muy extendidas ya que mediante la interacción por afinidad de la biotina, virtualmente irreversible ($K_D=10^{-15} \text{ M}^{-1}$), con conjugados de avidina o estreptoavidina que llevan enlazados enzimas, se puede conseguir una gran variedad de sondas con sólo acoplar los citados conjugados a fragmentos adecuados de ADN u oligonucleótidos sintéticos (Figura I.21.). Ambas avidinas tienen cuatro sitios de enlace para la biotina, por lo

I. Introducción

que una simple molécula enlazada a ADN puede interaccionar con adicionales moléculas de biotina etiquetada. Además, las enzimas también podían ser acopladas químicamente a los oligonucleótidos (*Jablonski et al., 1986; Chu y Orgel, 1988*), permitiendo una detección con alta sensibilidad, mediante la acción catalítica del enzima sobre un sustrato apropiado. Con estas técnicas se podían alcanzar sensibilidades similares a las conseguidas con radioisótopos con sólo formar complejos de sonda-enzima (*Leary et al., 1983; Sheldon, 1986*).

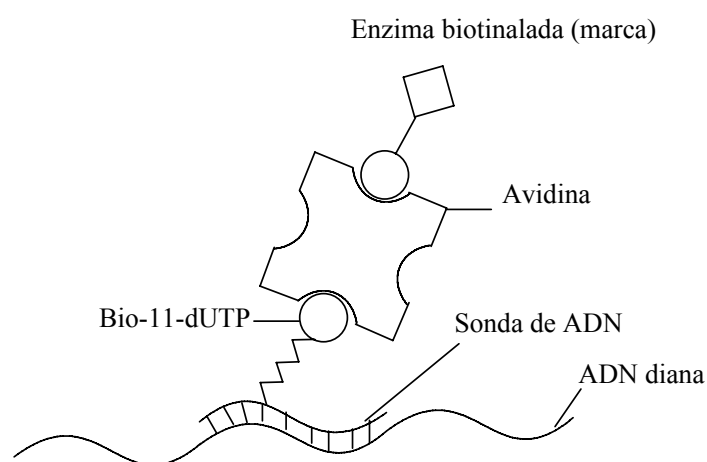


Figura I.21. Representación esquemática del principio de actuación de sonda biotilada

Algunas variaciones del método clásico utilizan trifosfatos biotilados de dCTP (*Gillan y Tener, 1986*) y dATP (*Gebeyehu et al., 1987*), que son también sustratos para la ADN polimerasa. Estos análogos difieren de los derivados de dUTP en que sus sustituyentes de biotinilo están localizados en los átomos de nitrógeno involucrados en la formación de pares de bases, lo que podía originar inconvenientes en la hibridación dependiendo del grado de sustitución de la sonda de ADN. Sin embargo, estos análogos eran especialmente útiles para etiquetar muestras en las que el derivado del dUTP es inapropiado. El análogo al dCTP se prepara cambiando el grupo amino de dCTP por una diamina y seguidamente biotilando el grupo diamina. Similares cambios podían realizarse directamente en fragmentos de ADN para introducir, por ejemplo, biotinil-hidrazina (*Reisfeld et al., 1987*) o etilendiamina

(*Viscidi et al., 1986*) (que se utiliza en esta Memoria). Otro método directo para introducir grupos biotinilados en ácidos nucleicos utiliza el reactivo fotobiotina (*Forster et al., 1985*). Este reactivo fotoactivable combina un grupo biotinilo que es sensible a la luz y un grupo básico que permite la asociación con polinucleótidos en disolución. La irradiación con luz visible genera un radical altamente reactivo que enlaza covalentemente al polinucleótido.

Sin embargo, la sensibilidad de la detección del ADN diana por métodos enzimáticos es menor que la obtenida con sondas radiactivas y está altamente limitada por la aparición de un considerable ruido de fondo. Además, la actividad específica de la sonda nucleotídica también está limitada por el espaciado de los grupos biotinilo en la cadena de ADN, ya que para acomodar el diámetro de una molécula de avidina sólo se puede biotinar un nucleótido de cada 20.

La utilización de fluoróforos orgánicos también se extendió bastante en la detección de los híbridos, ya que representan un grupo de moléculas bastante atractivas para este fin debido a que son directamente detectables, poseen una estabilidad considerablemente alta y ofrecen la oportunidad de la detección simultánea de múltiples sondas, mediante la utilización de diferentes fluoróforos con espectros de emisión discriminables. Los mismos cebadores con grupos reactivos que se utilizan en la obtención de desoxinucleótidos radiactivos (*Ansorge et al., 1987; Smith et al., 1989*) se pueden etiquetar con moléculas fluorescentes e introducirlos de forma similar a los grupos biotinilo o mediante conjugados fluoróforo-avidina (*Oi et al., 1982; Stryer et al., 1985*). Por otro lado, la fluorescencia debida a quelatos de iones metálicos de tierras raras, tales como europio o terbio, también comenzó a emplearse en inmunofluoroensayos a niveles similares a los alcanzados con enzimas

(*Soini y Kojola, 1983; Diamandis, 1988; Oser et al., 1988*). Debido al amplio tiempo de vida de fluorescencia de estos iones metálicos respecto a la mayoría de especies fluorescentes, la detección se podía efectuar mediante resolución temporal de la fluorescencia con la ventaja de presentar bajo ruido de fondo, ya que la fluorescencia intrínseca de cualquier especie que se encuentre en la muestra

biológica habrá decaído prácticamente a cero mucho antes de que se detecte la señal debida a estos iones metálicos.

I.6.2. MÉTODOS DE DETECCIÓN DE HIBRIDACIÓN DE ADN

El extraordinario potencial de la hibridación de ácidos nucleicos ha provocado que se hayan desarrollado en las últimas décadas una enorme cantidad de sondas de ADN (*Sassolas et al., 2008*) basadas, no solo en técnicas fluorimétricas (*Abel et al., 1996; Healey et al., 1997; Fang et al., 1999*), sino otras métodos ópticos tales como quimioluminiscencia (*Marquette et al., 2004; Mallard et al., 2005*), espectroscopia de dispersión Raman aumentada en superficies (SERS), SPR (*Mannelli et al., 2005; Yao et al., 2006*), además de métodos electroquímicos (*Azek et al., 2000; Cai et al., 2001; Xie et al., 2004*) y gravimétricos (*Patolsky et al., 2000; Willner et al., 2002; Su et al., 2005*).

La mayor parte de los ensayos con sondas de ADN se realizan mediante la inmovilización del material que va a ser analizado en un soporte sólido, como membranas de nitrocelulosa o nylon. Luego se prueban las secuencias deseadas mediante la inmersión de la membrana en una disolución que contenga la sonda y otros reactivos que faciliten la formación del híbrido sonda-diana. El exceso de sonda no hibridada debe retirarse mediante repetidos lavados que deben eliminar también las uniones no específicas de la sonda. Si se usan métodos indirectos para la detección, se deberán realizar incubaciones adicionales con el agente secundario que contiene el material detectable. Muchas veces los resultados se oscurecen por problemas de enlaces no específicos de la sonda, además, la inmovilización de la cadena diana hace más lenta la velocidad de hibridación (lo que se puede compensar añadiendo concentraciones más altas de sonda) y también reduce significativamente la cantidad de la cadena diana disponible para la hibridación. Por tanto, resulta necesario desarrollar métodos para la detección de la hibridación de ADN en medios homogéneos, en los cuales desaparecen todos estos inconvenientes.

De entre todas las técnicas desarrolladas para detectar la hibridación de ADN nos centraremos en aquellas que utilizan métodos fluorescentes. En general, el empleo más usual de fluoróforos se encuentra en las denominadas hibridaciones *in situ* por fluorescencia (FISH). Estas técnicas están basadas en la utilización de sondas de ADN para detectar (y a veces, cuantificar) genes o secuencias nucleotídicas específicas y localizar dichos genes o secuencias en cromosomas metafásicos o núcleos en interfase. En este caso, la sonda (ADN o ARN) se marca por conjugación química directa con un fluoróforo o bien por conjugación química con una molécula no fluorescente, como la biotina o un hapteno, capaz a su vez de unirse posteriormente a una segunda molécula marcada con un fluoróforo, como la avidina, en el caso de la biotina, o a un anticuerpo específico, en el caso del hapteno. Tras la hibridación y los lavados respectivos, la sonda se irradia, el fluoróforo emite luz de una determinada longitud de onda y ello permite distinguir la secuencia complementaria como una mancha de color vivo al microscopio de fluorescencia (figura I.22). La hibridación *in situ* con sondas fluorescentes resulta muy útil en el diagnóstico de síndromes ocasionados por microdelecciones y para detectar reordenamientos o fusiones génicas en células cancerosas.

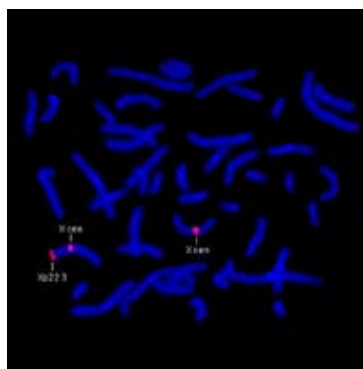


Figura I.22. Hibridación *in situ* con sondas fluorescentes

I.6.2.1. Sondas de hibridación FRET

Las sondas FRET son sondas de hibridación que se basan en la transferencia resonante de energía de fluorescencia (FRET) entre dos fluoróforos para detectar el enlace con la cadena diana (*Cardullo et al., 1988; Didenko, 2001; Massey et al.,*

I. Introducción

2006). El fluoróforo que emite la energía de fluorescencia se denomina dador, mientras que el fluoróforo que la acepta se denomina aceptor. El hecho de que ocurra FRET depende de varios parámetros, tales como la distancia entre el dador y el aceptor y el solapamiento espectral entre el espectro de emisión del dador y el de absorción del aceptor (*Lakowicz, 1999*). La eficiencia de la transferencia (E) viene dada por la siguiente expresión:

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad (\text{I.42})$$

donde R_0 es la distancia entre los fluoróforos a la cual la mitad de las moléculas están desactivadas por FRET (también se denomina distancia de Förster), y r representa la distancia real entre los fluoróforos durante la medida. La distancia de Förster se puede calcular usando la siguiente expresión (*Lakowicz, 1999*)

$$R_0^6 = \frac{9000(\ln 10)k^2\varphi J}{128\pi^5 n^4 N_{Av}} \quad (\text{I.43})$$

siendo n es el índice de refracción del medio, φ es el rendimiento cuántico del dador, N_{Av} es el número de Avogadro, κ^2 es el factor de orientación, que es igual a 0.667 para moléculas libres en disolución y J es la integral de solapamiento dada por (*Lakowicz, 1999*):

$$J = \int_0^\infty f_D(\lambda)\varepsilon_A(\lambda)\lambda^4 d\lambda \quad (\text{I.44})$$

donde $f_D(\lambda)$ es el espectro de fluorescencia del dador y $\varepsilon_A(\lambda)$ es el espectro de absorción del aceptor en unidades de coeficiente de extinción molar.

De la ecuación I.42 se deduce que FRET es altamente dependiente de la distancia entre los fluoróforos, mientras que la ecuación I.43 muestra la dependencia cuantitativa de R_0 con la integral de solapamiento y el rendimiento cuántico del dador. Estos factores deben ajustarse cuidadosamente para obtener transferencias de energías óptimas.

Las sondas de hibridación FRET consisten en dos oligonucleótidos etiquetados con fluoróforos. El par de secuencias de la sonda de hibridación se diseña para que se hibriden en regiones adyacentes de la cadena diana de ADN. Cada sonda se etiqueta con un fluoróforo diferente, de forma que la interacción entre ellos solo ocurre cuando ambos están enlazados a sus correspondientes regiones en la diana. Normalmente, una sonda se etiqueta con el dador en el extremo 3' y la otra sonda con el aceptor en el extremo 5'. Cuando se produce la hibridación de los nucleótidos sonda, los fluoróforos quedan próximos en la estructura híbrida (Figura I.23). El fluoróforo dador se excita mediante una fuente de luz externa, pasando parte de su energía de emisión al fluoróforo aceptor. El cual emite luz a una longitud de onda diferente, que puede ser detectada y medida (Cardullo *et al.*, 1988).

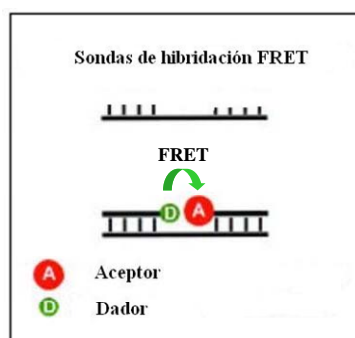


Figura I.23. Esquema general de las sondas de hibridación por transferencia de energía (FRET)

I.6.2.2. Sondas *Molecular Beacons*

El concepto de los *molecular beacons*¹ fue introducido por *Tyagi y Kramer* en 1996 y se aplicó con éxito a los ensayos de hibridación de ácidos nucleicos (*Tyagi et*

¹ No existe una traducción al castellano consagrada por el uso. Vocabulario inglés-español de bioquímica y biología molecular (5ª entrega). Claros, G.; Saladrigas M.V.; González-Halphen, D., Panace@, **16**, 109-126 (2004).

al., 1996). Una sonda *molecular beacon* es un oligonucleotido que contiene un fluoróforo y un quencher en diferente extremo de la cadena. Esta cadena de oligonucleotido está compuesta por una región sonda (*loop*) complementaria a una secuencia diana y dos regiones de 5-6 bases que son auto-complementarias en los extremos opuestos (*stem*). En ausencia de la cadena diana, las partes complementarias están hibridadas formando una estructura de horquilla (*loop-stem*), de forma que el fluoróforo y el quencher están próximos (*Tan et al.*, 2004). En este caso el quencher desactiva el estado excitado del fluoróforo produciendo una gran disminución de la fluorescencia. Sin embargo, en presencia de la secuencia diana la región sonda del *molecular beacon* se hibrida a ella originando la apertura de la configuración de horquilla y por lo tanto, la separación del fluoróforo del quencher. Debido al aumento de la distancia entre el fluoróforo y el quencher, la fluorescencia del fluoróforo ya no está desactivada tras la hibridación, lo que se traduce en un aumento de la emisión de fluorescencia (figura I.24.). Esto ocurre, en principio, cuando la secuencia sonda se ha hibridado selectivamente con la secuencia diana (*Tsourkas y Bao*, 2003).

Un *molecular beacon* ideal no debería mostrar ninguna fluorescencia en la conformación de horquilla cerrada (en ausencia de diana) y una emisión de fluorescencia intensa en la conformación abierta, es decir, cuando hibrida con la secuencia diana. La eficiencia de la detección de la secuencia diana de un *molecular beacon* se combaza en la relación señal-ruido, que es la relación de la señal de fluorescencia en presencia de la diana con la señal de fluorescencia antes de la adición de ésta (*Tsourkas y Bao*, 2003). La señal del ruido puede provenir de varias fuentes. Así, puede tener su origen en un *molecular beacon* parcialmente etiquetado el cual posee el fluoróforo, pero no el quencher, en una pequeña cantidad de estructuras con conformación de horquilla abierta en ausencia de la diana, y de la ineficiencia del quencher para desactivar totalmente la fluorescencia del fluoróforo (*Jockusch et al.*, 2006).

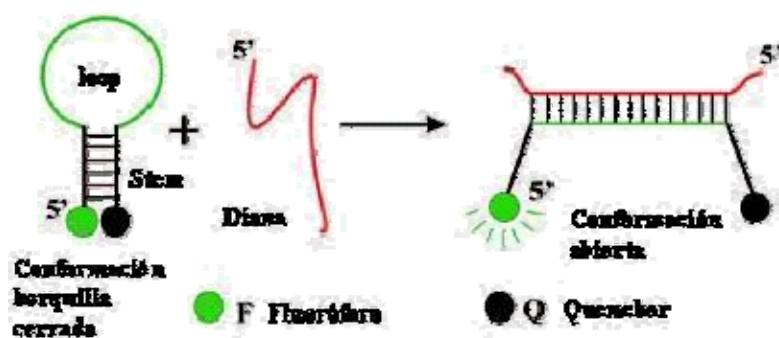


Figura I.24. Esquema general de un *molecular beacon* en su conformación de horquilla (izquierda), e hibridada con la secuencia diana (derecha).

A pesar de todas las ventajas inherentes de los *molecular beacons*, se ha observado que cuando se emplean en ambientes biológicos complejos, como en células, a veces pueden dar falsos positivos (Santangelo *et al.*, 2004; Tanke y Dirks, 2005). Algunas explicaciones para estos falsos positivos pueden ser la apertura de la conformación de horquilla por la interacción con proteínas o membranas, así como por agentes intercaladores en el citoplasma de la célula que pueden alterar la estabilidad de la horquilla. Además, también podría ser posible la liberación del fluoróforo o del quencher del *molecular beacon* por la acción de nucleasas. Otra complicación adicional podría ser la inserción del *molecular beacon* dentro de la célula. Puesto que un *molecular beacon* no debe fluorecer en ausencia de la diana, si la incorporación dentro de la célula no fuera posible, ya que la difusión del *molecular beacon* en el interior no podría ser visualizada hasta que éste se enlace con la diana.

I.6.2.3. Sondas *Molecular Beacons* con dos fluoróforos

Los *molecular beacons* con dos fluoróforos poseen varias ventajas, tales como una mejor visualización de su inyección en células, la posibilidad de análisis ratiométrico para mejorar la relación señal/ruido y el uso de detección en dos canales para permitir la visualización, no solo de la difusión del *molecular beacon* hibridado con la diana, sino también del *molecular beacon* en su conformación de horquilla. En estos sistemas, el quencher se sustituye por otro fluoróforo, el cual actúa como aceptor de energía (Zhang *et al.*, 2001; Jockusch *et al.*, 2006) (figura I.25.).

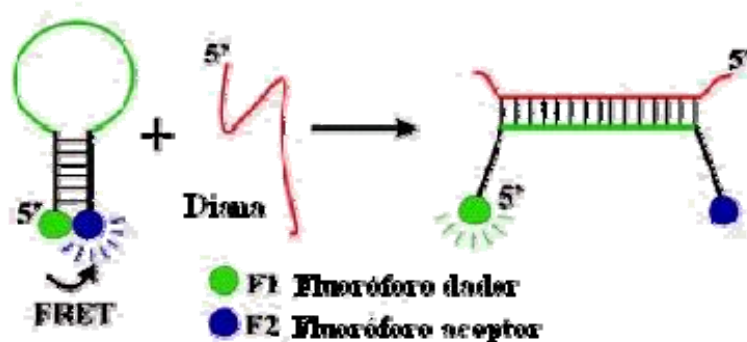


Figura I.25. Esquema general de un *molecular beacon* con dos fluoróforos. La transferencia de energía se observa cuando está en la conformación de horquilla (izquierda), pero no hay transferencia cuando está en la conformación abierta (derecha).

En la conformación de horquilla los dos fluoróforos están cerca, lo que permite la transferencia de energía (FRET) entre ellos. Sin embargo, cuando el *molecular beacon* está hibridado con la secuencia diana los dos fluoróforos están lo suficientemente separados para que no se observe FRET. La figura I.26 muestra la fluorescencia, principalmente del aceptor (RedX), en ausencia de diana, como consecuencia de la transferencia de energía desde el dador (Alexa-488). En presencia de la diana ambos fluoróforos estarán separados, como consecuencia de la hibridación, lo que impide que ocurra FRET, observándose por tanto un gran aumento de fluorescencia del dador.

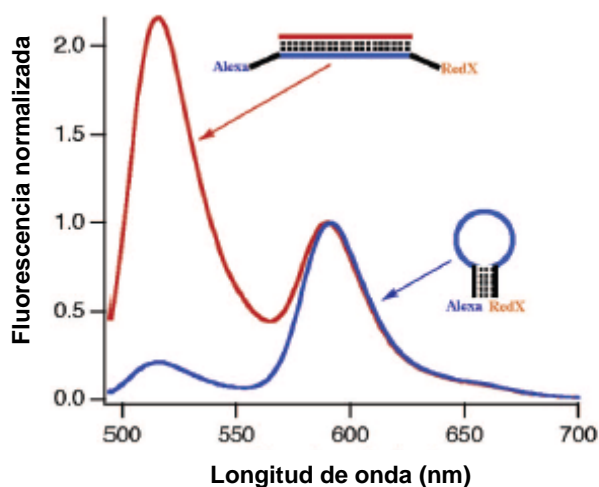


Figura I.26. Espectros de emisión de un *molecular beacon* con dos fluoróforos: en ausencia (—) y en presencia (—) de la secuencia diana (Martí et al., 2007).

I.6.2.4. Intercaladores de ADN

Existen diferentes tipos de moléculas que pueden interactuar con el ADN. Estas moléculas, también denominadas ligandos, pueden interactuar con DNA formando enlaces covalentes, mediante uniones electrostáticas o intercalamiento. La intercalación sucede cuando moléculas de un tamaño y naturaleza química apropiados encajan entre pares de bases de ADN. Estos ligandos son fundamentalmente policíclicos, aromáticos y planares, siendo, por tanto, buenos agentes de tinción de ácidos nucleicos. Algunos intercaladores de ADN ampliamente estudiados son bromuro de etidio, proflavina, daunomicina, doxorubicina y talidomida.

Estos intercaladores suelen enlazarse selectivamente a cadenas doble de ADN, siendo despreciable el enlazado con cadenas sencillas (figura I.27). Por tanto, se pueden utilizar para la detección de la hibridación de ADN en medios homogéneos sin necesidad de etiquetado de las cadenas ni amplificación de la cadena diana (*Glazer y Ray, 1992; Rye et al., 1992; Rye y Glazer, 1995*). Además, la mayoría de los intercaladores de ADN son fluorescentes únicamente cuando están enlazados al dúplex, evitando la necesidad de retirar del medio el exceso de fluoróforo no enlazado. Los métodos se basan en la medida del aumento de fluorescencia cuando el agente intercalador se enlaza en el interior de la doble cadena. La magnitud de la señal de fluorescencia es, por tanto, proporcional a la cantidad de híbrido formado.

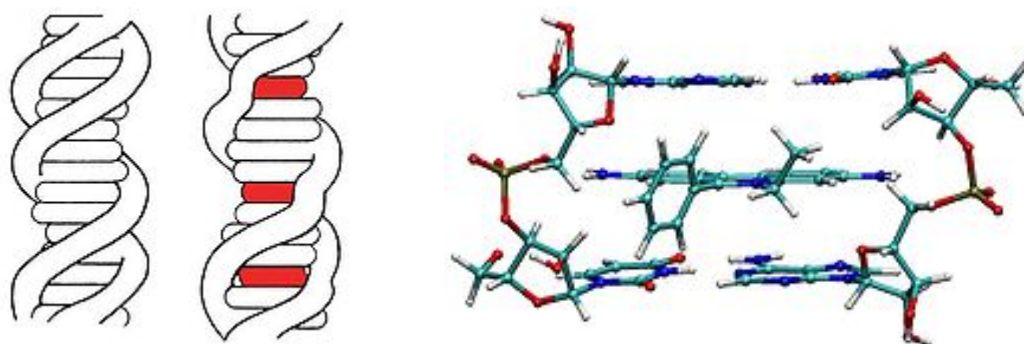


Figura I.27. Esquema general de intercaladores en ADN (izquierda). Ejemplo de intercalado de bromuro de etidio (derecha).

I.6.2.5. Combinación de intercaladores con FRET

En los últimos años ha empezado a desarrollarse la técnica que emplea intercaladores como uno de los fluoróforos necesarios en las sondas de ADN con detección de la hibridación basadas en FRET. Generalmente, la cadena sonda está etiquetada con el fluoróforo dador, y tras la hibridación con la cadena diana y el posterior enlazado del intercalador, que actúa como aceptor, se pueden obtener transferencias resonantes de energía de fluorescencia bastante eficientes (*Banerjee y Pal, 2007; Xu et al., 2005; Wang et al., 2004*) (Figura I.28). Con esta técnica se aumenta no sólo la sencillez en el desarrollo de la sonda, puesto que solo hay que etiquetar una cadena sino también la sensibilidad en la detección de ADN, cuando se compara con los métodos en los que ésta se basa en cambios directos de la intensidad de fluorescencia del fluoróforo tras la hibridación debido a cambios en el microambiente que rodea a éste éste. Uno de los primeros trabajos que utilizaba esta metodología para la determinación de secuencias de ácidos nucleicos en medios homogéneos fue el desarrollado por *Talavera et al. (2003)*. En este artículo, la cadena sonda de poli(C) era etiquetada con fluoresceína como dador, actuando como aceptor de la FRET el intercalador bromuro de etidio, una vez producida la hibridación con la secuencia diana poli(I).

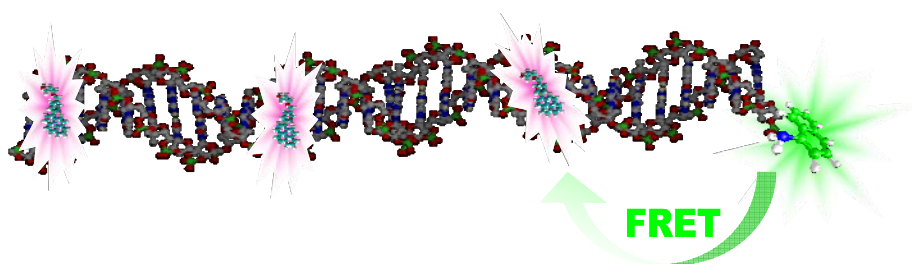


Figura I.28. Esquema de un sistema FRET entre un fluoróforo etiquetando a una cadena de ADN e intercaladores de ADN.

I.6.3. ETIQUETADO COVALENTE DE ÁCIDOS NUCLÉICOS CON FLUORÓFOROS

Las estrategias de etiquetado, usualmente utilizadas para obtener proteínas o ácidos nucleicos marcados con fluoróforos, se pueden dividir en dos categorías:

- Etiquetado directo: Mediante el cual la etiqueta detectable está unida directamente a la sonda.
- Etiquetado indirecto: Donde un hapteno está unido a la sonda y se detecta por el uso de una proteína marcada. Por ejemplo, la biotina sería el hapteno y la avidina la proteína marcada.

En esta Memoria se ha utilizado el método de etiquetado directo del fluoróforo en el oligonucleotido sonda. Sin embargo, previamente al etiquetado, es necesaria la modificación de los oligonucleótidos, ya sea en los grupos fosfato o en las propias bases.

I.6.3.1. Esquemas de derivatización de polinucleótidos para su posterior etiquetado

En general, las reacciones de etiquetado fluorescente más comunes utilizan grupos amino primarios en la biomolécula diana y los candidatos más usuales son los residuos de lisina en proteínas y grupos alquilamino en ácidos nucleicos derivatizados. También los grupos sulfhidrilo, tales como los residuos de cisteína en proteínas, son buenos candidatos para una posterior reacción de etiquetado con iodoacetamidas o haluros orgánicos (ver figura I.30). Los grupos hidroxilo de biomoléculas también pueden reaccionar con isotiocianatos y ésteres activos de fluoróforos adecuados. Sin embargo, estos últimos son menos reactivos que las aminas primarias, por lo que las reacciones de etiquetado deben realizarse en condiciones muy estrictas y conllevan un gran tiempo de reacción (*Brinkley, 1992; Haugland, 1996*).

I. Introducción

En el caso específico de los ácidos nucleicos, la mayoría de los métodos de modificación proporcionan derivados como los que se indican en la figura I.29.

1) Derivatización terminal: Las aminas alifáticas primarias se pueden conjugar en el grupo 5'-fosfato de un oligonucleótido utilizando una reacción estándar (fosfoarimidita). Los productos activados mediante la inclusión de dichas aminas están disponibles en el mercado y se expenden con espaciadores de 2, 3, 6 ó 12 átomos de carbono entre el oxígeno-5' y el grupo amino. Los tioles-5' están disponibles comercialmente. Alternativamente, se puede realizar el etiquetado en el extremo 3'. Según *Jameson y Sawyer (1995)*, el etiquetado en el extremo 5' con dansilo conectado a través de un brazo espaciador de 6 carbonos no afecta ni al punto de fusión (T_m) del dúplex ni al grado de hipercromicidad observado.

2) Derivatización en el fosfato internucleótido: *Caruthers et al., (1995)* reportaron la síntesis de desoxinucleótidos 3'-fosforotioamidita y su incorporación en ADN utilizando un sintetizador de oligonucleótidos comercial con la subsiguiente alquilación.

3) Derivatización en las propias bases: *Haralambidis et al. (1987, 1990a)* han preparado desoxiuridinas sustituidas en la posición C-5, portadoras de un grupo amino alifático primario. Este tipo de modificación permite la incorporación de brazos espaciadores de variada longitud. *Gibson y Benkovic (1987)* describieron la preparación de derivados fluorescentes de la 5-aminopropil desoxiuridina que han sido empleados para estudiar la interacción del fragmento Klenow de la polimerasa I del ADN de *E. coli* con ADN (*Gibson y Benkovic, 1987; Allen y Benkovic, 1989; Allen et al., 1989*). Timidinas amino-modificadas con distintos brazos espaciadores están disponibles comercialmente. *Shapiro y Weisgras (1970)* describieron y utilizaron la transaminación del grupo amino en la posición N⁴ de residuos de citosina de ácidos nucleicos con etilendiamina, usando una reacción de intercambio catalizada por bisulfito. Esta ha sido la modificación llevada a cabo en esta Memoria.

4) Derivatización internucleótido: El reemplazamiento de un nucleósido por un puente de 2 ó 3 átomos de carbono entre el 3'-fosfato de un nucleótido y el 5'-fosfato

del siguiente nucleótido, permite conservar la distancia interfosfato. El puente transporta un brazo alquilamino que puede conjugarse a una molécula fluorescente. Este método tiene la desventaja de que se reemplaza un nucleótido por un grupo extraño.

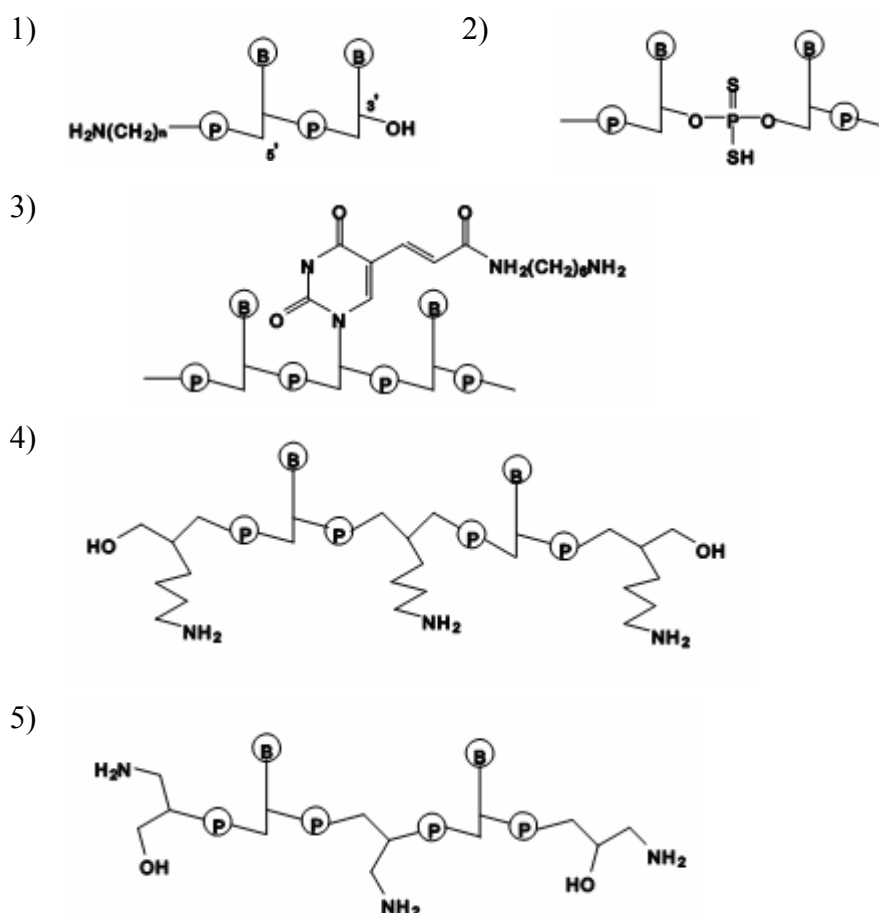


Figura I.29. Tipos de modificaciones en oligonucleótidos para su posterior conjugación con fluoróforos: 1) Derivatización terminal en 5'; 2) Derivatización en fosfato internucleótido; 3) Derivatización de base (timina amino-modificada); y 4) y 5) Derivatización internucleótido.

I.6.3.2 Tipos principales de reacciones de etiquetado con fluoróforos

Como antes se indicó, las reacciones de etiquetado más comunes utilizan grupos amino primarios en la macromolécula diana, aunque muchos autores han utilizado grupos hidroxilo o sulfhidrilo (presentes o introducidos previamente) en la macromolécula. Las reacciones con ésteres activos de succimidilo y con isotiocianatos son relativamente específicas para grupos amino primarios, así mismo

I. Introducción

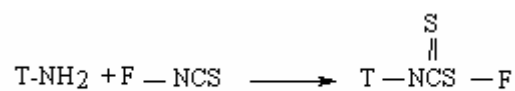
son fácilmente controlables y se completan en un período de pocos minutos (*DePetris, 1978; Brinkley, 1992; Mujumdar et al., 1993; Haugland, 1996*). La reacción de etiquetado con ésteres de succinimidilo compite favorablemente con la hidrólisis del éster activo, aunque las velocidades de ambas reacciones dependen del pH. Así, un valor de pH alto favorece la forma R-NH₂, que reacciona bien con ésteres activos de los fluoróforos. Si disminuye el pH, se origina la forma no reactiva R-NH₃⁺. La mayoría de las reacciones con ésteres activos se llevan a cabo a pH 8.5-9.5 durante un período temporal que oscila entre 15 minutos y varias horas. Cuando se utilizan derivados de isotiocianato como reactivo, se pueden realizar consideraciones similares sobre intervalos de pH y tiempo; aunque en general, los ésteres reaccionan más rápidamente que los isotiocianatos.

Los cloruros de sulfonilo también son muy reactivos con las aminas primarias (*Titus et al., 1982*). Los enlaces formados usando ésteres activos y cloruros de sulfonilo son muy estables y resulta absolutamente esencial que no haya ningún otro componente con grupos amino primarios en el medio de reacción. En algún caso aislado se han utilizado también derivados diclorotriazina del fluoróforo (*Blakeslee y Baines, 1976*).

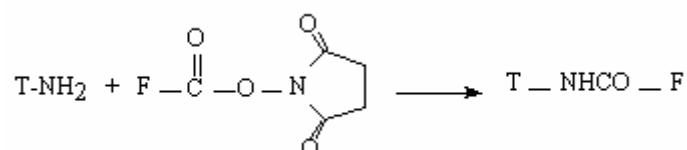
Los grupos hidroxilo de la macromolécula diana son menos reactivos con ésteres de succinimilo e isotiocianatos, aunque generalmente las reacciones se pueden llevar a cabo con éxito bajo condiciones apropiadas que incluyen un largo tiempo de reacción. Los cloruros de sulfonilo e isotiocianatos son más reactivos con grupos hidroxilo que los ésteres de succinimidilo.

Los grupos sulfhidrilo introducidos en ácidos nucleicos modificados pueden etiquetarse con iodoacetamidas, haluros orgánicos, maleimidas y mediante reacciones de intercambio disulfuro (*Brinkley, 1992; Haugland, 1996*). Estos compuestos reaccionan bien con tioles a pH fisiológico (6.5-6.8), resultando la reacción menos efectiva con los grupos amino que están protonados en el citado intervalo de pH. En la figura I.30 se exponen ejemplos de estas reacciones así como de las anteriormente mencionadas.

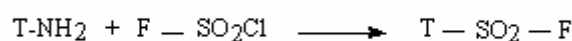
1) Isotiocianato



2) Ester de succinimidil "activo"



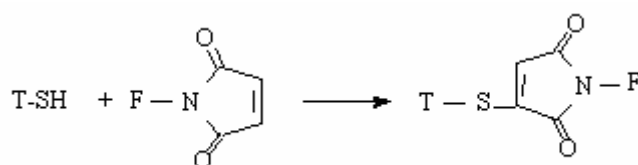
3) Cloruro de sulfonilo



4) Iodoacetamida



5) Maleimida



6) Intercambio disulfido

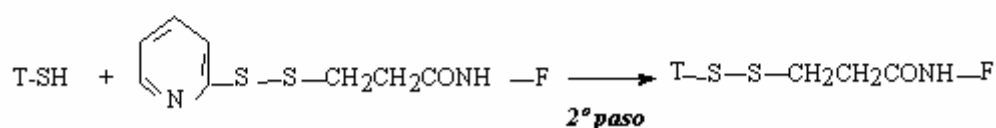
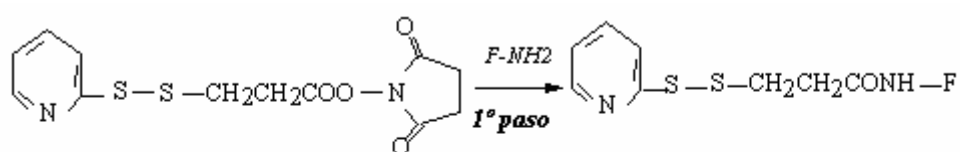


Figura I.30. Esquemas de las reacciones más usuales de etiquetado con fluoróforos.

I. Introducción

La reacción de intercambio disulfuro proporciona un método especialmente útil en el etiquetado de ácidos nucleicos con proteínas y ha sido utilizada por nuestro grupo de investigación para etiquetar C-ficocianina y aloficocianina (dos proteínas con alto rendimiento cuántico de fluorescencia) a polinucleótidos sintéticos (*Bermejo et al., 1997*).

Una vez etiquetado el polinucleótido con cualquiera de estos métodos, la purificación del material fluorescente se alcanza mediante simple precipitación del ácido nucleico en medio alcohólico o, de forma más general, mediante cromatografía a través de una columna de filtración por gel (*Brinkley, 1992; Mujumdar et al., 1993; Talavera et al., 1997*).

Para determinar la estrategia más conveniente de etiquetar polinucleótidos con fluoróforos de interés, se han explorado los distintos esquemas de modificación entre los variados métodos utilizados hasta ahora descritos anteriormente. En la revisión efectuada, nuestro criterio de elección ha sido que el esquema de modificación cumpla con determinados requisitos, tales como que el esquema de modificación sea simple y sencillo, que permita el etiquetado con diferentes fluoróforos, que se utilicen reactivos e instrumentación económicamente asequibles, y que el fluoróforo pueda resultar afectado directamente por el ácido nucleico diana cuando se produzca la hibridación.

De todas las metodologías revisadas se ha escogido el ataque nucleofílico en el doble enlace 5-6 de la base citosina como una modificación que cumple adecuadamente con las anteriores condiciones. *Shapiro y Weisgras (1970)* describieron que el anión bisulfito (HSO_3^-) es capaz de unirse reversiblemente al doble enlace 5-6 del uracilo y de la citosina. Lo más importante de la citada reacción es que en disoluciones acuosas el aducto de citosina-bisulfito puede sufrir una desaminación y convertirse en uracilo mediante ajuste del pH a 10. Además mostraron que ciertas aminas pueden competir con el agua como un nucleófilo para el aducto de citosina-bisulfito y que el grupo amino de la posición N^4 puede substituirse por otras pequeñas aminas orgánicas. *Hayatsu (1976)* describió que la semicarbazida podía transaminar eficazmente residuos de citosina en cadenas

individuales de ADN y que la reacción era específica sólo para residuos de citosina no apareados. Esta modificación introduce un grupo amino libre, dónde se puede alcanzar la posterior adición de otros grupos de interés mediante el uso de reactivos específicos del grupo amino. *Draper y Gold (1978)* y *Draper (1984)* estudiaron la transaminación catalizada por bisulfito de los restos de citosina con varias aminas, notando que las alquildiaminas reaccionan casi completamente bajo condiciones apropiadas. Otros autores han usado la técnica de transaminación para unir diversos grupos a polinucleótidos (*Kelly et al., 1970; Grunstein y Hogness, 1975; Southern, 1975*).

En esta Memoria se ha usado un procedimiento similar al descrito por *Shapiro y Weigras (1970)* para la modificación de los residuos de citosina mediante una transaminación con etilendiamina (figura I.31a). Posteriormente se ha realizado el etiquetado con el fluoróforo sintetizado, TGIII, mediante el uso de reacciones específicas para grupos amino primarios (figura I.31b). Con este fin, se ha llevado a cabo la síntesis de éster de succinimido de TGIII.

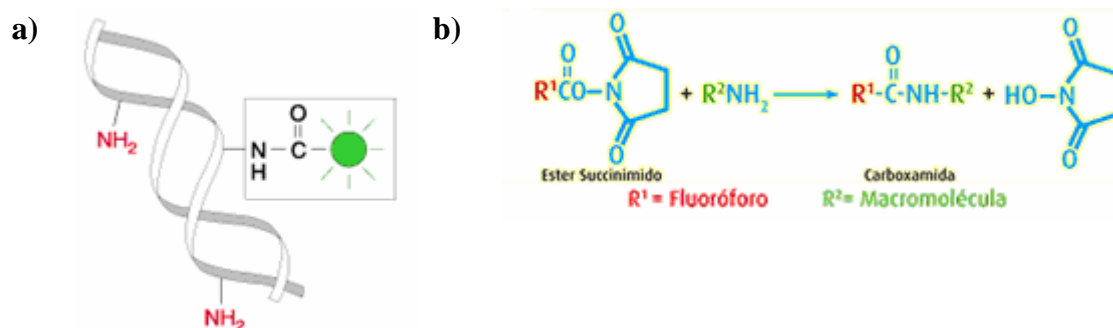


Figura I.31. a) Esquema general para el etiquetado de oligonucleótidos tras transaminación. b) Reacción de etiquetado entre el éster succinimido de un fluoróforo con las aminas primarias de las macromoléculas.

I.6.4. CARACTERÍSTICAS DE HIBRIDACIÓN DEL SISTEMA MODELO UTILIZADO

En nuestros estudios hemos utilizado un sistema modelo mediante el uso de ácido polirribocitidílico, poli(C), que actúa como sonda al ser etiquetado con el ester succinimido del TGIII y ácido polirriboinosínico, poli(I), que es la diana. Este sencillo sistema nos ha servido para desarrollar y verificar técnicas de detección de la hibridación de ácidos nucleicos con relativa rapidez y economía, ya que estos polinucleótidos son fáciles de manejar y se adquieren con facilidad a precios muy asequibles. Además, por tratarse de homopolímeros complementarios, poli(C) y poli(I) hibridan rápidamente en disolución y tienen una baja temperatura de fusión, $T_m=65^\circ\text{C}$, lo que facilita estudios rápidos y detallados, necesarios en este tipo de investigaciones.

Se ha escogido poli(I) como cadena complementaria de poli(C) para nuestros estudios debido a que el híbrido poli(C)/poli(I) pierde sus características de hibridación alrededor de los 65°C , mostrando típicos efectos de hipercromicidad a 260 nm, mientras que una doble hélice de poli(C)/poli(G) (ácido pilirriboguanílico) tiene menos estabilidad térmica. Además, a pH neutro, poli(G) tiende a agregarse y formar estructuras tridimensionales, como estructuras en G-cuadruplex, lo cual supone problemas adicionales para nuestros estudios (*Read y Neidle, 2000; Stefl et al., 2003*). La estructura química de poli(I) es la misma que la de poli(G), excepto el grupo N^2 -amino. El típico par de bases formado entre citosina e inosina se muestra en la figura I.32.

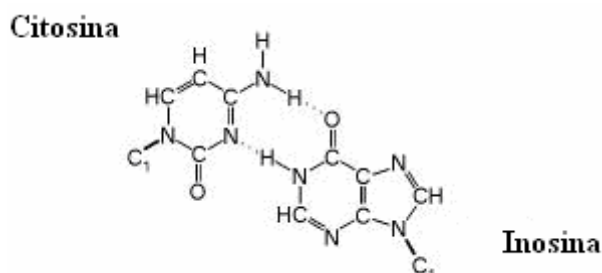


Figura I.32. Formación del par citosina-inosina.

Por otra parte, se conoce que a pH neutro y a concentración salina milimolar, poli(C) forma un complejo 1:1 con poli(I) (*Chamberlin y Patterson, 1965*). Poli(C)/poli(I) forman una estructura bihelicoidal con apareamientos Watson-Crick entre residuos de citosina de una hebra y residuos hipoxantina de la otra (*Arnott et al., 1973*). Los datos de difracción de rayos-X muestran que el híbrido poli(C)/poli(I) es una hélice de 11 vueltas de tipo A-ARN que puede experimentar una transición inducida por fuerza iónica a una hélice de doce pliegues de tipo A'-ARN (*Arnott et al., 1973*). La principal diferencia entre estas dos hélices es la reducción en la inclinación de las bases. *Chamberlin y Paterson (1965)* estudiaron las series I-C (tanto ribopolímeros como desoxirribopolímeros) y encontraron que las estructuras de la doble hélice se forman entre ribopolímeros y desoxirribopolímeros con las siguientes estabilidades térmicas: (rI)-(rC) > (rI)-(dC) > (dI)-(dC) > (dI)-(rC).

Tanto poli(C) como poli(I) existen como cadenas individuales, presentando estructuras ordenadas en disoluciones a pH neutro y a concentraciones moderadas de sal (de 100 a 300 mM), con las bases apiladas formando una hélice similar a aquella en la que una cadena individual tiene una estructura de doble cadena (*Felsenfeld y Miles, 1967*), aunque también se ha propuesto un modelo alternativo para poli(C) en disolución (*Broido y Kearns, 1982*). Una imagen razonable de las estructuras de estos homopolímeros en disolución podría ser aquella en la que las bases no están rígidamente enlazadas en la cadena polinucleótida, sino más bien conectadas por muelles que experimentan oscilaciones de torsión, de compresión y de extensión (*Bloomfield et al., 1974*). A pH menor de 6, poli(C) puede formar una doble hélice consigo mismo con cadenas paralelas que se enlazan juntas por grupos de uniones de tres enlaces de hidrógeno cada uno entre las bases de citosina (poli(C)-poli(C⁺)). Para que pueda ocurrir este tipo de interacciones, uno de los dos anillos citosina debe protonarse ($pK_a=4.5$) (*Hartman y Rich, 1965*). Además, tras titulación ácida, el híbrido poli(C)/poli(I) puede desprotonarse a poli(I)-poli(C)-poli(C⁺) y luego, conforme se disminuye el pH de la disolución, a poli(I)-poli(C⁺) (*Thiele y Guschlbauer, 1969a,b,c*), teniendo en cuenta que a fuerzas iónicas altas (>0.5M) se favorece la formación de estas estructuras complejas.

Material y Métodos

II.1. MATERIAL

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.1.1. INSTRUMENTACIÓN

II.1.1.1. Balanza

Se ha utilizado una balanza analítica electrónica Sartorius modelo A-120 S, provista de sistema de calibración interno y externo. Desviación estándar ± 0.1 mg y tiempo de respuesta de 3 s.

II.1.1.2. Centrífuga

Se ha usado una centrífuga analítica Nahita 2507/100 con capacidad de centrifugación simultánea para 12 tubos eppendorf de 1.5 ml o 2 ml, en un rotor de ángulo fijo de 45°. Alcanza una velocidad máxima de 13400 rpm y posee temporizador y mecanismo de cierre de seguridad.

II.1.1.3. pH-metro

Las medidas de pH se han realizado con un pH-metro Crison modelo GLP-22 dotado de un sistema de agitación magnética simultánea de la muestra. El pH-metro se puede emplear para determinar el pH en disoluciones cuya concentración esté comprendida entre 10^{-5} y 10^{-1} (g/L). Para la calibración se emplearon tres tampones estándares (Crison) de pH 4.00, 7.00 y 9.21.

II.1.1.4. Rotavapor

Se empleó un rotavapor Büchi Re111 conectado a vacío y provisto de un baño termostático Büchi 461.

II. Material y Métodos

II.1.1.5. Sonicador

Se ha utilizado un baño de ultrasonidos Ultrasons Selecta P modelo 513 con generador de 150 W que produce ondas sonoras de 40 kHz. Posee temporizador sincronizado con lámpara de señalización.

II.1.1.6. Espectrofotómetro de absorción

Los espectros de absorción se recogieron con un espectrofotómetro Lambda 650 Perkin Elmer UV-Visible. Se trata de un modelo de doble haz, con rendija variable de 5 a 0.01 nm y detección mediante fotomultiplicador (R955). Permite medidas de absorbancia y tanto por ciento de transmitancia en el intervalo de longitudes de onda comprendido entre 190 a 1200 nm. El espectrofotómetro se controla mediante un ordenador provisto del programa informático que acompaña al instrumento. Se completa con un equipo peltier de termostatación para los compartimentos de referencia y de muestra.

II.1.1.7. 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 programa informático *Spectra Manager*. El instrumento realiza tanto medidas de fluorescencia, como fosforescencia, quimioluminiscencia y bioluminiscencia. 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 sensibilidad de las medidas es de ± 0.1 nm y la reproductibilidad de ± 0.3 nm. El paso de banda de las rendijas se puede seleccionar entre 1, 3, 5, 10 y 20 nm para la de excitación y emisión. La velocidad de barrido puede variar 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 $>200:1$ 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 x 10 mm. Para la corrección de los espectros de excitación, un divisor del haz hace pasar una parte de la intensidad incidente por un fotodiodo de referencia, mientras que los espectros de emisión se pueden corregir mediante el programa informático.

II.1.1.8. 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 técnica de conteo de fotones individuales correlacionados en el tiempo (time correlated single photon counting; TCSPC) y provisto de un sistema de excitación láser. A continuación, se describirá, por una parte, la fuente de excitación láser, y por otra, el sistema completo de TCSPC.

II.1.1.8.1. Fuente de excitación láser

II.1.1.8.1.1. Láser Modelo LDH (PicoQuant GmbH)

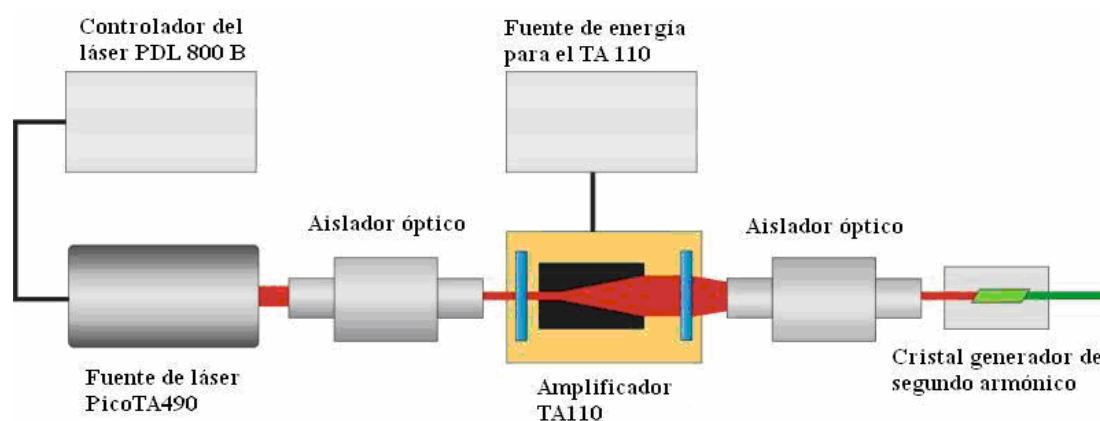
La fuente de excitación consiste en un láser pulsado de diodos de picosegundos de alta potencia. La fuente láser proporciona un tren de pulsos de hasta 40 MHz cuya anchura tiene una amplitud mínima de 70 ps. Las longitudes de onda de emisión de los láseres usados fueron 440 y 470 nm.

II.1.1.8.1.2. Láser Modelo PicoTA 490 (PicoQuant GmbH)

Esta fuente de excitación consiste en un láser pulsado de diodos de picosegundos de alta potencia (Esquema II.1). 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. Asociado al sistema antes descrito, y por motivos de la alta demanda de estabilidad, se encuentra el controlador de la

II. Material y Métodos

temperatura DTC 110 que mantiene en todo momento una temperatura de 24.2 °C en la fuente de láser.



Esquema II.1. Sistema PicoTA: un láser PicoTA490 de pulso de diodo de picosegundo usado como fuente de luz con un amplificador TA110. Adicionalmente, se ha añadido un cristal generador de segundo armónico para doblar la frecuencia de emisión. λ^{em} láser = 488 nm.

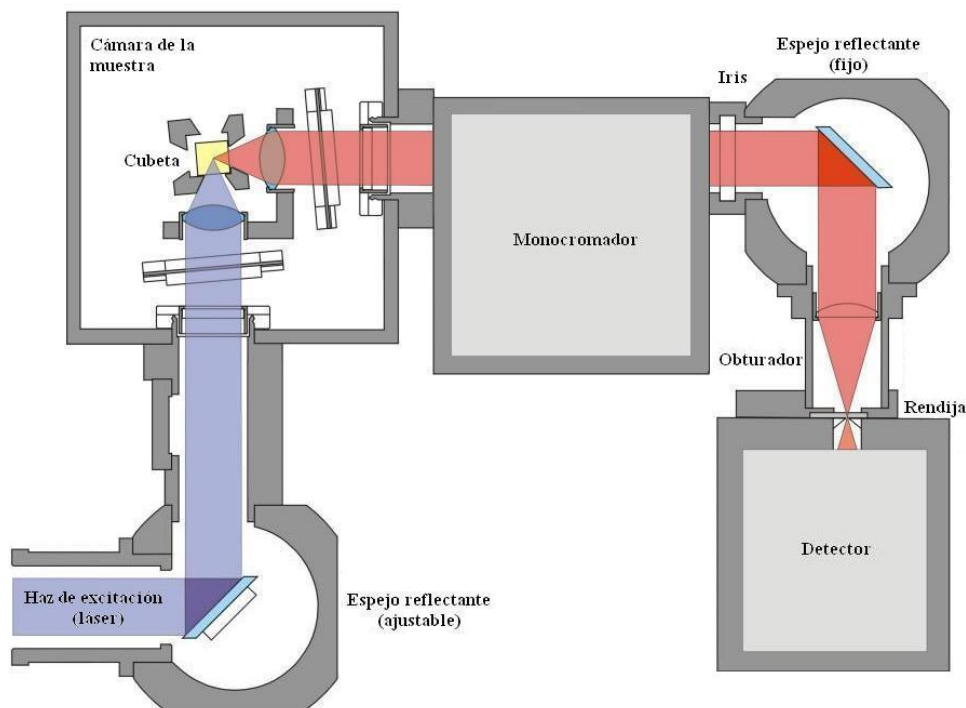
II.1.1.8.1.3. Controlador de la fuente de excitación

La fuente de excitación va acompañada de un sistema controlador PDL 800 B (PicoQuant GmbH), que cuenta con un oscilador de cristal que genera fluctuaciones más bajas que la frecuencia madre, y por lo tanto permite dividir la frecuencia de repetición de pulso del láser entre factores binarios (1, 2, 4, 8 ó 16), generando un rango de frecuencias de: 40, 20, 10, 5 y 2.5 MHz.

II.1.1.8.2. 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 al detector de fotones individuales a lo largo de muchos ciclos de excitación/emisión. En el histograma se registra el tiempo que hay entre la generación del pulso láser de excitación y la llegada al detector 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 una tarjeta de adquisición de datos de TCSPC TimeHarp 200 (PicoQuant GmbH).



Esquema II.2. Disposición del fluorímetro de resolución temporal Fluotime 200, PicoQuant Inc.

Como se muestra en el esquema II.2, 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 se enfoca 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, al objeto de eliminar los efectos de la difusión rotacional de los fluoróforos en los decaimientos de fluorescencia. Posteriormente, la luz emitida se enfoca hacia un monocromador modelo Science Tech 9030, cuyas especificaciones técnicas son: $f/3.5$, red de difracción holográfica cóncava de 1200 líneas/mm, 8 nm/mm de dispersión angular e intervalo espectral de 350 a 800 nm. Tras pasar por dos rendijas de anchura

II. Material y Métodos

controlable, la detección de los fotones emitidos se realiza en un fotomultiplicador de plato de microcanales, cuya señal sirve como pulso START. El pulso STOP procede del oscilador PDL 800 B. Ambos pulsos están conectados a un ordenador equipado con la tarjeta TimeHarp 200 y con el programa informático 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.1.1.9. 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.1.2. REACTIVOS

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

- Acetona. Panreac.
- Ácido cítrico. Panreac.
- Ácido clorhídrico. Panreac.
- Ácido etilendiaminotetracético (EDTA). Sigma.
- Ácido-2-[4-(2-hidroxietil)-piperazinil-(1)]-etansulfónico (HEPES). Merck.
- Ácido perclórico. Panreac.
- Ácido polirribocitidílico, poli(C). Sigma.
- Ácido polirribinosínico, poli(I). Sigma.
- Ácido trifluoroacético (TFA). Sigma.
- Agua bidestilada y desionizada en un equipo Mili-Q, de MilliPore (resistividad: 18 M Ω ·cm).
- Bisulfito sódico. Sigma.
- Cloruro de isopropil magnesio (i-PrMgCl). Sigma-Aldrich.
- Cloruro de 2-metoxietoximetil (MEM-Cl). Sigma-Aldrich.
- Cloruro sódico. Panreac.
- Diciclohexilcarbodimida (DCC). Aldrich.
- Diclorometano. Fluka.
- Dihidrógeno fosfato monosódico monohidratado. Panreac.
- Dimetilsulfóxido (DMSO). Fluka.
- Etanol. Panreac.
- Etilacetato. Sigma-Aldrich.
- Etilendiamina. Sigma.
- Hidrógeno fosfato disódico heptahidratado. Panreac.
- Hidroquinona. Sigma.
- Hidróxido de litio. Aldrich.
- Hidróxido sódico. Aldrich.

II. Material y Métodos

- Hidruro de sodio. Sigma-Aldrich.
- Metanol. Panreac.
- Metil-4-yodo-metilbenzoato. Sigma-Aldrich.
- N-Hidroxi-Succinimida. Aldrich.
- Sephadex G-25. Sigma.
- Silicagel. Acrós.
- Tetrahidrofurano (THF) seco. Merck.
- Tris-(hidroximetil)-aminometano (Tris). Sigma.

Los reactivos fueron utilizados sin purificación adicional, tras comprobar la ausencia de emisión fluorescente debida a impurezas. Los productos químicos fueron de pureza grado analítico o bioquímico.

En los procesos de purificación del poli(C) mediante diálisis se usaron membranas de 1.8/32 pulgadas. El cierre hermético de dichas membranas se consiguió mediante unas pinzas suministradas por Medicell Internacional LTD.

El TGIII fue purificado mediante una columna cromatográfica de silicagel (0.035-0.070 mm, 60 Å).

II.2. MÉTODOS

II.2.1. ACTIVACIÓN Y ETIQUETADO DE POLI(C)

Para el etiquetado del poli(C) primero se reemplaza el grupo amino en la posición N⁴ de la citosina por una pequeña molécula orgánica que tiene un grupo amino primario, mediante la técnica de *Shapiro y Weigras, (1970)* modificada por *Talavera et al., (1997, 2000)*. Esta reacción introduce un grupo amino libre con un brazo espaciador al cual se le pueden unir fluoróforos con grupos reactivos específicos de aminas, los cuales actuarían como sondas fluorescentes (*Talavera et al., 1997, 2000; Yguerabide et al., 1996*).

II.2.1.1. Activación de poli(C)

La reacción de transaminación se llevó a cabo en un vaso de precipitado con hielo, dentro del cual se introdujo un tubo de ensayo de vidrio con 1 mL de agua bidestilada y 1 mL de HCl 12 N, seguido de la adición gota a gota de 1 mL de etilendiamina 3 M.

A continuación se añadió al tubo de ensayo 0.475 g de bisulfito sódico, que actúa como catalizador de la reacción (*Shapiro y Weigras, 1970*), y seguidamente se adicionó 500 mL de agua destilada para favorecer la solubilización del mismo. Debido a la baja solubilidad del bisulfito sódico, la reacción se realizó con agitación continua. Finalmente, se ajustó el pH de la mezcla de reacción a un valor de 6 adicionando gota a gota HCl 12 N, con el fin de evitar la liberación de SO₃. Durante el transcurso de este proceso pueden producirse emanaciones tóxicas, por lo que se realizó en el interior de una campana de gases, con la protección adecuada (guantes y gafas de laboratorio).

Simultáneamente, se preparó la disolución de poli(C) que se iba a activar. Se pesaron 2 mg de poli(C) y se disolvieron en el mínimo volumen posible de una disolución de 10 mM tampón Tris/HCl 1 mM EDTA a pH 7.5. Al volumen total de la disolución de poli(C) preparada se le añadió 9 volúmenes de la mezcla anterior de

II. Material y Métodos

etilendiamina. A todo ello se le adicionó 100 μL de una disolución de hidroquinona en etanol del 96%, para la eliminación de radicales libres.

La nueva mezcla se incubó 30 minutos a 42 °C en un baño termostatzado. El tiempo y la temperatura elegidos son los optimizados para una modificación de las citosinas no superior al 5% (*Talavera et al., 2000*).

Tras ese tiempo, se realizó la diálisis del producto de reacción, lo que permite la eliminación del exceso de reactivos y subproductos de bajo peso molecular. Para ello, se prepararon varios litros de tampón fosfato 20 mM a pH 8.5. Se llenó un vaso de precipitado con 2 litros del tampón fosfato y se introdujeron las membranas de diálisis llenas del producto de reacción que se desea dializar. Debido a que algunos de los reactivos en exceso son de carácter ácido, y a que se debe evitar que el pH de la disolución de tampón baje de un valor de 7.7, se controló el pH durante toda la diálisis con un pH-metro y se fue cambiando la disolución de tampón fosfato para mantener el valor del pH por encima de este valor. La diálisis se da por finalizada cuando el pH del tampón de diálisis se mantiene constante durante varias horas.

II.2.1.2. Etiquetado de poli(C)

El poli(C) activado se extrajo de las membranas de diálisis, se precipitó con cloruro sódico y etanol, y seguidamente se etiquetó con el éster de succinimido del TGIII (NHS-TGIII) siguiendo el método de *Reines y Schulman (1979)*: 2 mg de poli(C) modificado se suspendieron en 400 μL de tampón 10 mM Tris/HCl 1 mM EDTA a pH 7.35. A esta disolución se le añadió 100 μL de tampón HEPES 1M a pH 10.0 con objeto de mantener el pH a un valor por encima de 8, ya que la hidrólisis del éster puede bajar el pH significativamente. A esta mezcla se le adicionó, gota a gota, 500 μL de una disolución del NHS-TGIII recién sintetizado, en DMSO. La mezcla de reacción se incubó a 37 °C durante 2h. El poli(C) etiquetado se purificó mediante repetidas precipitaciones con etanol y cloruro sódico, hasta que no hubo señal fluorescente detectable de colorante libre en el sobrenadante. El último paso en la purificación del material etiquetado se realizó mediante cromatografía de filtración por gel en microcolumnas de Sephadex G-25.

II.2.2. PREPARACIÓN DE LAS DISOLUCIONES

Para la preparación de las disoluciones de tampón fosfato ($pK_a^B = 7.20$ 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 0.01 M de NaOH y HClO_4 . Todas las disoluciones se prepararon con agua bidestilada (Milli-Q) como disolvente.

Las muestras preparadas en tampón fosfato, tanto para medidas de absorción como de fluorescencia, se prepararon a partir de disoluciones madres de NaH_2PO_4 y Na_2HPO_4 0.4 M y 0.8 M , añadiendo luego la cantidad necesaria de cada una de ellas en la proporción adecuada para alcanzar la concentración de tampón deseada, y el valor de pH requerido de acuerdo a la ecuación de Henderson-Hasselbalch (ecuación II.1). En los casos en los que fue necesario ajustar el pH a un valor concreto se realizó añadiendo pequeñas cantidades de NaOH o HClO_4 diluidos, antes de enrasar las muestras hasta su volumen final.

$$pH = pK + \log\left(\frac{A^-}{HA}\right) \quad (\text{II.1})$$

Para las disoluciones acuosas de TGIII se preparó una disolución madre de concentración 10^{-4} M en $1.27 \times 10^{-3} \text{ M}$ de NaOH en agua Milli-Q. A partir de esta disolución madre, se prepararon las concentraciones requeridas de TGIII en las concentraciones adecuadas de NaH_2PO_4 y Na_2HPO_4 , mezclando los volúmenes de estas dos disoluciones en distinta proporción hasta obtener los valores de pH requeridos en los distintos experimentos. Las disoluciones de TGIII para medidas de fluorescencia se prepararon teniendo en cuenta que la absorbancia de las disoluciones finales fuera menor de 0.1 .

El estudio de la influencia de la fuerza iónica del TGIII sobre el pK_a se realizó preparando disoluciones con fuerzas iónicas comprendidas entre 0.01 y 1.6 M . Para el cálculo del pK_a^* a través de la metodología de fluorescencia en estado estacionario se prepararon disoluciones de TGIII en tampón fosfato de

II. Material y Métodos

concentraciones 0.4 M y 0.8 M a nueve valores diferentes de pH. Para las medidas de fluorescencia con resolución temporal se utilizaron las disoluciones anteriores junto a otras once disoluciones de TGIII en tampón fosfato en un rango de concentraciones de 0.005 a 0.8 M a un mismo valor de pH (6).

Tanto las disoluciones madre como las de trabajo se prepararon en condiciones de oscuridad. Asimismo, fueron almacenadas en oscuridad a 5 °C para evitar cualquier posible deterioro ocasionado por la luz o el calor.

II.2.3. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

Todas las medidas, tanto de espectroscopia de absorción como de fluorescencia, se han realizado a temperatura ambiente. Previamente a la adquisición de los espectros o decaimientos, las cubetas, limpiadas 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.2.3.1. Medidas de absorción

Las medidas de absorción se realizaron en el espectrofotómetro UV/Vis Perkin Elmer Lambda 650 descrito en el apartado II.1.1.6. 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. Como referencia se utilizaron disoluciones con los mismos componentes que la disolución de trabajo y en iguales concentraciones, excepto en el fluoróforo estudiado.

II.2.3.2. Medidas de fluorescencia en estado estacionario

Las medidas de fluorescencia en estado estacionario se registraron en el fluorímetro Jasco FP-6500 descrito en el apartado II.1.1.7, utilizando cubetas de cuarzo (Hellma) de dimensiones internas de 10 × 10 mm, que proporcionan un paso óptico de 1 cm. En las medidas de fluorescencia para la detección de la hibridación de poli(C) con poli(I) se empleó una cubeta de cuarzo con bulbo inferior (Hellma) que permitía la agitación magnética durante la medida, y así favorecer la hibridación. Además, en estos experimentos la temperatura se mantuvo fija a 20 °C. La velocidad de barrido se seleccionó de manera que se consiguiera una buena relación señal:ruido sin necesidad de 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.

II.2.3.3. Fluorescencia resuelta en el tiempo

Las medidas de tiempo resuelto se llevaron a cabo con el instrumento que se describe en el apartado II.1.1.8. Las cubetas utilizadas fueron de cuarzo, de la casa Hellma, de dimensiones 10 × 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 era 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 más fotones del valor del 0.5 % de la frecuencia utilizada (20 MHz).

Las longitudes de onda de excitación utilizadas en el estudio fotofísico del TGIII fueron 440 nm y 470 nm, con las que se excitan preferentemente las especies aniónica y dianiónica del TGIII, respectivamente. Los decaimientos se recogieron a las longitudes de onda de emisión de 515, 525, 540 y 550 nm.

Para obtener la función de respuesta del instrumento (IRF), o perfil de la lámpara, se obtuvo el histograma situando en el compartimento de muestra una dispersión coloidal de silica (LUDOX), recogiendo la luz dispersa con el monocromador situado a la longitud de onda de excitación. Durante la realización de las medidas se recogieron varios perfiles instrumentales, comprobando así la alta estabilidad del láser con el tiempo.

II.2.3.4. Espectroscopia de ¹H-RMN

Los espectros de RMN de protón fueron recogidos a temperatura ambiente en el instrumento de 300 MHz de campo magnético descrito anteriormente en el apartado II.1.1.9, empleando como disolventes dimetilsulfóxido deuterado, cloroformo deuterado, agua deuterada en sosa deuterada y metanol deuterado, según el caso. La referencia para la definición de escalas de desplazamientos químicos fue el tetrametilsilano.

II.2.4. TRATAMIENTO DE LOS DATOS Y MÉTODOS DE ANÁLISIS

Tanto el tratamiento y representación de datos, 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 de los decaimientos de fluorescencia se hicieron con el programa informático *FluoFit* (PicoQuant Inc.). Finalmente, los análisis compartimentales se calcularon con el programa informático de análisis global *TRFA* (Ameloot *et al.*, 1992). Este programa utiliza un análisis de reconvolución iterativa, basado en la integral de convolución:

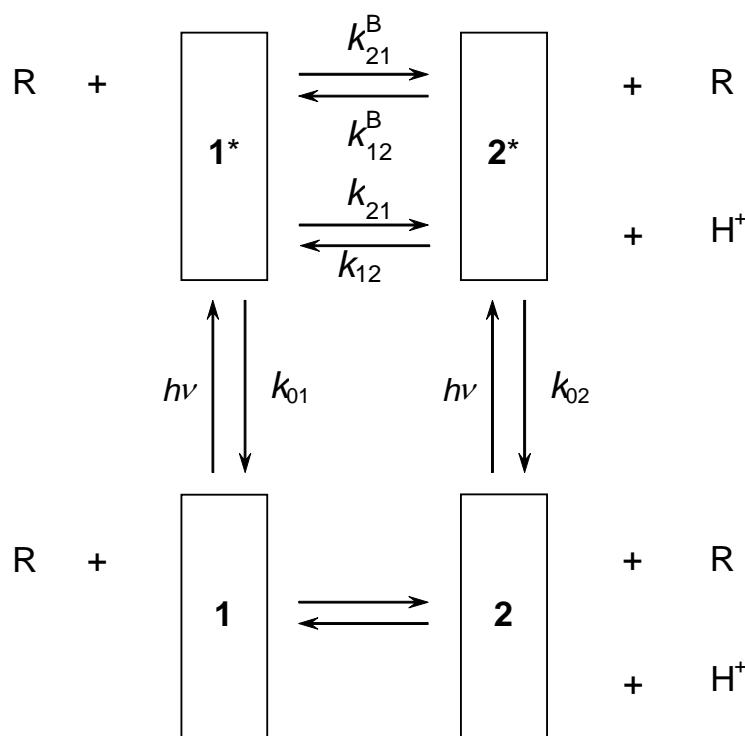
$$F(t) = \int_0^t I(t-t')D(t')dt' \quad (\text{II.2})$$

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 δ 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).

II.2.4.1. Modelo compartimental

El sistema estudiado en esta Memoria se ajusta a un modelo bicompartimental de la reacción de transferencia protónica en el estado excitado favorecida por las especies de un aceptor/dador protónico. A continuación se describen las generalidades y teoría de dicho modelo.

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 relativamente 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 esquema cinético general considerado es el que se muestra a continuación:



Esquema II.3. 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 dará lugar a 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 en el esquema II.3 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 δ 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:

$$\dot{x}(t) = A x(t) \quad t \geq 0 \quad (\text{II.3})$$

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

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

la derivada temporal del vector de las concentraciones en el estado excitado es $\dot{x}(t)$.

Por su parte, A es la matriz compartimental 2×2 :

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

La función impulso-respuesta del decaimiento, $f(t)$, depende de las longitudes de onda de excitación (λ^{ex}) y de emisión (λ^{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 $t \geq 0$):

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

en esta expresión $U = [U_1, U_2]$ es la matriz de los dos vectores propios U_i de la matriz compartimental A . γ_1 y γ_2 son los autovalores de A correspondientes a los autovectores U_1 y U_2 respectivamente, de forma que:

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

II. Material y Métodos

\tilde{b} es el vector 2×1 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, por lo que varía con el valor de pH. Esta dependencia con el pH vendrá dada por la constante de acidez del fluoróforo en estado fundamental K_a . Los elementos \tilde{b}_i se calculan a través de la ecuación II.8 donde ε_i son los coeficientes de absorción molar de las especies, mientras que α_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 1×2 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 λ^{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):

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

Finalmente, κ es una constante de proporcionalidad que viene dada por la expresión:

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

Como ya se ha mencionado, la variación de $f(t)$ con la longitud de onda de excitación proviene de \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 γ_i ($i=1, 2$) de la matriz compartimental A están relacionados con los tiempos de decaimiento τ_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 γ_i , y consecuentemente los tiempos de decaimiento τ_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 :

II. Material y Métodos

$$p_1 = \kappa(\tilde{c}_1\beta_{11} + \tilde{c}_2\beta_{21}) \quad p_2 = \kappa(\tilde{c}_1\beta_{12} + \tilde{c}_2\beta_{22}) \quad (\text{II.15})$$

siendo:

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

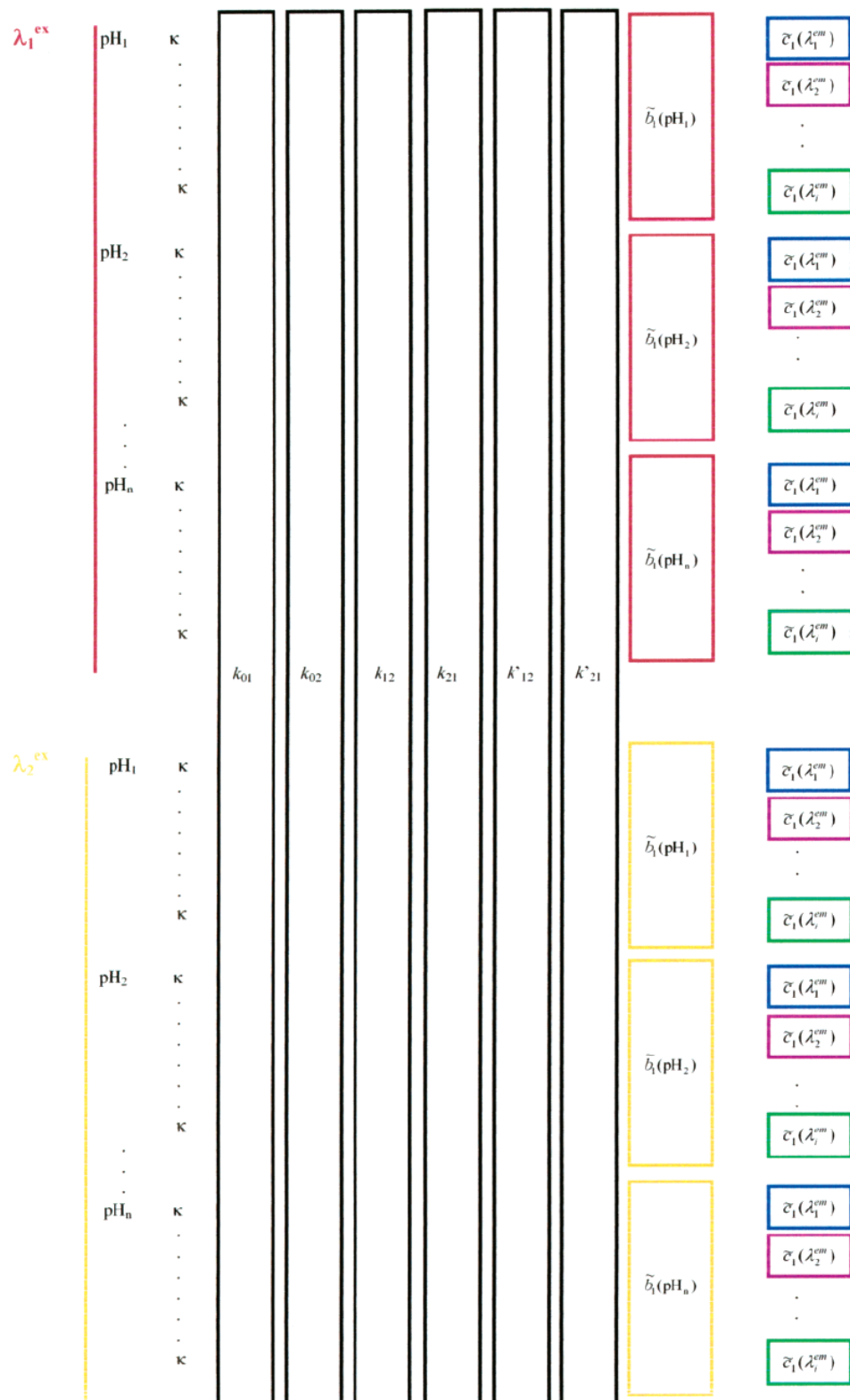
Para llevar a cabo un análisis global compartimental de una superficie de decaimientos de fluorescencia concreta, los parámetros independientes que debe poseer el decaimiento son: el valor de pH, la concentración total de aceptor/dador protónico C^{buff} y su constante de acidez K_a^{buff} , que rige el equilibrio $RH \rightleftharpoons R$. Como ya se citó anteriormente en el capítulo de 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} . Puesto que κ es 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}_i a cada valor de pH y longitud de onda de excitación, y el parámetro de emisión normalizado de la especie I^* , $\tilde{c}_i(\lambda^{em})$. Así, en el esquema II.4 se muestra la organización del ligado de los diferentes parámetros a lo largo de la superficie de decaimientos de fluorescencia completa.

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^{buff} del aceptor/dador protónico a través de la ley de acción de masas, resultando la ecuación II.18.

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



Esquema II.4. Esquema de ligado de parámetros ajustables en un análisis global compartimental de ESPT.

Resultados
y
Discusión

III.1. SÍNTESIS DE NUEVOS DERIVADOS DE TOKYO GREEN

Debido a que una de las aplicaciones del colorante propuesto en esta Memoria es su uso como sonda fluorescente intracelular, se buscó la presencia en su estructura de un grupo éster, ya que estos derivados muestran una mayor permeabilidad celular debido a la protección de los grupos hidrofílicos. Además, la hidrólisis de estos grupos ésteres origina grupos ácidos carboxílicos, que pueden ser fácilmente modificados para la obtención de grupos reactivos específicos de determinados grupos funcionales, como por ejemplo la obtención de grupos reactivos de aminas primarias como ésteres de succinimido.

La síntesis del derivado ácido carboxílico del colorante propuesto y su modificación para la obtención del derivado éster succinimido se describen en los siguientes epígrafes.

III.1.1 SÍNTESIS DE TGIII (ÁCIDO 4-(6-HIDROXI-3-OXO-3H-XANTEN-9-IL)-3-METIL-BENZOICO)

Siguiendo el esquema III.1, la síntesis del compuesto de interés (**4**) se llevó a cabo en tres pasos que se detallan a continuación:

1º) Síntesis del 3,6-bis-(2-metoxi-etoximetoxi)-xanten-9-ona (**2**)

Una disolución de 3,6-dihidroxi-xanten-9-ona (**1**) (4.0 g, 17.2 mmol) (disponible comercialmente) en tetrahidrofurano seco (300 mL) se refrigeró a 4 °C en un baño de hielo y se trató con hidruro de sodio (4.1g, 87.6 mmol). La mezcla se agitó durante 30 min y se adicionó cloruro de 2-metoxietoximetil (10 mL, 87.6 mmol). La disolución se mantuvo a 22 °C durante 16 h. A continuación, se añadió una disolución acuosa de ácido cítrico (200 mL, 1M) seguido de un proceso de extracción con etilacetato (3×200 mL). La capa orgánica se eliminó mediante evaporación a vacío. Tras la purificación por cromatografía en columna de silicagel (0.035-0.070 mm, 60 Å) se obtuvo un sólido

III. Resultados y Discusión

marrón claro (4g, 63%), que se corresponde con el compuesto 3,6-bis-(2-metoxi-etoximetoxi)-xanten-9-ona.

Datos de RMN ^1H : (300 MHz, CDCl_3): δ : 8.03 (d, $J=8.8$ Hz, 2H), 6.93 (d, $J=7.8$ Hz, 2H), 6.87 (dd, $J=8.4, 5.7$ Hz, 2H), 5.24 (s, 4H), 3.71 (m, 4H), 3.45 (m, 4H), 3.23 (s, 6H). (Ver Figura III.1).

2º Síntesis del 4-(6-hidroxi-3-oxo-3H-xanten-9-il)-3-metil-benzoico metil éster (3)

A un matraz tipo Schlenk se le adicionó metil-4-yodo-metilbenzoato (325 mg, 1.18 mmol) y THF seco (10 mL) en atmósfera de argón. Esta disolución se enfrió a -20 °C, se le adiciona cloruro de isopropil magnesio (0.590 mL, 1.18 mmol) y se agitó a -20 °C durante 2 h. Se añadió el compuesto **2** (175 mg, 0.39 mmol) y se mantuvo la reacción templada a 22 °C durante 16 h. La reacción se detuvo por adición de metanol (10 mL) y el disolvente se eliminó en el rotavapor. El residuo obtenido se disolvió en diclorometano (25 mL). Se añadió ácido trifluoroacético (1.0 mL) y la mezcla se agitó a 22 °C durante 2 h. El disolvente se eliminó en el rotavapor y el residuo se purificó por cromatografía en columna de silicagel (0.035-0.070 mm, 60 Å), obteniéndose el compuesto 4-(6-hidroxi-3-oxo-3H-xanten-9-il)-3-metil-benzoico metil éster (90 mg, 70%).

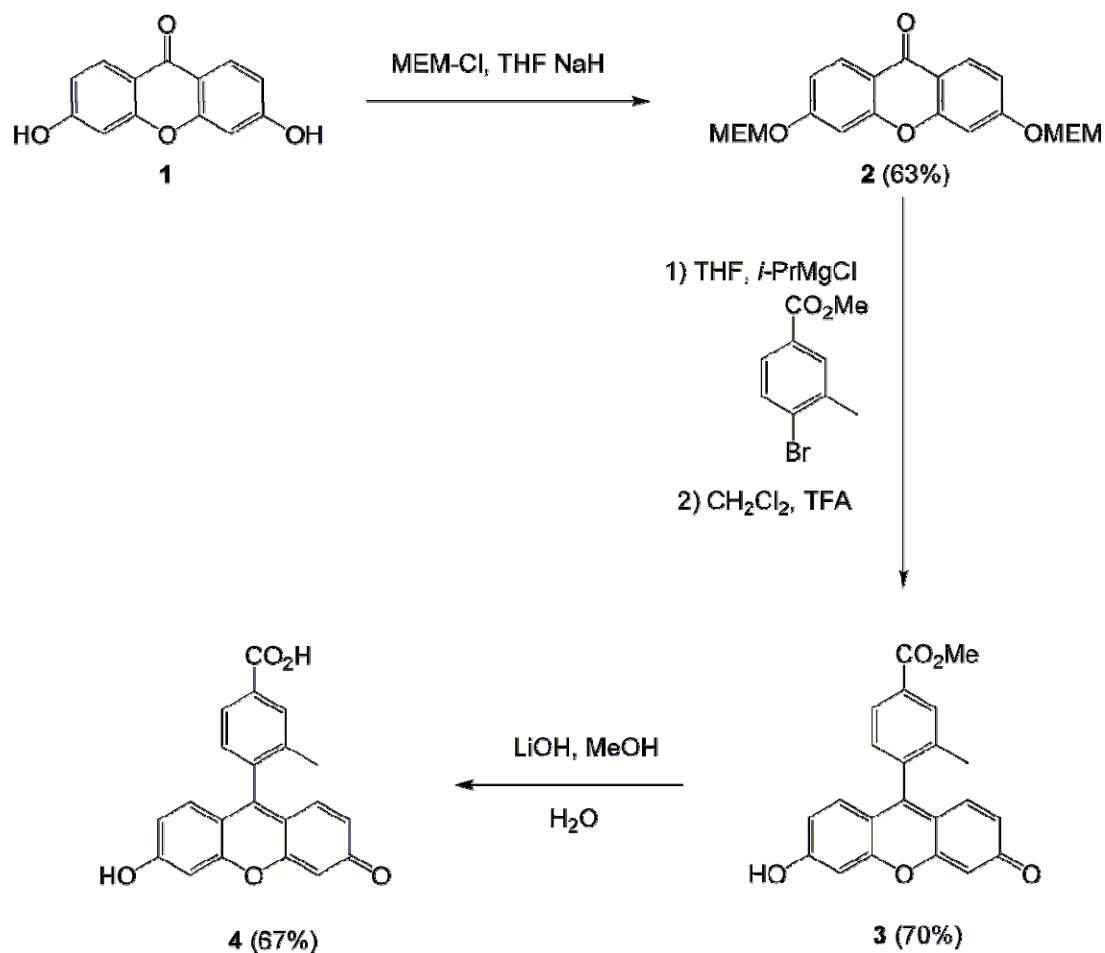
Datos de RMN ^1H : (300 MHz, DMSO-d_6): δ : 8.07 (s, 1H), 7.99 (dd, $J=7.8, 1.8$ Hz, 1H), 7.45 (d, $J=7.9$ Hz, 1H), 6.99 (d, $J=9.2$ Hz, 2H), 6.82 (d, $J=2.0$ Hz, 2H), 6.77 (dd, $J=9.1, 2.1$ Hz, 2H), 3.91 (s, 3H), 3.71 (m, 4H), 2.02 (s, 3H). (Ver Figura III.2).

3º Síntesis del ácido 4-(6-hidroxi-3-oxo-3H-xanten-9-il)-3-metil-benzoico (4)

Al compuesto (**3**) (75 mg, 0.2 mmol) en una mezcla de metanol:agua (3:2, 10 mL) se le adicionó hidróxido de litio en medio acuoso (2.0 mL, 1 M). La disolución se agitó durante 1 h cambiando de color rojo a naranja claro. El metanol se eliminó

mediante vacío y el resto de disolución acuosa se acidificó con HCl en medio acuoso (5.0 mL, 1 M). El precipitado que se obtuvo se filtró y se secó en rotavapor, obteniéndose el ácido 4-(6-hidroxi-3-oxo-3H-xanten-9-il)-3-metil-benzoico como un sólido rojo (50 mg, 67%).

Datos de RMN ^1H : (300 MHz, $\text{D}_2\text{O}/\text{NaOD}$): δ : 8.10 (s, 1H), 7.96 (d, $J=7.6$ Hz, 1H), 6.94 (d, $J=7.8$ Hz, 1H), 6.60 (d, $J=9.2$ Hz, 2H), 6.82 (d, $J=2.0$ Hz, 2H), 6.77 (dd, $J=9.1$, 2.1 Hz, 2H), 3.91 (s, 3H), 3.71 (m, 4H), 2.02 (s, 3H). (Ver Figura III.3).



Esquema III.1. Síntesis del ácido 4-(6-hidroxi-3-oxo-3H-xanten-9-il)-3-metil-benzoico.

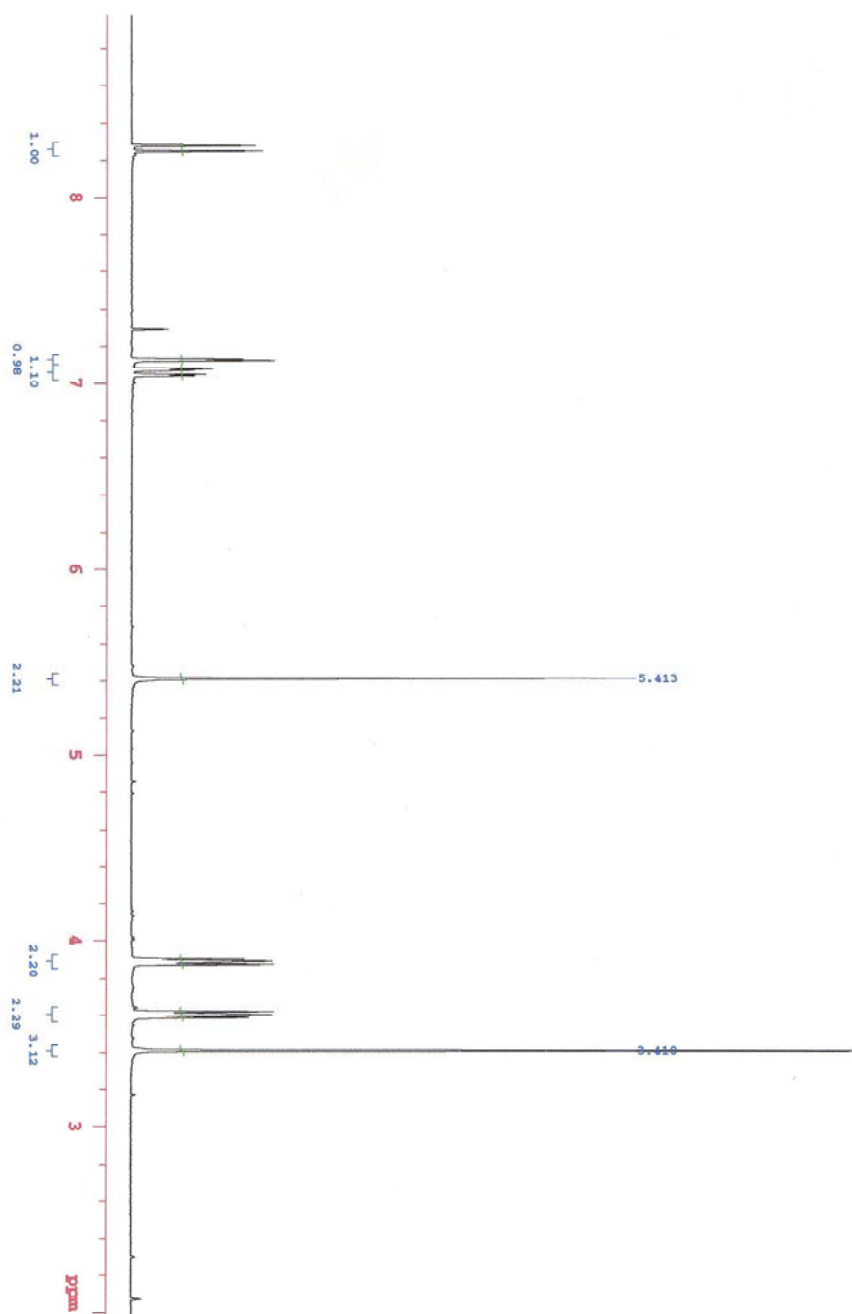


Figura III.1. Espectro de RMN del 3,6-bis-(2-metoxi-etoximetoxi)-xanten- 9-ona (2).

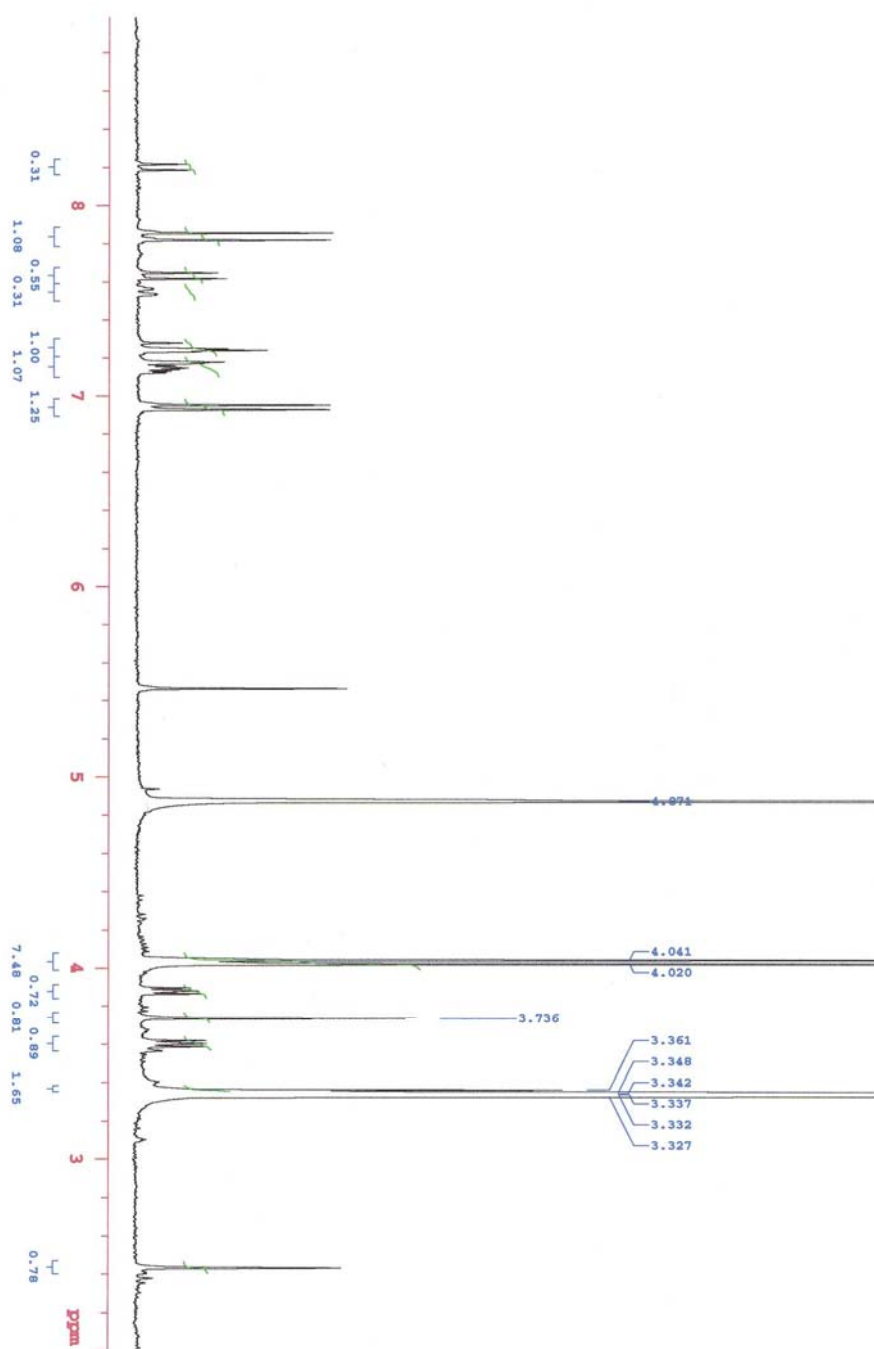


Figura III.2. Espectro de RMN del 4-(6-hidroxi-3-oxo-3H-xanten-9-il)-3-metil-benzoico metil éster (3).

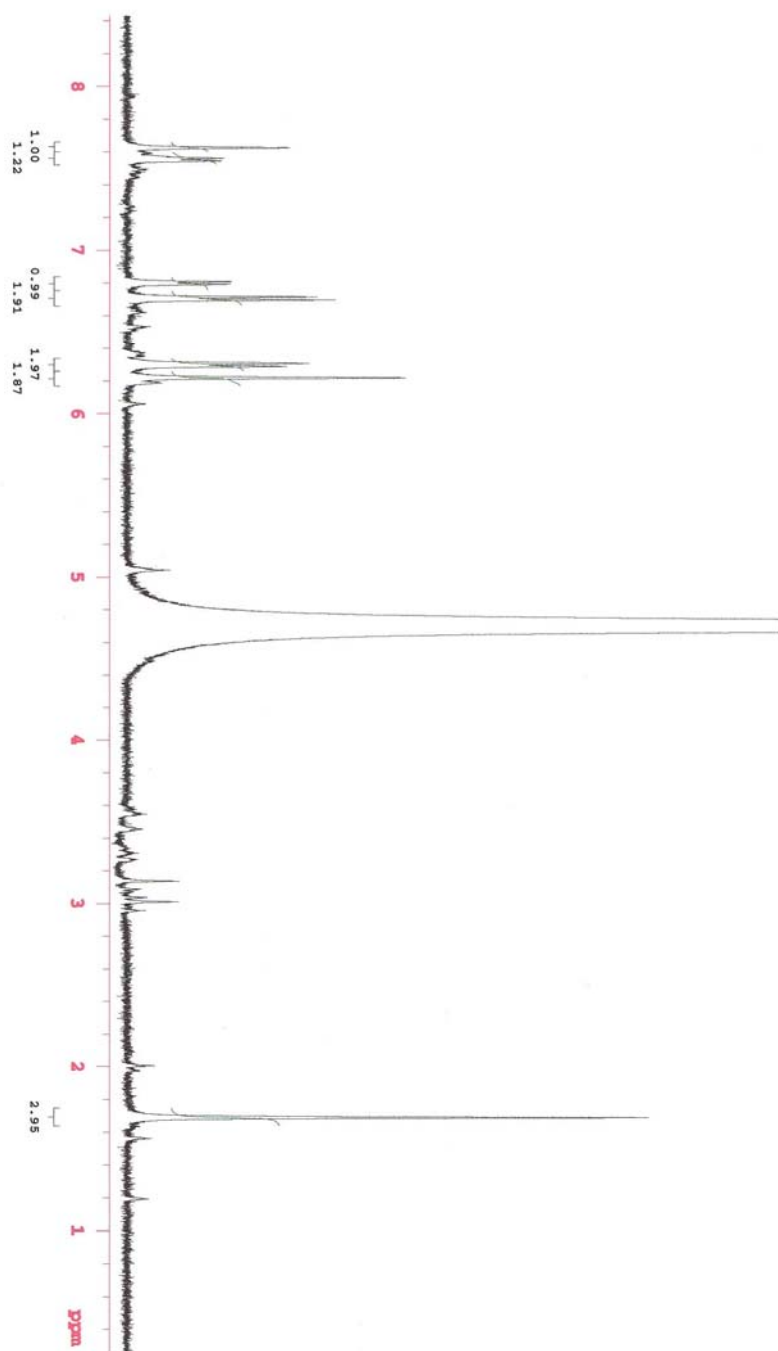


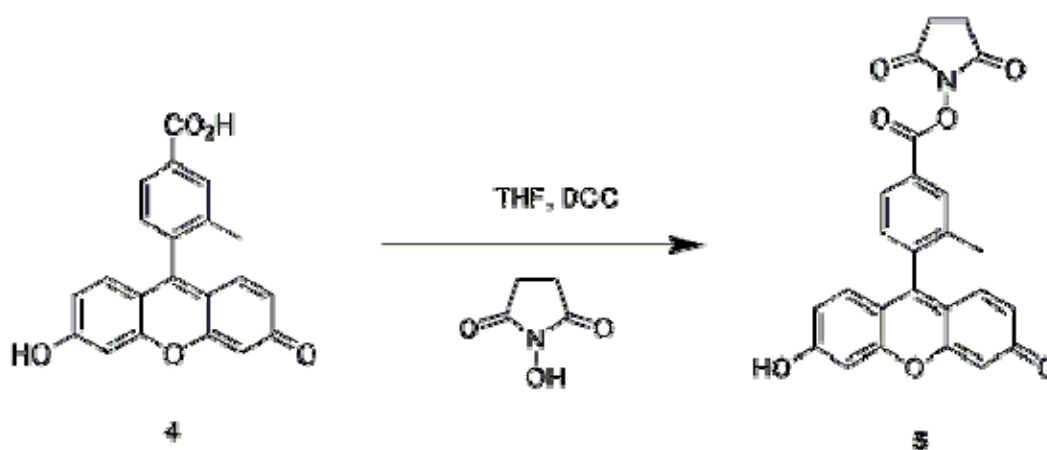
Figura III.3. Espectro de RMN del ácido 4-(6-hidroxi-3-oxo-3H-xanten-9-il)-3-metil-benzoico (4)

III.1.2. SÍNTESIS DEL ÉSTER DE SUCCINIMIDO DEL TGIII (2,5 DIOXOPIRROLIDIN-1-IL-4-(3-HIDROXI-6-OXO-6H-XANTEN-9-IL)-3-METILBENZOATO)

En un matraz de 10 mL se disolvió 1 equivalente de TGIII (**4**), 1.1 equivalente de dicitohexilcarbodimida y 2 equivalentes de N-hidroxisuccinimida en tetrahidrofurano. Se agitó durante 4 horas a 23 °C y posteriormente se eliminó la urea formada en la reacción mediante filtración. La disolución se concentró en rotavapor a vacío y finalmente se eluyó en una columna cromatográfica de silicagel (0.035-0.070 mm, 60 Å), con una fase móvil (metanol/diclorometano 1:9) obteniéndose el compuesto de interés, 2,5-dioxopirrolidin-1-il-4-(3-hidroxi-6-oxo-6H-xanten-9-il)-3-metilbenzoato (**5**), como un sólido naranja con un rendimiento del 45 % (Esquema III.2.).

Datos de RMN ¹H: (300 MHz, CD₃OD): δ: 8.09 (s, 1H), 8.04 (d, J=8.1 Hz, 1H), 7.31 (d, J=8.1 Hz, 1H), 7.09 (d, 2H), 6.76 (bs, 3H), 6.72 (bs, 1H), 2.74 (s, 4H), 2.13 (s, 3H).

Datos de RMN ¹³C: (75 MHz, CD₃OD): 173.1, 171.1, 158.1, 154.2, 136.0, 135.3, 131.4, 130.9, 128.9, 127.0, 122.0, 114.6, 103.4, 25.1, 18.5).



Esquema III.2. Síntesis del 2,5-dioxopirrolidin-1-il-4-(3-hidroxi-6-oxo-6H-xanten-9-il)-3-metilbenzoato.

III.2. ESTUDIO FOTOFÍSICO DE TOKYO GREEN III (TGIII)

III.2.1. ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN Y EQUILIBRIO EN EL ESTADO FUNDAMENTAL

Como paso previo al estudio de las propiedades fotofísicas del TGIII 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 absorción 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 los fluoróforos derivados del Tokyo Green (TG) es muy reciente existe muy poca información sobre los datos que la describen. Así en bibliografía (*Mineno et al, 2006*) sólo se ha publicado el rendimiento cuántico de la especie dianiónica del TGIII, por lo que es importante realizar un estudio detallado de las características ácido-base en disolución acuosa en el estado fundamental.

III.2.1.1 Descripción del equilibrio ácido-base

Previo al estudio de la reacción de transferencia protónica en el estado excitado (ESPT) facilitada por un aceptor/dador protónico entre el monoanión y dianión de TGIII, se realizó un análisis de esta reacción en el estado fundamental, al objeto de calcular, a ciertas longitudes de onda, los valores de los coeficientes de absorción molar tanto del monoanión como del dianión que se necesitarán en el posterior estudio fotofísico.

Como es conocido, los cambios en los valores de absorbancia que se presentan cuando se varía el pH son debidos a reacciones de intercambio protónico en el estado fundamental. Estos cambios resultan gobernados por los coeficientes de absorción molar de las especies en equilibrio a las longitudes de onda estudiadas, y por los valores

de pK_a que definen el mencionado equilibrio en el estado fundamental. A cada longitud de onda y pH determinados, la absorbancia viene dada por:

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

donde C_T es la concentración total del fluoróforo, α_i es la fracción molar de la forma prototrópica i , ε_i el coeficiente de absorción molar de la especie i , y d es el paso óptico.

Debido a la similitud de la estructura química del TGIII con la de la fluoresceína (figura III.4), podemos afirmar que en disolución acuosa este compuesto presenta cuatro formas prototrópicas distintas: catión (C), neutro (N), monión (M) y dianión (D), y por tanto, son tres los valores de pK_a implicados en estos equilibrios iónicos. En el esquema III.3 se muestran las estructuras químicas de las cuatro formas prototrópicas del TGIII.

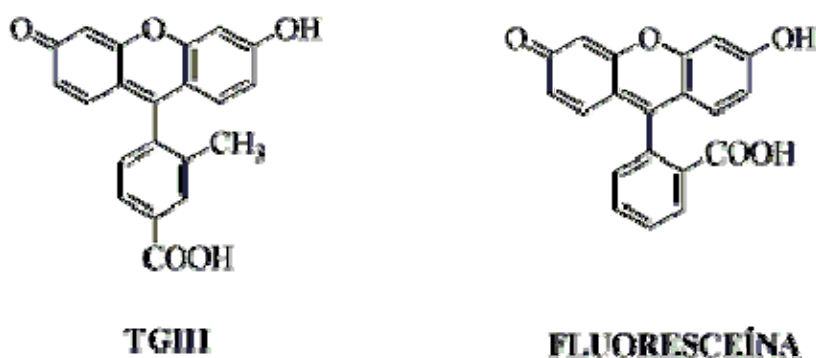
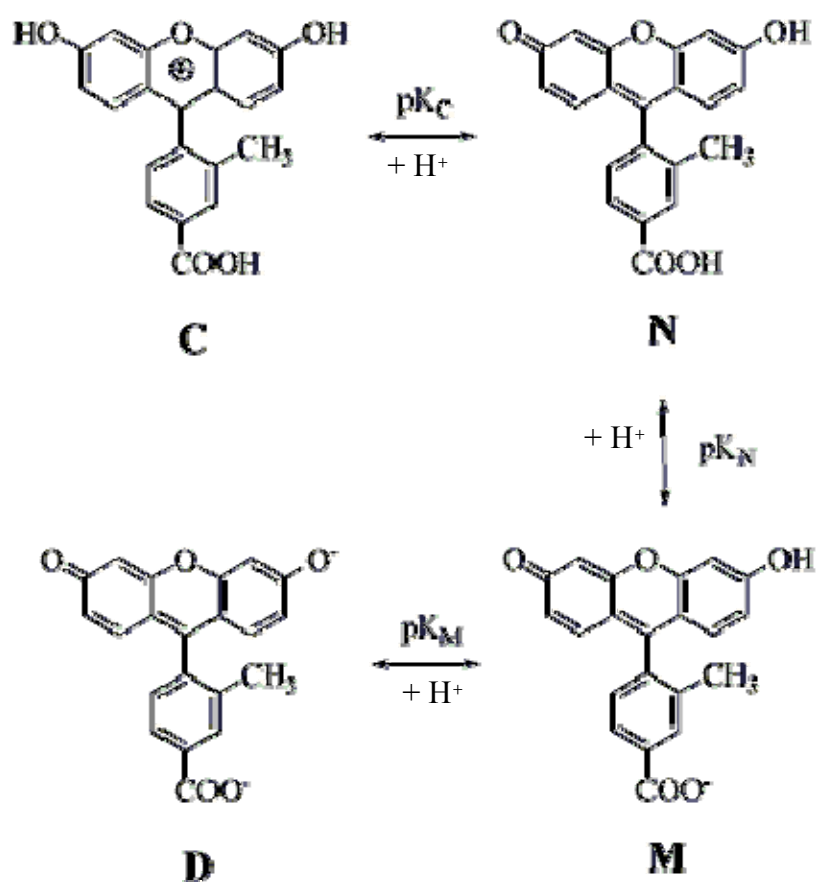


Figura III.4. Estructuras químicas del TGIII y de la fluoresceína.



Esquema III.3. Estructuras y equilibrios prototrópicos considerados para el TGIII.

De acuerdo con la ecuación III.1 y los equilibrios del esquema III.3, las fracciones molares de cada especie en función del valor del pH vienen dadas por las siguientes expresiones:

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

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

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

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

donde P viene dado por la siguiente ecuación:

$$P = [H^+]^3 + K_C [H^+]^2 + K_C K_N [H^+] + K_C K_N K_M \quad (\text{III.6})$$

Debido a que uno de los objetivos de esta Tesis Doctoral es el desarrollo de una etiqueta fluorescente para biomoléculas, se ha centrado el estudio fotofísico en los equilibrios presentes a pHs próximos al fisiológico, ya que son a estos valores de pH donde posteriormente se usará la mencionada etiqueta fluorescente. Por tanto, basándonos en estudios previos de nuestro grupo de investigación, tanto con fluoresceína como con otros derivados del Tokyo Green, a los pHs de interés sólo deben estar presentes las especies monoaniónica y dianiónica (Esquema III.3).

III.2.1.2. Determinación de ϵ_D , ϵ_M y pK_a

Basándonos en lo anteriormente expuesto, se ha procedido a determinar el valor de pK_a implicado en el equilibrio ácido-base entre la especie monoaniónica y la dianiónica del TGIII, así como los coeficientes de absorción molar de ambas especies a diversas longitudes de onda de interés.

Para el cálculo de los valores de los coeficientes de absorción molar de la especie monoaniónica y la dianiónica del colorante se han realizado espectros de absorción de disoluciones acuosas de TGIII, en un amplio intervalo de valores de pH. Para lograr estos valores de pH se prepararon las distintas disoluciones acuosas ajustando el valor de pH con disoluciones de NaOH y HClO₄, y también mezclando diferentes cantidades de las especies ácidas y básicas de diferentes tampones, con objeto de mantener un valor de pH estable a diferentes concentraciones de tampón (fosfato 10 mM, 0.4 M y 0.8 M y Tris 10 mM).

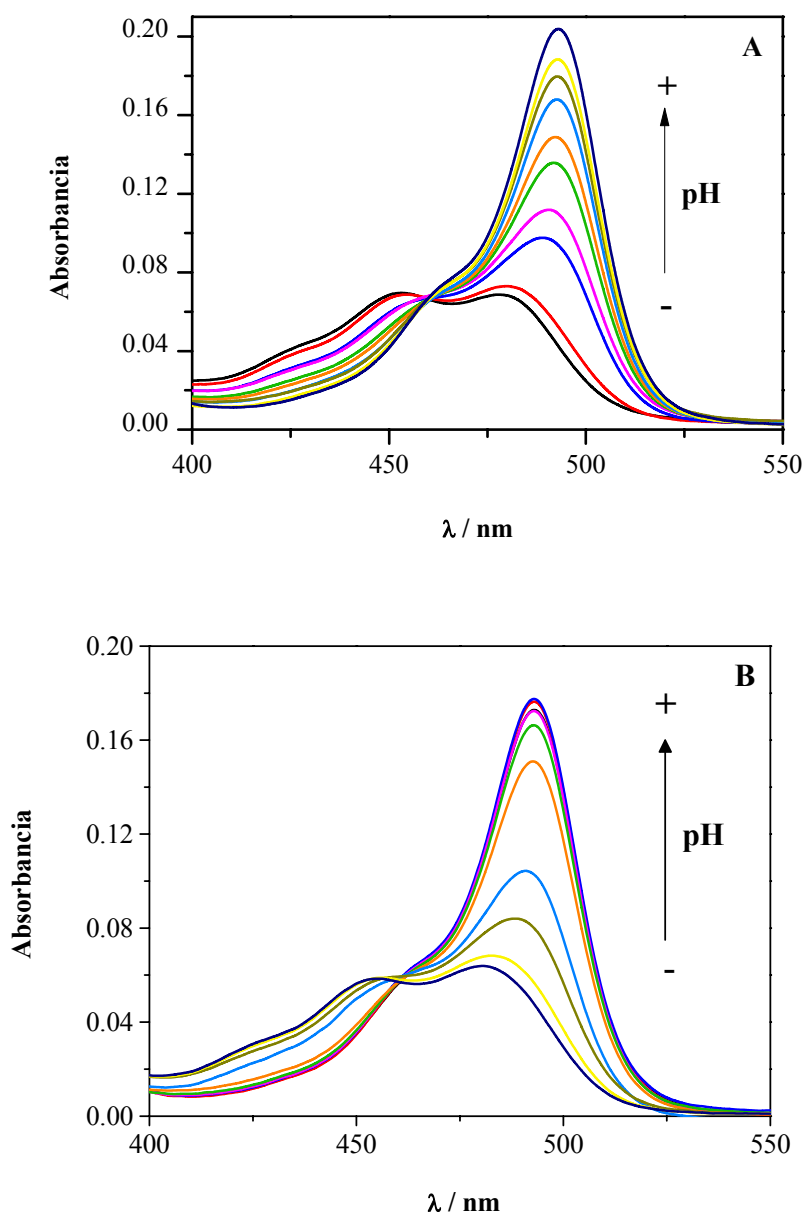


Figura III.5. (A) Espectros de absorción de disoluciones acuosas de 2.73×10^{-6} M de TGIII a pH 4.62, 5.09, 5.81, 6.25, 6.52, 7.05, 7.69, 8.06, 8.58 y 9.08. (B) Espectros de absorción de disoluciones de 2.66×10^{-6} M de TGIII en 10 mM de tampón fosfato a pH 5.40, 5.62, 6.02, 6.35, 7.09, 7.56, 7.91, 8.39, 8.79 y 8.89.

Los espectros de absorción mostrados en este capítulo se han obtenido siguiendo la metodología descrita en el capítulo de Material y Métodos. Como ejemplo, en la figura III.5 se muestran los espectros de absorción de disoluciones de TGIII en agua (A) y en disoluciones de 10 mM de tampón fosfato (B) a diferentes pHs. A valores de pH básico se observa un solo máximo de absorción a 494 nm, mientras que al disminuir el

valor del pH el máximo de absorción se desplaza a longitudes de onda más cortas (480 nm) y aparece otro máximo a 450 nm. En ambas figuras sólo se observa un punto isobéptico, lo que implica la existencia de un solo equilibrio en este intervalo de pH, entre la especie monoaniónica y dianiónica.

Se seleccionó el intervalo de pH entre 4.5 y 9 como el adecuado para la elección de la superficie *A versus* pH utilizada en los ajustes que permiten obtener los valores de los coeficientes de absorción molar de las especies involucradas en estos equilibrios y el valor del pK_a . Una vez analizados los espectros de la figura III.5, el procedimiento seguido para la realización del ajuste global no lineal por mínimos cuadrados está basado en el algoritmo de Levenberg-Marquardt. 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 aniónica y la forma dianiónica:

$$A = C_T(\alpha_M \varepsilon_M + \alpha_D \varepsilon_D)d \quad (III.7)$$

en donde α_i representa a las fracciones molares de cada especie, que fueron anteriormente definidas en las ecuaciones III.4 y III.5. Dividiendo por la concentración total y por el coeficiente de absorción molar de la especie dianiónica y haciendo $d = 1$ cm (paso de luz empleado en las medidas experimentales), se obtiene:

$$\frac{A}{C_T \varepsilon_D} = \frac{\varepsilon_M}{\varepsilon_D} \alpha_M + \alpha_D \quad (III.8)$$

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

$$\frac{A}{C_T \varepsilon_D} = \frac{R_M 10^{-pH} + 10^{-pK_M}}{P} \quad (III.9)$$

III. Resultados y Discusión

en donde $\frac{A}{C_T \varepsilon_D}$ es la variable dependiente y el pH la variable independiente. Se ha denotado por R_M al cociente $\varepsilon_M/\varepsilon_D$ y P es el polinomio dado por la ecuación III.10.

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

Se realizaron ajustes no lineales por mínimos cuadrados de todas las curvas A versus pH en el intervalo de longitudes de onda entre 400 y 550 nm. Los parámetros de ajuste fueron pK_M (común a todas las longitudes de onda) y el valor de R_M (diferente a cada longitud de onda). El ajuste global no lineal se llevó a cabo utilizando el programa Origin 7.0, empleándose 400 curvas con 35 puntos cada curva; ya que se ajustaron las absorbancias cada 5 nm en todo el rango, excepto de 490 a 495 nm que se ajustaron las absorbancias cada nanómetro, ya que es en el intervalo de las longitudes de onda donde existe una variación en el valor de éste.

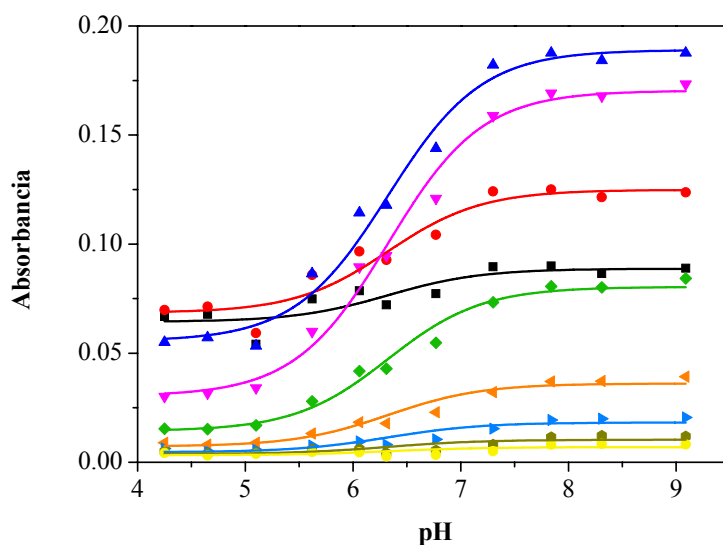


Figura III.6. Ajuste no lineal por mínimos cuadrados de A vs pH en 10 mM de tampón fosfato. La absorbancia está medida a las longitudes de onda de: 470 (■), 480 (●), 490 (▲), 500 (▼), 510 (◆), 520 (◄), 530 (►), 540 (●) y 550 (●) nm.

La figura III.6 muestra algunos de estos ajustes donde se obtiene la relación entre $\varepsilon_M/\varepsilon_D$ y se determina el valor de pK_M del equilibrio dianión-monoanión (pK_M).

El proceso de ajuste realizado proporciona una aceptable correlación entre los parámetros obtenidos, en el que el valor de los parámetros de dependencia estuvo siempre por encima de 0.985. Como es conocido, este dato estadístico es muy importante para descartar efectos de excesiva correlación entre los parámetros recuperados. El coeficiente de regresión de este ajuste simultáneo fue de 0.993.

El ajuste también permitió obtener los espectros de las especies de interés mediante la representación de los coeficientes de absorción molar a cada longitud de onda (Figura III.7).

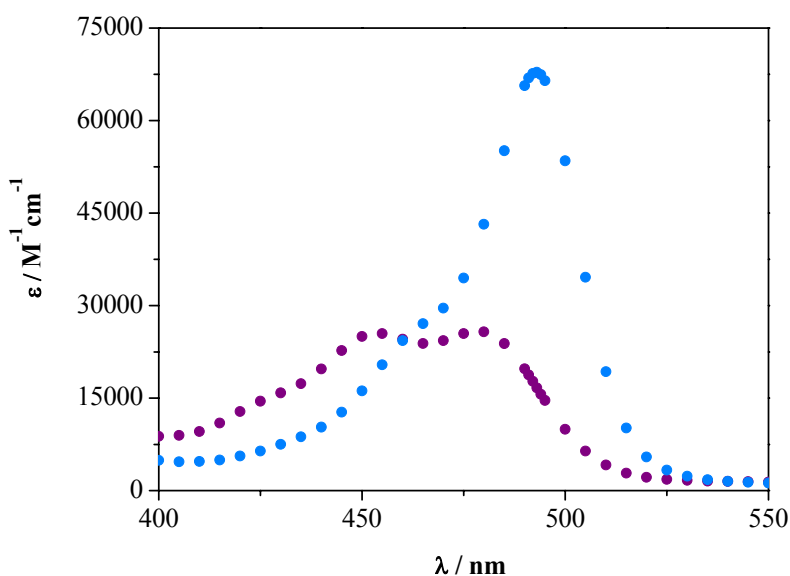


Figura III.7. Coeficientes de absorción molar de la forma aniónica (●) y dianiónica (●) del TGIII calculados a partir de la ecuación III.9.

Como se observa en la figura III.7, la especie monoaniónica del TGIII presenta dos máximos de absorción a 450 y 480 nm y un valle alrededor de 465 nm. El valor del coeficiente de absorción molar de esta especie a 450 nm obtenido del ajuste fue de $25457 \pm 300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Para la especie dianiónica el máximo de absorción se sitúa a 494 nm y presenta un coeficiente de absorción molar de $67439 \pm 350 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Cabe destacar la similitud de ambos espectros de absorción con las de las mismas especies prototrópicas para la fluoresceína, que presenta un máximo a 437 nm que se corresponde con el

III. Resultados y Discusión

monoanión, y a 490 nm con el dianión, y unos coeficientes de absorción molar de $21800 \pm 100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y $83600 \pm 70 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Crovetto *et al.*, 2004), respectivamente.

Tabla III.1

Coeficiente de absorción molar de la especie dianiónica del TGIII, así como del anión de otros derivados del Tokyo Green, el TGI y del TGII, y del dianión y pentaanión de algunos colorantes xanténicos (todos ellos equivalentes al dianión) más utilizados en ensayos biológicos.

λ / nm	$(\epsilon / \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}) \times 10^{-4}$					
	TGI ⁻	TGII ⁻	TGIII ²⁻	Fluoresceína ²⁻	OG488 ²⁻	BCECF ⁵⁻
420	0.15±0.06	0.35±0.01	0.56±0.03	0.30±0.08	0.38±0.10	0.28±0.09
440	0.47±0.05	0.71±0.01	1.03±0.03	0.92±0.08	1.05±0.10	0.70±0.09
470	2.07±0.04	2.73±0.01	2.96±0.09	3.80±0.08	4.10±0.10	2.98±0.09
480	3.65±0.03	4.34±0.03	4.32±0.09	6.11±0.08	6.48±0.10	4.19±0.09
490	5.24±0.03	6.76±0.03	6.57±0.09	8.28±0.08	8.95±0.10	6.23±0.09

TG-I: Crovetto *et al.*, 2007. TG-II: Paredes *et al.*, 2009.

Fluoresceína: Álvarez-Pez *et al.*, 2001. OG488: Orte *et al.*, 2005. BCECF: Boens *et al.*, 2006.

Tabla III.2

Coeficiente de absorción molar de la especie monoaniónica del TGIII, así como de la forma neutra de otros derivados del Tokyo Green, el TGI y del TGII, y del monoanión y tetraanión (todos ellos equivalentes al monoanión) de algunos colorantes xanténicos más utilizados en ensayos biológicos.

λ / nm	$(\epsilon / \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}) \times 10^{-4}$					
	TGI	TGII	TGIII ⁻	Fluoresceína ⁻	OG488 ⁻	BCECF ⁴⁻
420	1.20±0.07	0.88±0.04	1.28±0.04	1.34±0.08	1.46±0.06	1.21±0.09
440	1.98±0.08	1.44±0.02	1.97±0.04	2.35±0.08	2.60±0.06	2.00±0.09
470	2.00±0.08	1.78±0.08	2.43±0.13	3.11±0.08	3.43±0.06	2.93±0.09
480	1.98±0.08	1.87±0.08	2.58±0.13	3.04±0.08	3.26±0.06	3.26±0.09
490	0.70±0.08	1.31±0.01	1.97±0.12	1.99±0.08	2.29±0.06	2.88±0.09

TG-I: Crovetto *et al.*, 2007. TG-II: Paredes *et al.*, 2009.

Fluoresceína: Álvarez-Pez *et al.*, 2001. OG488: Orte *et al.*, 2005. BCECF: Boens *et al.*, 2006.

En las tablas III.1 y III.2 se recogen algunos valores de los coeficientes de absorción molar a diferentes longitudes de onda de interés para ambas especies, obtenidas del ajuste anteriormente mencionado. También se han incluido, para su comparación, algunos coeficientes de otros derivados Tokyo Green y otros fluoróforos xanténicos muy usados hoy en día.

Como se comentó anteriormente, del ajuste de la ecuación III.9 a la superficie $A/(C_T \epsilon_D)$ vs pH también es posible obtener los valores del pK_M implicado en el equilibrio monoanión-dianión del TGIII. En la tabla III.3 se recogen los valores de pK_M recuperados en distintas condiciones, junto con su error asociado.

Tabla III.3

Valores de pK_M recuperados del ajuste global no lineal por mínimos cuadrados de la superficie A versus pH.

COMPUESTO	pK_M
TGIII agua	6.20 ± 0.03
TGIII 10 mM Tris	6.29 ± 0.01
TGIII 10 mM fosfato	6.29 ± 0.02
TGIII 0.4M fosfato	6.20 ± 0.02
TGIII 0.8M fosfato	6.27 ± 0.02
TGI 10 mM fosfato (<i>Crovetto et al., 2007</i>)	5.94 ± 0.06 *
TGII 30 mM fosfato (<i>Paredes et al., 2009</i>)	6.27 ± 0.02 *
TGIII (<i>Mineno et al., 2006</i>)	6.20 *

*datos obtenidos de bibliografía.

III.2.1.3. Influencia de la fuerza iónica en las constantes de equilibrio.

Puesto que las reacciones ácido-base estudiadas para las formas dianión y monoanión del TGIII en el estado excitado tienen lugar a concentraciones altas de disolución tampón, se realizó un estudio previo de la influencia de la fuerza iónica en

III. Resultados y Discusión

las constantes de equilibrio. *Crovetto (2003)*, *Orte (2004)* y *Paredes et al. (2009)* han encontrado que los pK_a de distintos compuestos xanténicos como la fluoresceína, Oregon Green 488 o distintos derivados del Tokyo Green varían ligeramente con la fuerza iónica, mientras que en otros derivados como la BCECF esta influencia es alta. Por esta razón, se ha procedido a realizar un estudio similar con el colorante propuesto en esta Memoria

Para ello, se registraron los espectros de absorción en medio acuoso de disoluciones de 3×10^{-6} M de TGIII en tampón fosfato de concentraciones comprendidas entre 0.005 y 0.8 M a pH 6 (figura III.8). Como se puede observar los espectros de absorción no se alteran significativamente en el intervalo de concentraciones comentado, pudiendo concluir que prácticamente no existe influencia de la fuerza iónica en el equilibrio ácido-base. La anterior aseveración se corrobora tras el análisis de los datos recogidos en la tabla III.3, en donde se comprueba que existe una muy pequeña variación de los valores de pK_M obtenidos a diferentes condiciones de fuerza iónica con diferentes disoluciones tampón.

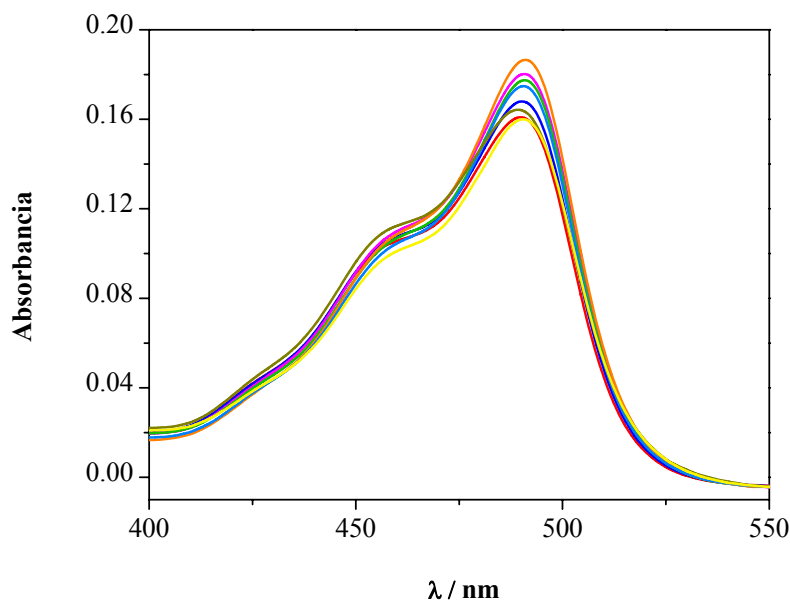


Figura III.8. Espectros de absorción del TGIII (3×10^{-6} M) en tampón fosfato de concentraciones comprendidas entre 0.005 y 0.8 M a pH 6.

III.2.2. ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

III.2.2.1. Espectroscopia de Fluorescencia en estado estacionario

III.2.2.1.1. Caracterización de la emisión de las especies prototrópicas de equilibrio monoanión-dianión del TGIII

Como se ha demostrado en la sección anterior, el colorante estudiado en esta Memoria presenta una importante dependencia de las especies prototrópicas con el pH debido a los equilibrios ácido – base. Por tanto, en un primer paso, y con objeto de realizar una descripción completa de las características fotofísicas del fluoróforo, se estudiaron las especies de fluorescencia en estado estacionario de las especies monoaniónica y dianiónica del TGIII.

En la figura III.9, como ejemplo, se muestran los espectros de emisión en estado estacionario correspondientes a disoluciones acuosas de TGIII a diferentes pHs y una concentración de fosfato igual a 10 mM. La adición de tampón fosfato a tan 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 (*Ávarez-Pez et al., 2001*). En la figura III.9A la longitud de onda de excitación escogida fue de 440 nm, correspondiente a una excitación preferente de la forma monoaniónica, mientras que en la figura III.9B la longitud de onda de excitación seleccionada fue de 494 nm, excitando así preferentemente la forma dianiónica. Se debe destacar que aunque el máximo de absorción de la especie monoaniónica es 450 nm (figura III.7), la elección de 440 nm como longitud de onda de excitación se justifica para mantener las condiciones de excitación en las posteriores medidas de fluorescencia de tiempo resuelto, en las que se empleará un láser de 440 nm, ya que la relación de la excitación de las dos especies a ambas longitudes de onda es muy similar. Como se puede observar, la intensidad de fluorescencia y la forma de los espectros varía con el pH.

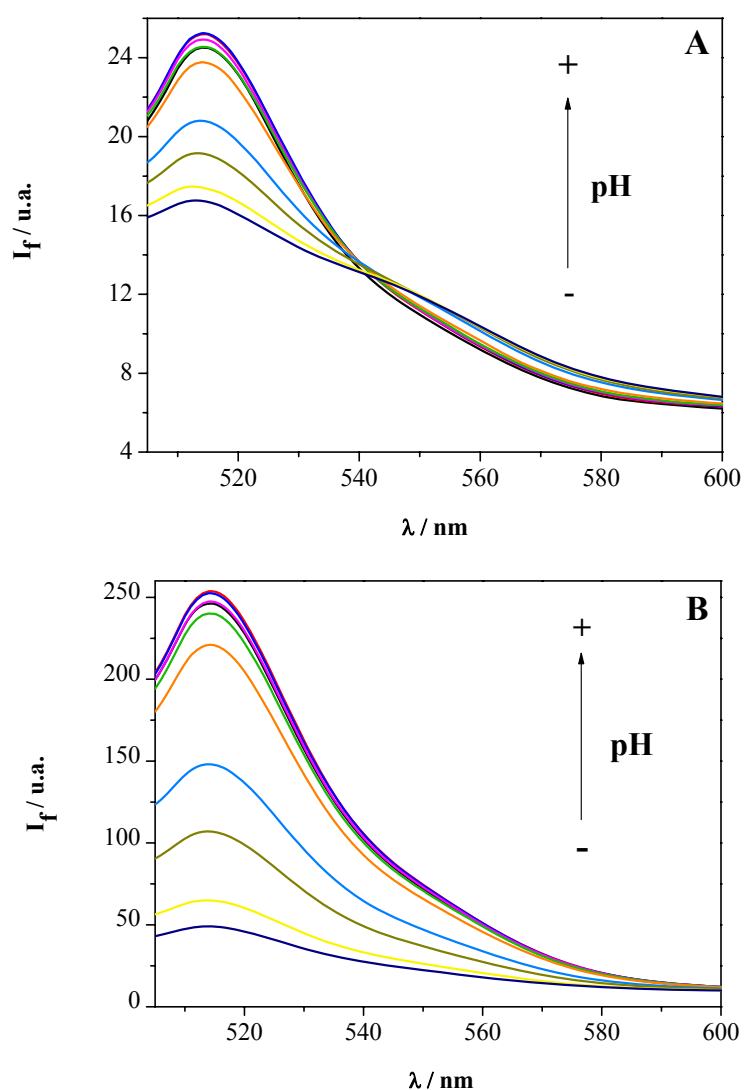


Figura III.9. Espectros de emisión de fluorescencia del TGIII (2.73×10^{-6} M) a pH 5.40, 5.62, 6.02, 6.35, 7.09, 7.56, 7.91, 8.39, 8.79 y 8.89 en tampón fosfato 10 mM. La longitud de onda de excitación fue de 440 nm (A) y 494 nm (B).

En la figura III.10 se muestran los espectros de emisión normalizados de las dos formas iónicas del TGIII. Estos espectros se han obtenido a pH 9.03, en donde solo existe la forma dianiónica, y a pH 4.27, en donde la forma predominante es la monoaniónica. Para ambos pHs la longitud de onda de excitación se fijó en 440 nm, lo que implica la excitación preferentemente del monoanión. Los valores de pH de estas disoluciones se obtuvieron únicamente con NaOH y HClO₄ al objeto de evitar la

presencia de reacciones en el estado excitado. En la Figura III.10 se puede observar que la forma monoaniónica presenta un máximo a 515 nm, así como un hombro a 550 nm. El espectro de emisión de la forma dianiónica muestra un máximo a 515 nm, presentando este último más intensidad de fluorescencia que la especie monoaniónica.

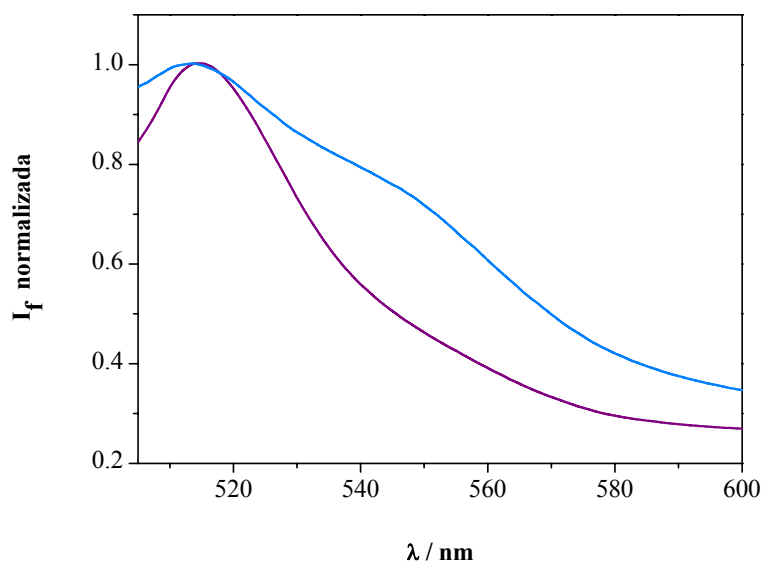


Figura III.10. Espectros de emisión normalizados de las especies (—) monoanión (pH 4.27) y (—) dianión (pH 9.03) de TGIII, recogidos de disoluciones acuosas de concentración 2.73×10^{-6} M. La longitud de onda de excitación fue 440 nm para ambos espectros.

Al objeto de evidenciar la reacción de transferencia protónica en el estado excitado entre TGIII y el tampón fosfato, así como la influencia de la concentración de este último en el progreso de la mencionada reacción, se recogieron los espectros de fluorescencia en estado estacionario de disoluciones de TGIII 3×10^{-6} M y concentraciones crecientes de tampón fosfato (entre 0.005 y 0.8 M), a un pH constante de 6.

La selección cuidadosa del pH y de las longitudes de onda de excitación ($\lambda^{\text{ex}} = 420, 440$ y 494 nm) es fundamental para el objeto que se persigue. Así, las longitudes de onda de 420 y 440 nm excitan preferentemente al monoanión, mientras que la de 494 nm lo hace con la forma dianiónica. En lo que se refiere al valor del pH elegido, también provoca que en el estado fundamental haya mayor concentración de la especie monoanión, ya que el valor del pK_M para el equilibrio monoanión-dianión en el estado

III. Resultados y Discusión

fundamental es de 6.20 (valor calculado por espectroscopía de absorción en disolución acuosa, tabla III.3). Por lo tanto, a pH 6 la relación entre las concentraciones de las formas monoaniónica y dianiónica en el estado fundamental está levemente desplazada hacia una mayor concentración de la forma monoaniónica. Así, la fluorescencia en estado estacionario de las diferentes disoluciones analizadas debería aumentar con el incremento de la concentración de fosfato si realmente se produjese una transferencia protónica efectiva durante el tiempo de vida del estado excitado.

En la figura III.11 se puede observar el ascenso esperado en la intensidad del máximo de emisión conforme aumenta la concentración de fosfato. Además, se produce un ligero desplazamiento del mencionado máximo hacia el rojo y se observa la desaparición del pequeño hombro alrededor de 550 nm. Este hecho indica la formación del dianión a partir del monoanión, durante el tiempo de vida del estado excitado del TGIII.

Como era de esperar, se produce una transferencia protónica en el estado excitado solo cuando hay presente en el medio una concentración suficiente de dador-aceptor protónico, cuya velocidad aumenta con el incremento de la concentración de fosfato, lo que lleva consigo la generación, en el estado excitado, de una mayor cantidad de la forma dianiónica. En efecto, la reacción en el estado excitado "borra" las concentraciones características que se originaron inicialmente en el estado excitado, que derivan de las de partida en el estado fundamental, correspondientes al equilibrio protónico en este estado y de la excitación preferente del monoanión o dianión, e impone las nuevas concentraciones de acuerdo con el pK_M^* del estado excitado.

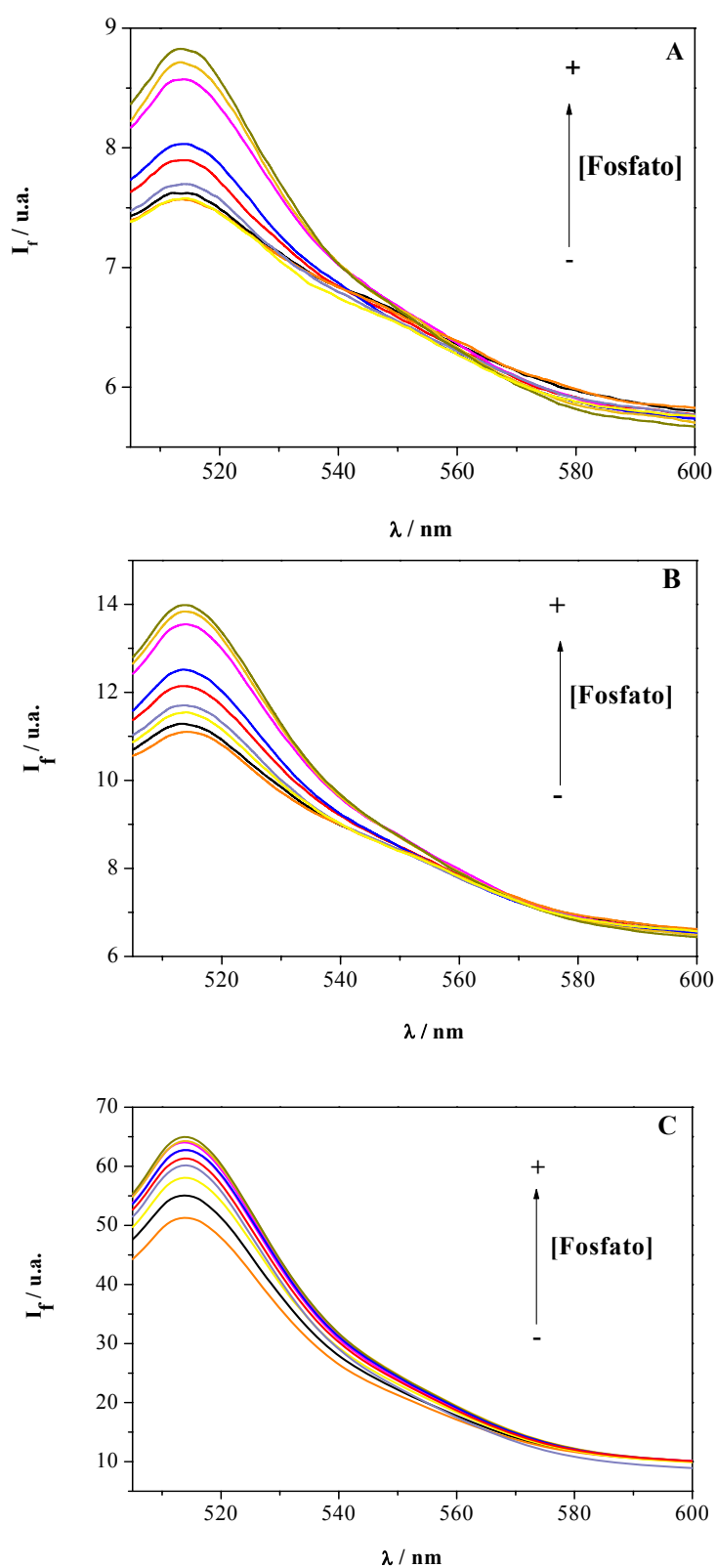


Figura III.11. Intensidad de fluorescencia de TGIII (3×10^{-6} M) con concentraciones variables de tampón fosfato (0.005, 0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8M) todas ellas a pH 6, recogidas a una longitud de onda de excitación de 420 (A), 440 (B), y 494 nm (C).

En la figura III.11 se puede observar también que la transformación del monoanión en dianión no ocurre significativamente a bajas concentraciones de fosfato, y que el efecto satura cuando la concentración de fosfato se acerca a 0.8 M. Los resultados anteriormente expuestos demuestran de forma convincente la existencia de una reacción de transferencia protónica entre el monoanión y dianión de TGIII en el estado excitado mediada por la presencia de fosfato, que actúa como dador-aceptor protónico.

Tradicionalmente, las reacciones protónicas en estado excitado se han estudiado por comparación de las gráficas absorbancia *versus* pH (figura III.6), con la de intensidad de fluorescencia *versus* pH (Weller, 1961; Schulman *et al.*, 1979; Van der Donck, 1970; Weller, 1958). La transición inducida por el pH que aparece en la gráfica de absorción se corresponde con las reacciones protónicas en el estado fundamental, y suceden en una región de valores de pH que viene impuesta por el valor de pK_a . Por otra parte, las transiciones que aparecen en la gráfica de intensidad de fluorescencia *versus* pH se deben a una combinación de las reacciones protónicas en el estado fundamental y en el excitado. Si el valor de pK_a^* en el estado excitado difiere del correspondiente valor en estado fundamental, y si la reacción del estado excitado es suficientemente rápida para ocurrir durante el tiempo de vida del estado excitado, la representación de intensidad de fluorescencia *versus* pH tendrá una transición inducida por el pH, añadida a las transiciones del estado fundamental observadas en la gráfica absorbancia *versus* pH.

III.2.2.1.2. Fluorescencia en estado estacionario en medios con baja concentración de dador-aceptor protónico

Al objeto de realizar un análisis cuantitativo de los resultados descritos en el anterior epígrafe, a continuación se derivará 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 el monoanión y el dianión del TGIII, situación que ocurre a baja concentración de tampón fosfato. Para simplificar el modelo, se va a suponer que para valores de $pH > 5$ todas las especies neutras y cationes de TGIII (si estuvieran

presentes) se convierten rápidamente y con el 100 % de eficiencia en monoaniones excitados, a través de reacciones de transferencia protónica en el estado excitado. Este último hecho fue convincentemente demostrado para la fluoresceína en un trabajo previo (Yguerabide *et al.*, 1994). Así, la emisión sucede exclusivamente desde el monoanión o el dianión. Con estas suposiciones se puede escribir la siguiente expresión para la intensidad de fluorescencia, I , de TGIII en disolución acuosa:

$$I = C_T [\phi_M (\alpha_C \varepsilon_C + \alpha_N \varepsilon_N + \alpha_M \varepsilon_M) + \phi_D \alpha_D \varepsilon_D] \quad (\text{III.11})$$

en donde C_T es la concentración total de fosfato, α_j es la fracción de TGIII en la forma protonada j , ε_j es el coeficiente de absorción molar de la forma protonada j de TGIII, y ϕ_M y ϕ_D son las eficiencias relativas de fluorescencia del monoanión y dianión, respectivamente, a la longitud de onda de emisión. El valor de α depende del pH y del pK_M en el estado fundamental, mientras que los valores de ε dependen de la longitud de onda de excitación, y los de ϕ 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 α_j con el pH, según las ecuaciones III.2-III.5.

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.11, se ajustó la mencionada ecuación, junto a las ecuaciones III.2-III.5 que describen la dependencia de α_i con el pH, a los datos experimentales de la figura III.9. En el citado ajuste se consideraron fijos los valores de ε_i , previamente obtenidos en la sección de absorción (epígrafe III.2.1) y se dejaron flotantes los de K_M , ϕ_M y ϕ_D . El coeficiente de correlación del ajuste fue $r^2 = 0.997$.

El valor de la constante de equilibrio obtenido para el mejor ajuste se expone en la tabla III.4 junto con el de fluoresceína. En la tabla III.5 también se muestran los valores de los cocientes de los parámetros espectrales obtenidos en los citados ajustes en diferentes condiciones.

Tabla III.4

Valores de pK_M de TGIII en fosfato 10 mM y de fluoresceína obtenidos mediante fluorescencia en estado estacionario.

	Fluoresceína	TGIII
pK_M	6.40*	6.29 ± 0.02
* (Álvarez-Pez <i>et al.</i> , 2001)		

Tabla III.5

Valores de la relación entre los parámetros espectrales de las especies monoaniónica y dianiónica en diferentes condiciones obtenidos mediante el ajuste de la ecuación III.11 a los datos experimentales de la figura III.9.

λ_{em} (nm)	ϕ_M/ϕ_D ($\lambda_{ex}=440$ nm)	ϕ_M/ϕ_D ($\lambda_{ex}=494$ nm)
515	0.62 ± 0.07	0.09 ± 0.64
525	0.69 ± 0.06	0.10 ± 0.59
540	0.97 ± 0.06	0.16 ± 0.55
550	1.08 ± 0.06	0.21 ± 0.54

En la figura III.12 se muestra la gráfica de intensidad de fluorescencia *versus* pH de disoluciones de TGIII 2.6×10^{-6} M en presencia de fosfato 10 mM. En la citada gráfica se puede observar una única transición que aparece centrada en una región de pH alrededor de 6.2, similar a la obtenida en los experimentos de absorción (Figura III.6). La línea continua a través de los puntos experimentales de la figura III.12 se ha calculado con la ecuación III.11 y los valores de los parámetros de las tablas III.4 y III.5. Como se puede observar, el ajuste fue excelente, lo que justifica las suposiciones realizadas sobre la conversión de las especies catiónica y neutra en la monoaniónica, incluso a baja concentración de dador/aceptor protónico.

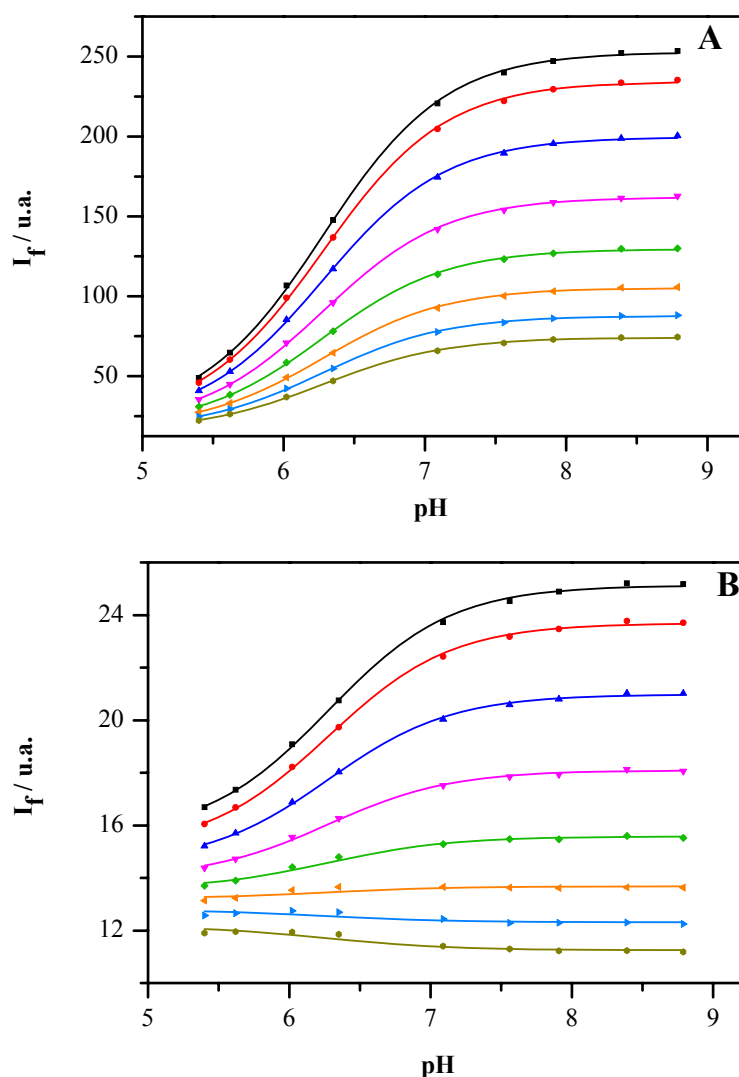


Figura III.12. Intensidad de fluorescencia *versus* pH de disoluciones de TGIII 2.6×10^{-6} M en tampón fosfato 10 mM. La fluorescencia fue recogida excitando a una longitud de onda de excitación de 494 nm (A) y 440 nm (B). Los símbolos representan los puntos experimentales, siendo las longitudes de onda de emisión las siguientes: ■ (515nm), ● (520nm), ▲ (525nm), ▼ (530nm), ◆ (535nm), ◀ (540nm), ▶ (545nm) y ● (550nm), mientras que la línea continua representa la curva calculada con la ecuación III.11 y con los parámetros recuperados mediante el ajuste.

Por otra parte, el valor obtenido para el pK_M mediante espectroscopia de fluorescencia en estado estacionario ($pK_M = 6.29$) concuerda muy bien con el obtenido anteriormente en las mismas condiciones ($pK_M = 6.29$) mediante espectroscopia de absorción (ver tabla III.3). Este resultado demuestra que cuando el dador-aceptor protónico no se encuentra a una concentración apropiada no hay ninguna reacción de transferencia protónica en el estado excitado.

III.2.2.1.3. Fluorescencia en estado estacionario en medios con alta concentración de dador-aceptor protónico

Al contrario de lo descrito en el epígrafe anterior, en medios con alta concentración de dador-aceptor protónico, las gráficas de intensidad de fluorescencia *versus* pH varían con respecto a la anteriormente mostrada en presencia de bajas concentraciones de tampón fosfato. En presencia de tampón fosfato 0.4 M y 0.8 M (Figuras III.13 y III.14) se evidencia una transición ligeramente desplazada hacia menores valores de pH. Estos resultados concuerdan cualitativamente con la idea de una reacción en el estado excitado y con los valores anteriormente encontrados de pK_a y pK_a^* en fluoresceína (Yguerabide *et al.* 1994, Álvarez-Pez *et al.* 2001) y otros Tokyo Green (Paredes *et al.*, 2010).

La cuantificación de los efectos observados en la gráfica de intensidad de fluorescencia *versus* pH en presencia de fosfato 0.4 y 0.8 M permite el cálculo del pK_M^* de la reacción, si se supone que ésta es lo suficientemente rápida como para alcanzar el equilibrio en el tiempo de vida del estado excitado. Bajo estas premisas, la intensidad de fluorescencia o espectro de emisión no dependerá de la forma prototrópica preferentemente excitada, debido a la rápida conversión entre ambas formas en el estado excitado, lo que hace que la relación entre ambas concentraciones sea esencialmente la dictada por el valor del pK_M^* . En esta aproximación se supone despreciable el efecto de la fuerza iónica sobre las concentraciones de las dos especies iónicas acopladas.

Para el modelo anterior y con la suposición de que todas las especies neutras y cationes se convierten totalmente en monoaniones mediante reacciones en el estado excitado, se puede escribir la siguiente ecuación, derivada de las leyes espectroscópicas de absorción y emisión, y de la teoría simple del equilibrio:

$$I = A \times \left(\frac{\phi_M}{1 + 10^{(pH - pK_M^*)}} + \frac{\phi_D}{1 + 10^{(pK_M^* - pH)}} \right) \quad (\text{III.12})$$

en donde I es la intensidad de fluorescencia a una λ^{em} determinada, A es la absorbancia a la longitud de onda de excitación, ϕ_M y ϕ_D son las eficiencias relativas de fluorescencia del monoanión y dianión, respectivamente a la λ^{em} escogida, y pK_M^* es el pK_a de la reacción en el estado excitado $M^* \rightleftharpoons D^* + H^+$.

Para determinar si la intensidad de fluorescencia *versus* pH en presencia de tampón fosfato 0.4 y 0.8 M se puede explicar de forma cuantitativa por el modelo de la ecuación III.12, se ajustó la mencionada ecuación a los datos experimentales de las figuras III.13 y III.14 mediante un algoritmo no lineal de mínimos cuadrados. En el citado ajuste se consideraron fijos los valores de ϕ_M y ϕ_D previamente obtenidos (Tabla III.5) y se dejó flotante solo el del pK_M^* . La Tabla III.6 muestra los valores obtenidos de pK_M^* del TGIII en tampón fosfato 0.8 M y 0.4 M.

La bondad del ajuste, así como los resultados obtenidos, demuestran que la reacción de transferencia protónica es lo suficientemente rápida como para ocurrir durante el tiempo de vida del estado excitado.

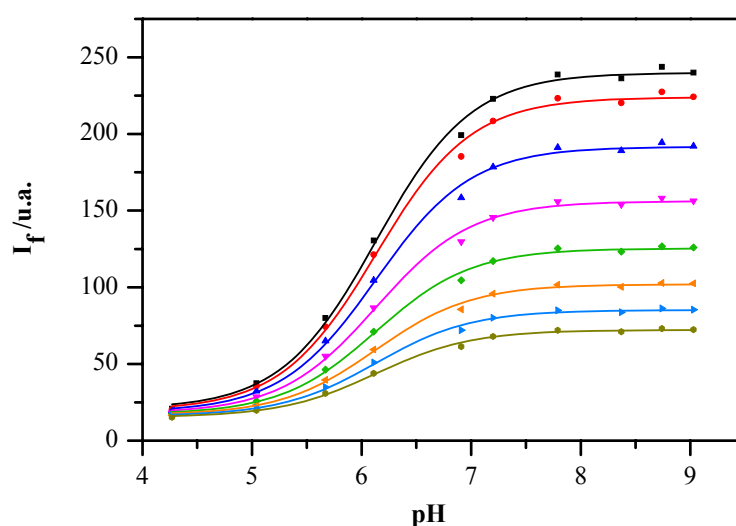


Figura III.13. Intensidad de fluorescencia ($\lambda^{\text{ex}} = 494 \text{ nm}$) *versus* pH, para disoluciones acuosas de TGIII $3 \times 10^{-6} \text{ M}$ en tampón fosfato 0.4 M. Las líneas continuas representan el mejor ajuste de la ecuación III.12 a los datos experimentales, siendo las longitudes de onda de emisión las siguientes: ■ (515nm), ● (520nm), ▲ (525nm), ▼ (530nm), ◆ (535nm), ◀ (540nm), ► (545nm) y ● (550nm).

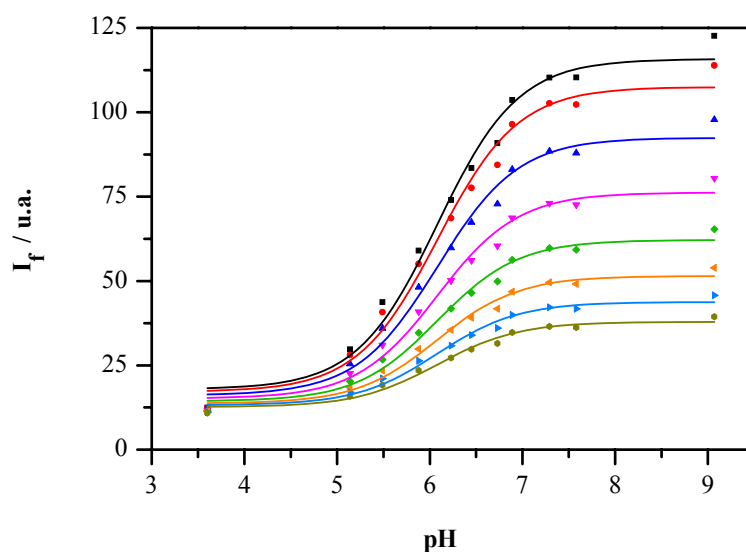


Figura III.14. Intensidad de fluorescencia ($\lambda^{ex} = 494 \text{ nm}$) versus pH, para disoluciones acuosas de TGIII $3 \times 10^{-6} \text{ M}$ en tampón fosfato 0.8 M. Las líneas continuas representan el mejor ajuste de la ecuación III.12 a los datos experimentales, siendo las longitudes de onda de emisión las siguientes: ■ (515nm), ● (520nm), ▲ (525nm), ▼ (530nm), ◆ (535nm), ◀ (540nm), ▶ (545nm) y ● (550nm).

Tabla III.6

pK_M^* del TGIII y coeficiente de correlación del ajuste.

	Fosfato 0.4 M	Fosfato 0.8 M
pK_M^*	6.08 ± 0.03 ($r^2 = 0.991$)	6.13 ± 0.01 ($r^2 = 0.999$)

III.2.2.2. Espectroscopia de Fluorescencia 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. 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 monoaniónica y dianiónica del TGIII 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.

Para las medidas de fluorescencia de resolución temporal se recogieron los decaimientos de fluorescencia a dos longitudes de onda de excitación, 440 y 470 nm, y cuatro longitudes de onda de emisión, 515, 525, 540 y 550 nm. Los decaimientos de fluorescencia se recogieron con disoluciones de TGIII en diferentes condiciones: en ausencia de tampón, a baja y alta concentración de tampón fosfato, y a diferentes valores de pH.

III.2.2.2.1. Sistema bicompartimental $M^* \rightleftharpoons D^*$ del TGIII en ausencia de tampón

Con el objeto de conocer la cinética del TGIII, se recogieron los decaimientos de fluorescencia de disoluciones acuosas de TGIII (2.73×10^{-6} M) en un amplio intervalo de pHs en ausencia de aceptor/dador protónico. En ausencia de tampón los decaimientos de fluorescencia del TGIII fueron biexponenciales en el intervalo de pH comprendido entre 5.09 y 6.52, con tiempos de vida independientes del pH y de las longitudes de onda de excitación y de emisión, como se puede comprobar en la figura III.15. Además, los factores pre-exponenciales α fueron positivos en todos los casos (ver tabla III.7). Dado que en ausencia de reacción de transferencia protónica en el estado excitado las formas prototrópicas del TGIII no están acopladas, la emisión de fluorescencia de cada una de las especies debe decaer independientemente una de la otra, tal como se observa en los experimentos realizados. Por lo tanto, los tiempos de vida calculados corresponden a las formas excitadas del monoanión y dianión. Los valores experimentales para estos tiempos de vida calculados en los análisis globales de los decaimientos de fluorescencia a diferentes valores de pH y longitudes de onda de emisión en ausencia de tampón fosfato fueron $\tau_1 = 2.98 \pm 0.21$ ns y $\tau_2 = 3.80 \pm 0.10$ ns.

Se debe resaltar que a valores de pH mayores de 6.52 los decaimientos de fluorescencia se ajustaron a una función monoexponencial con un valor de τ alrededor de 3.8 ns (tabla III.7). Esto es debido a que cuando el pH es mucho mayor que el valor del pK_M del TGIII calculado en ausencia de tampón, 6.20 (ver tabla III.3), la concentración de monoanión comienza a hacerse insignificante y no llega a detectarse

III. Resultados y Discusión

su fluorescencia. Por lo tanto, el tiempo de vida de 3.8 ns se atribuye a la forma dianiónica del TGIII. Así, se puede obtener el valor de k_{02} o constante de decaimiento del dianión a partir de la conocida expresión $\tau_2^0 = 1/k_{02}$, de la que se obtiene un valor para k_{02} de $2.63 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$. El tiempo de vida corto obtenido en el intervalo de pH entre 5 y 6.52 debe corresponder, por lo tanto, al tiempo de vida de la forma monoaniónica. Ese tiempo de vida, τ_1^0 , corresponde a la inversa de la suma de las constantes $k_{01} + k_{21}$. Por lo tanto, se obtuvo un valor de $k_{01} + k_{21}$ de $3.36 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$ (ver figura III.17 en página 185).

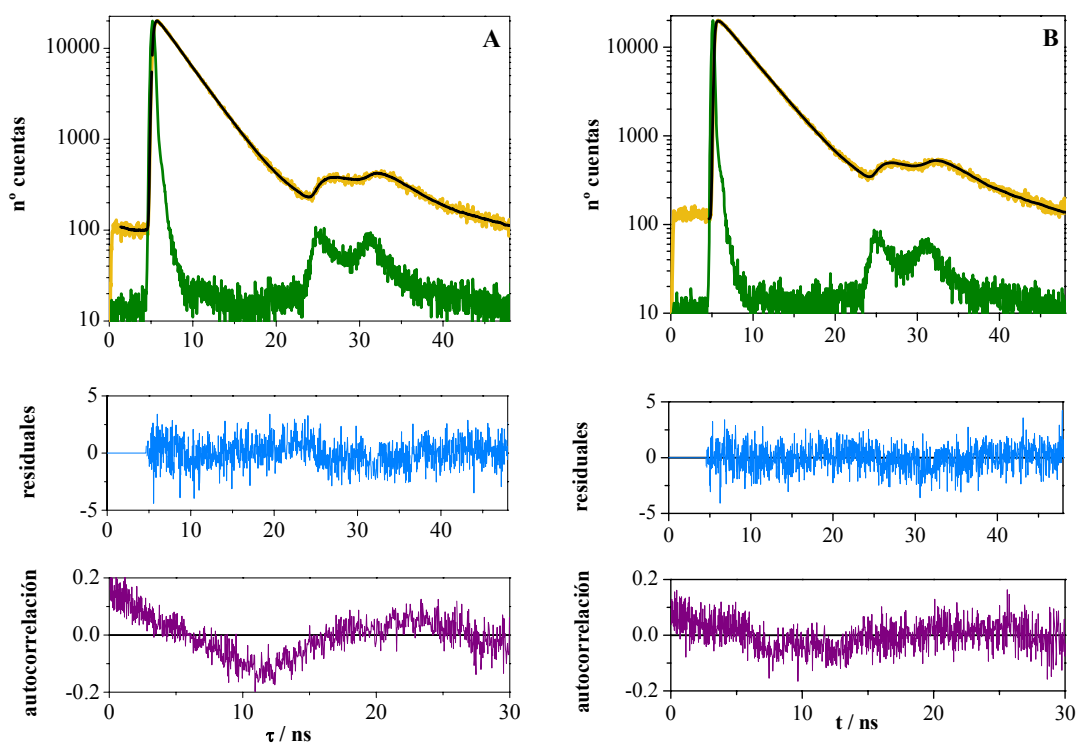


Figura III.15. Decaimientos, residuales y funciones de autocorrelación de disoluciones acuosas de TGIII ($2.73 \times 10^{-6} \text{ M}$) a pH 5.09 (A) y pH 8.06 (B). Ambos decaimientos fueron recogidos a $\lambda_{\text{ex}} = 470 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 550 \text{ nm}$.

En la figura III.15 se muestra como ejemplo dos decaimientos recogidos de disoluciones de TGIII en agua a valores de pH por debajo y por encima del valor del pK_M . También se muestran los residuales y las funciones de autocorrelación locales de cada decaimiento individual, obtenidos respecto a la mejor función de ajuste. En

adición, en la tabla III.7 se reúnen los valores de los tiempos de vida y los factores pre-exponenciales normalizados obtenidos en los ajustes globales de los decaimientos de fluorescencia del TGIII en disoluciones acuosas (en ausencia de tampón) recogidos a diferentes valores de pH y una longitud de onda de emisión de 515 nm.

Tabla III.7

Resultados de los análisis globales de los decaimientos de fluorescencia de disoluciones acuosas de TGIII ($2.73 \times 10^{-6} \text{M}$) en ausencia de un aceptor/dador protónico a diferentes valores de pH. Se muestra el valor de los tiempos de vida y de los parámetros pre-exponenciales normalizados obtenidos a 470 nm como longitud de onda de excitación y 515 nm como longitud de onda de emisión.

pH	τ_1 (ns)	α_1	τ_2 (ns)	α_2
5.09	3.08	0.49338	3.82	0.50662
5.81	3.12	0.21452	3.79	0.78548
6.25	3.11	0.15232	3.87	0.84768
6.52	3.16	0.03311	3.84	0.96689
7.09	-	-	3.89	1
7.69	-	-	3.88	1
8.06	-	-	3.84	1
8.58	-	-	3.85	1
9.08	-	-	3.82	1

Una evidencia adicional para la asignación de estos tiempos de vida a las mencionadas formas del TGIII se puede obtener a partir de la dependencia de los factores pre-exponenciales α_1 y α_2 con el pH. La mencionada dependencia se muestra en la figura III.16. A valores de pH menores que el pK_M la concentración de monoanión debe ser predominante, mientras que el incremento del pH aumentará la concentración de dianión. Dado que en la representación de la figura III.16 las longitudes de onda de excitación y emisión son fijas, el valor de los factores pre-exponenciales normalizados es proporcional a la concentración relativa de ambas formas. Así, los valores más altos de pH favorecen la formación de dianión, mientras que a valores bajos de pH hay mayor

cantidad relativa de monoanión. En la citada figura III.16 se puede observar que la tendencia obtenida en los valores experimentales de los factores pre-exponenciales obedece a las anteriores consideraciones. Como consecuencia, el pre-exponencial normalizado $\alpha_2/(\alpha_1+\alpha_2)$ se debe asignar al dianión y el pre-exponencial normalizado $\alpha_1/(\alpha_1+\alpha_2)$ debe asignarse al monoanión.

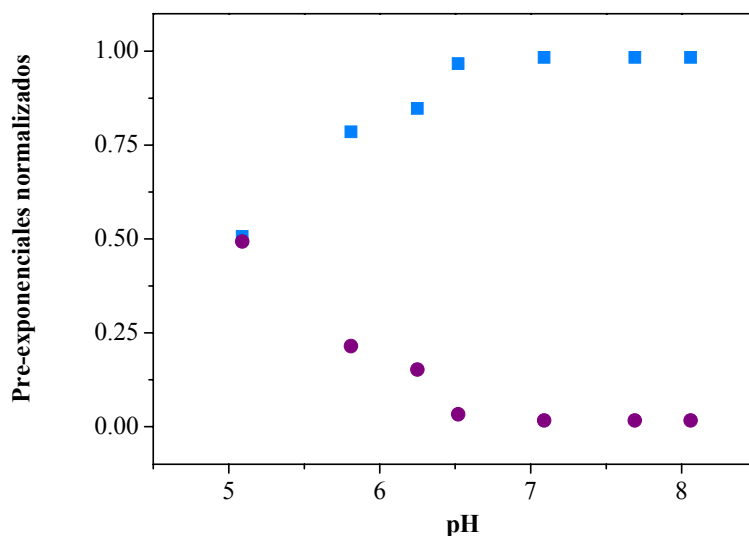


Figura III.16. Factores pre-exponenciales normalizados *versus* pH. (●) corresponde a los pre-exponenciales de τ_1 y (■) a los de τ_2 . Los valores experimentales se obtuvieron mediante análisis global biexponencial de los decaimientos de disoluciones de TGIII ($2.73 \times 10^{-6} \text{M}$) en ausencia de tampón fosfato. La longitud de onda de excitación fue 470 nm y la de emisión 515 nm.

III.2.2.2.2. Sistema bicompartimental $M^* \rightleftharpoons D^*$ del TGIII en presencia de altas concentraciones de tampón fosfato

Con la adición de un aceptor/dador protónico adecuado, como es el tampón fosfato, se promociona 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 del colorante 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. El modelo cinético de reacción en dos estados excitados se muestra en la figura III.17.

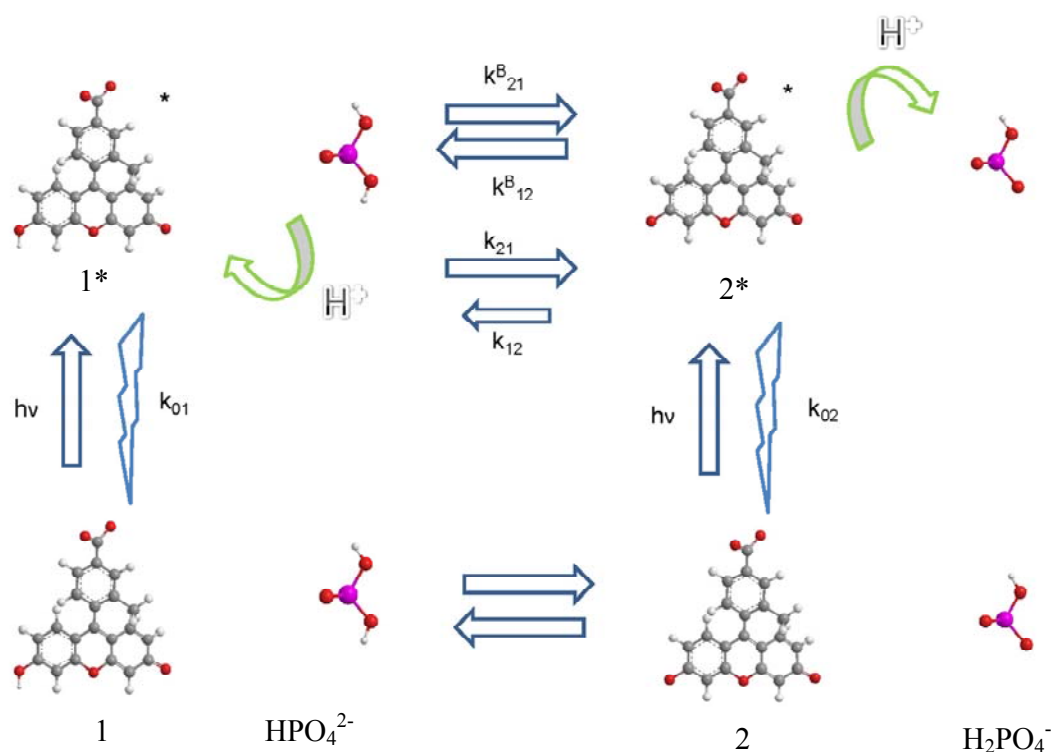


Figura III.17. Modelo cinético de la reacción de transferencia protónica en estado estacionario y estado excitado entre TGIII y el ión fosfato.

En este modelo, las especies 1 y 2 son respectivamente el monoanión y dianión de TGIII en el estado fundamental; 1* y 2* son las especies correspondientes en el estado excitado; mientras que las formas prototrópicas del tampón son las formas H_2PO_4^- y HPO_4^{2-} .

Para el estudio del sistema bicompartimental en presencia de altas concentraciones de tampón fosfato se prepararon disoluciones a un valor constante de pH y un intervalo de concentraciones de tampón fosfato entre 0.005 y 0.8 M. Además, también se recogieron los decaimientos de fluorescencia de disoluciones de TGIII a diferentes pHs y altas concentraciones de tampón fosfato (0.4 y 0.8 M). Como en el caso de disoluciones en ausencia de tampón fosfato, todos los decaimientos de fluorescencia recogidos en presencia de altas concentraciones de tampón fueron biexponenciales en el intervalo de pH entre 4 y 7, con tiempos de vida independientes de las longitudes de onda de excitación y de emisión (Ver tablas III.8-III.10). Sin embargo, al contrario de lo que sucedió en ausencia de fosfato, los dos tiempos de vida

III. Resultados y Discusión

resultaron dependientes del pH y los factores pre-exponenciales correspondientes al tiempo de vida corto fueron negativos. Por tanto, estos resultados confirman la hipótesis de que existe un intercambio protónico entre el TGIII y el fosfato en el estado excitado.

Para la obtención de los factores pre-exponenciales α_1 y α_2 , y de los tiempos de vida τ_1 y τ_2 en estas condiciones, se analizaron los decaimientos temporales experimentales de la fluorescencia mediante análisis global biexponencial de las trazas fluorescentes obtenidas al mismo pH, ligando los tiempos de vida (ecuación III.13).

$$f(\lambda_{exc}, \lambda_{em}, t) = \alpha_1 e^{-\frac{t}{\tau_1}} + \alpha_2 e^{-\frac{t}{\tau_2}} \quad (III.13)$$

A modo de ejemplo, en las figuras III.18 y III.19 se muestran algunos decaimientos recogidos de disoluciones de TGIII en tampón fosfato 0.4 y 0.8 M, a diferentes valores de pH. Como en los casos anteriores en ausencia de tampón, estos decaimientos han sido analizados globalmente, ligando los tiempos de vida y los pre-exponenciales. También se muestran los residuales y las funciones de autocorrelación locales de cada decaimiento individual, obtenidos respecto a la mejor función de ajuste. Como se puede observar, los residuales y las funciones de autocorrelación están distribuidos al azar, alrededor del valor cero, lo que indica un excelente ajuste.

Asimismo, las tablas III.8 y III.9 muestran algunos ejemplos de los valores de los tiempos de vida y los factores pre-exponenciales obtenidos en los ajustes globales de decaimientos de fluorescencia del TGIII en presencia de 0.4 y 0.8 M de tampón fosfato a diferentes valores de pH. En la tabla III.10 se muestran los resultados obtenidos en los ajustes globales de los decaimientos del colorante en disoluciones a pH 6 y diferentes concentraciones de tampón fosfato.

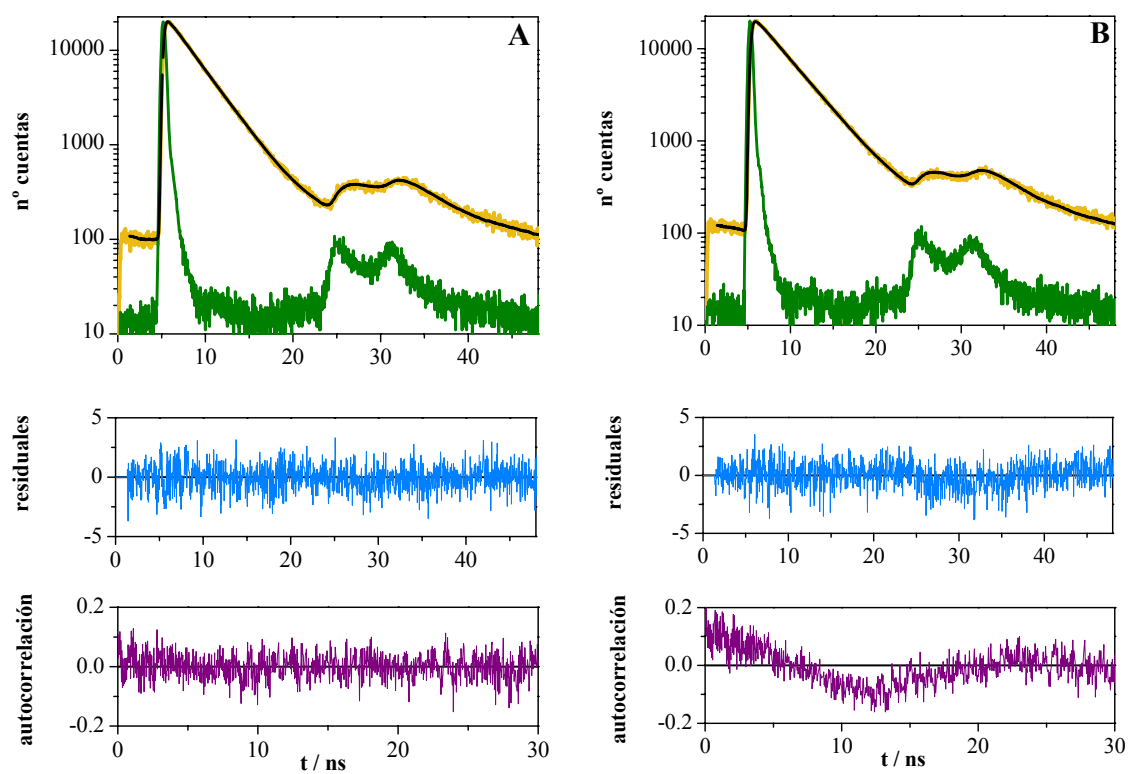


Figura III.18. Decaimientos, residuales y funciones de autocorrelación de TGIII (2.3×10^{-6} M) en tampón fosfato 0.4 M a pH 5.04 (A) y 8.37 (B). Ambos decaimientos fueron recogidos a $\lambda_{\text{ex}} = 470$ nm y $\lambda_{\text{em}} = 550$ nm.

III. Resultados y Discusión

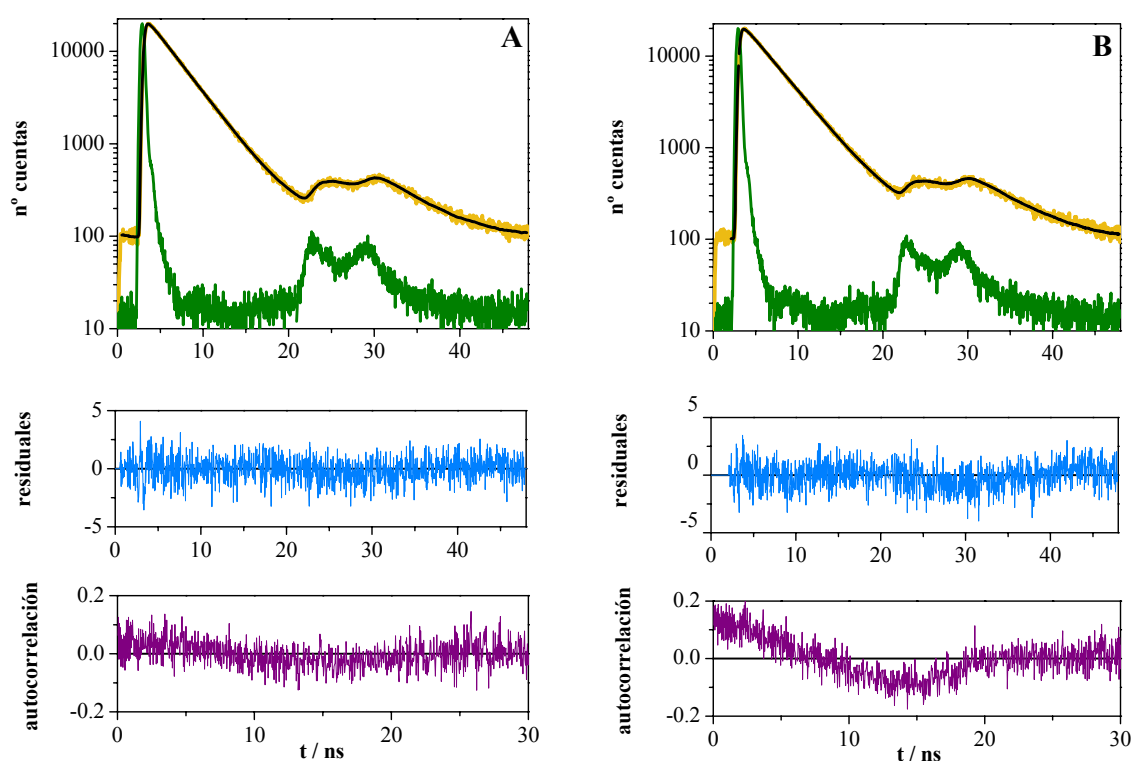


Figura III.19. Decaimientos, residuales y funciones de autocorrelación de TGIII (2.3×10^{-6} M) en tampón fosfato 0.8 M a pH 5.14 (A) y 7.58 (B). Ambos decaimientos fueron recogidos a $\lambda_{\text{ex}} = 470$ nm y $\lambda_{\text{em}} = 550$ nm.

Tabla III.8

Resultados de los análisis globales de los decaimientos de fluorescencia de disoluciones de TGIII ($2.3 \times 10^{-6} \text{M}$) en presencia de altas concentraciones de un aceptor/dador protónico a diferentes valores de pH ($\lambda_{\text{ex}} = 440 \text{ nm}$). Se indican los valores de los tiempos de vida, de los parámetros pre-exponenciales normalizados obtenidos a diferentes longitudes de onda de emisión (515, 525, 540 y 550 nm) y del parámetro χ^2 reducido.

[Fosfato] (M)	pH	τ_1 (ns)	α_1	τ_2 (ns)	α_2	χ^2 global
0.4	5.04	3.06	-0.171	3.44	0.829	1.112
			-0.078		0.922	
			0.239		0.761	
	6.11	2.42	0.314	3.72	0.686	1.424
			-0.194		0.806	
			-0.164		0.136	
0.8	7.20	1.41	-0.041	3.87	0.959	1.114
			0.029		0.971	
			-0.113		0.887	
	5.14	2.46	-0.105	3.55	0.895	1.143
			-0.423		0.577	
			-0.052		0.948	
0.8	6.23	1.44	-0.276	3.80	0.724	1.242
			-0.243		0.757	
			-0.116		0.884	
	7.29	0.97	-0.041	3.81	0.959	1.090
			-0.237		0.763	
			-0.218		0.782	
			-0.141		0.859	
			-0.099		0.901	
			-0.092		0.908	
			-0.089		0.911	
			-0.071		0.929	
			-0.061		0.939	

III. Resultados y Discusión

Tabla III.9

Resultados de los análisis globales de los decaimientos de fluorescencia de disoluciones de TGIII ($2.3 \times 10^{-6} \text{M}$) en presencia de altas concentraciones de un aceptor/dador protónico a diferentes valores de pH ($\lambda_{\text{ex}} = 470 \text{ nm}$). Se indican los valores de los tiempos de vida, de los parámetros pre-exponenciales normalizados obtenidos a diferentes longitudes de onda de emisión (515, 525, 540 y 550 nm) y del parámetro χ^2 reducido.

[Fosfato] (M)	pH	τ_1 (ns)	α_1	τ_2 (ns)	α_2	χ^2 global	
0.4	5.04	2.97	0.092	3.56	0.908	1.201	
			0.176		0.824		
			0.338		0.662		
	6.11	1.78	1.78	0.399	3.77	0.601	1.151
				-0.113		0.887	
				-0.091		0.909	
-0.011				0.988			
7.20	0.56	0.56	0.019	3.89	0.981	1.188	
			-0.056		0.944		
			-0.044		0.956		
			-0.051		0.949		
			-0.032		0.968		
0.8	5.14	2.24	-0.185	3.52	0.815	1.217	
			-0.140		0.860		
			-0.041		0.959		
	6.23	1.24	1.24	0.015	3.77	0.985	1.283
				-0.125		0.875	
				-0.115		0.885	
-0.069				0.931			
7.29	0.20	0.20	-0.036	3.84	0.964	1.186	
			-0.154		0.846		
			-0.216		0.784		
			-0.147		0.853		
			-0.106		0.894		

Tabla III.10

Resultados de los análisis globales de los decaimientos de fluorescencia de disoluciones de TGIII ($3 \times 10^{-6} \text{M}$) en presencia de diferentes concentraciones de tampón fosfato a pH 6 ($\lambda_{\text{ex}} = 470 \text{ nm}$). Se indican los valores de los tiempos de vida, de los parámetros pre-exponenciales normalizados obtenidos a diferentes longitudes de onda de emisión (515, 525, 540 y 550 nm) y del parámetro χ^2 reducido.

[Fosfato] (M)	τ_1 (ns)	α_1	τ_2 (ns)	α_2	χ^2 global
0.005	3.17	0.292	3.94	0.708	1.134
		0.316		0.684	
		0.428		0.572	
		0.471		0.529	
0.01	3.19	0.280	3.96	0.720	1.225
		0.312		0.688	
		0.422		0.578	
		0.453		0.547	
0.025	3.06	0.190	3.94	0.810	1.176
		0.204		0.796	
		0.301		0.699	
		0.325		0.675	
0.05	2.99	0.053	3.86	0.947	1.192
		0.081		0.919	
		0.166		0.834	
		0.205		0.795	
0.1	2.79	0.084	3.89	0.916	1.206
		0.107		0.893	
		0.172		0.828	
		0.206		0.794	
0.2	2.54	0.065	3.81	0.935	1.123
		0.144		0.856	
		0.172		0.828	
		0.173		0.827	
0.3	2.42	-0.061	3.79	0.939	1.112
		-0.020		0.982	
		-0.007		0.993	
		-0.068		0.932	
0.4	2.17	-0.065	3.77	0.934	1.187
		-0.031		0.969	
		-0.069		0.931	
		-0.135		0.865	
0.5	1.99	-0.119	3.77	0.881	1.203
		-0.193		0.807	
		-0.082		0.918	
		-0.113		0.887	
0.6	1.71	-0.136	3.76	0.864	1.121
		-0.125		0.875	
		-0.066		0.933	
		-0.050		0.950	
0.8	1.36	-0.145	3.72	0.855	1.14
		-0.135		0.865	
		-0.082		0.918	
		-0.065		0.935	

III.2.3. ANÁLISIS GLOBAL COMPARTIMENTAL DEL SISTEMA TGIII EN PRESENCIA DE TAMPÓN FOSFATO

Como se ha comentado anteriormente, los experimentos de fluorescencia en estado estacionario de TGIII en presencia de diferentes concentraciones de tampón fosfato, en los que se produce un aumento 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 mencionado tampón, y que parece corresponder a un modelo de reacción en dos estados excitados como el que se muestra en la figura III.17.

El análisis global compartimental (GCA) de la superficie de los decaimientos fluorescentes de las especies involucradas en el proceso de transferencia protónica del estado excitado en presencia de un dador-aceptor protónico ha sido implementado por nuestro grupo (*Crovetto et al., 2004*) basándose en el programa general de análisis global ya existente, empleando el algoritmo de Marquardt (*Marquardt, 1963*). En el citado análisis, cualquiera de los parámetros variables puede mantenerse fijo durante el ajuste o dejarse flotar libremente, de manera que ajusten al valor óptimo.

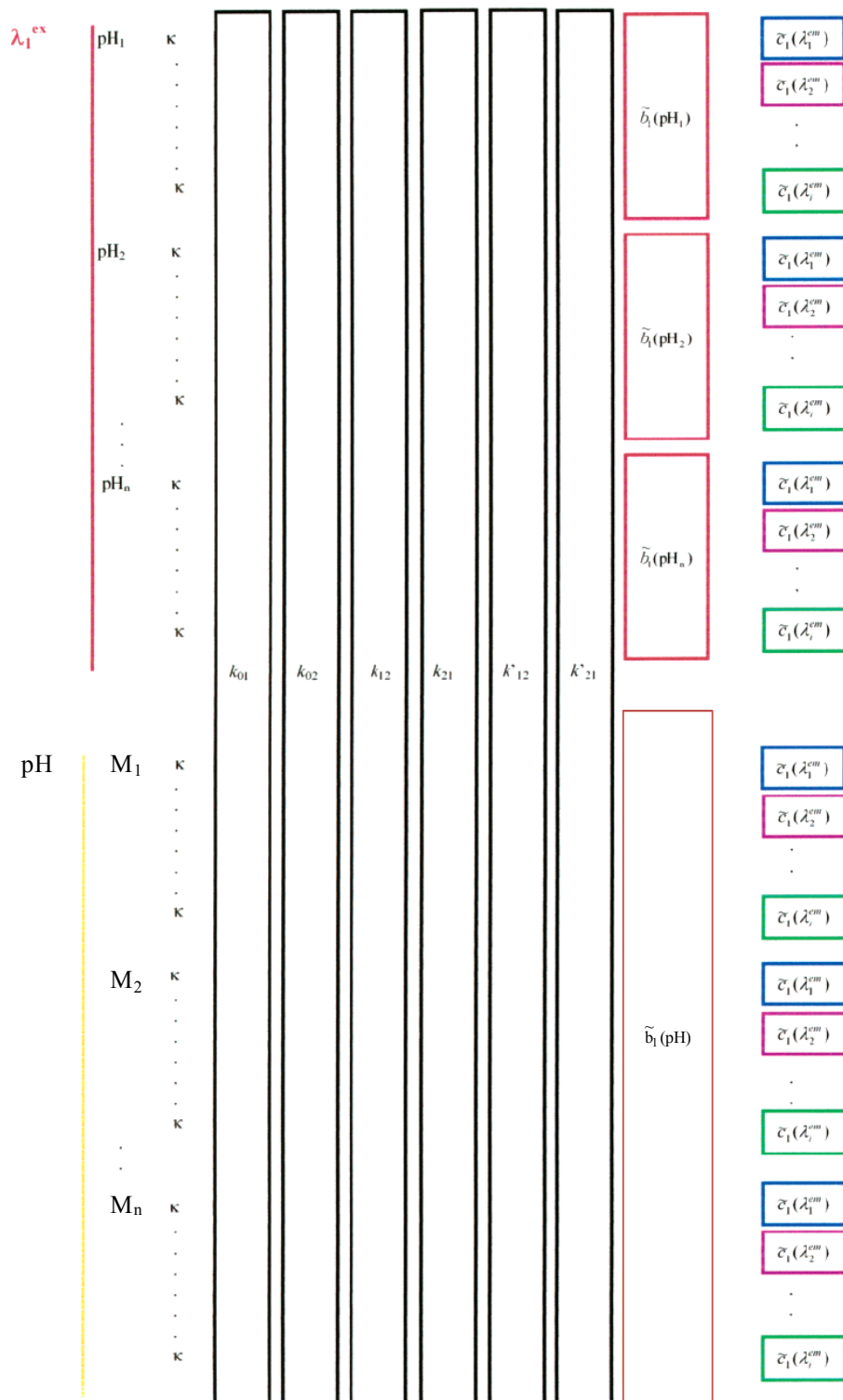
Como se ha descrito en el capítulo de Material y Métodos, si el sistema cinético es correcto, la aplicación del análisis global compartimental a la superficie de decaimientos de fluorescencia en función del pH, concentración de buffer C^{buff} , y longitudes de onda de excitación y emisión permite la 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 (*Boens et al., 2004*), explicadas en 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 $k_{01} + k_{21}$ 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.2.1. 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 analizó en esta sección mediante el análisis global compartimental es la unificación de las dos superficies tratadas en las secciones III.2.2.2.1 y III.2.2.2.2. De esta forma se juntan, como primer paso en un mismo análisis, los decaimientos de fluorescencia de disoluciones acuosas de TGIII recogidos en ausencia de tampón fosfato y en presencia de distintas concentraciones de tampón fosfato (0.4 y 0.8 M). Además, se incluyeron decaimientos de fluorescencia recogidos a un valor de pH fijo y diferentes concentraciones de tampón fosfato (0.005-0.8 M).

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 (*Boens et al., 2004*), por tanto se eliminaron del análisis aquellos decaimientos de naturaleza monoexponencial. Para dicho análisis se escogieron un total de 74 decaimientos biexponenciales de la superficie de decaimientos de fluorescencia explicada anteriormente, con excitación a dos longitudes de onda ($\lambda^{\text{ex}} = 470$ y 440 nm) y con emisión a cuatro longitudes de onda ($\lambda^{\text{em}} = 515, 525, 540$ y 550 nm).

III. Resultados y Discusión



Esquema III.4. Esquema de parámetros ligados en el análisis global compartimental para los decaimientos recogidos a i longitudes de onda de emisión y j longitudes de onda de excitación. Los parámetros recuadrados con el mismo color indican que han sido ligados, mientras que κ representa los factores locales escalados.

Los parámetros k_{01} , k_{02} , k_{21} , k_{12}^B , k_{21}^B , \tilde{b}_1 y \tilde{c}_1 se ligaron según el esquema III.4, 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 χ^2 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.

Todos los resultados de los valores de las constantes de velocidad obtenidos mediante la aplicación de la metodología del análisis global compartimental de la superficie de los decaimientos fluorescentes de TGIII medidos en función del pH, λ^{em} y λ^{ex} se muestran en la tabla III.11. El valor de k_{12} se mantuvo fijo a cero durante el ajuste, ya que al ir multiplicado por $[H^+]$, a los pH utilizados en estos experimentos su valor no influye en la reacción.

Tabla III.11

Valores para las constantes de velocidad k_{ij} obtenidas en el análisis global compartimental

k_{ij}	
$k_{01} (s^{-1}) \times 10^{-9}$	0.309 ± 0.004
$k_{02} (s^{-1}) \times 10^{-9}$	0.258 ± 0.001
$k_{12} (M^{-1} s^{-1}) \times 10^{-9}$	0*
$k_{21} (s^{-1}) \times 10^{-9}$	0.001 ± 0.001
$k'_{12} (M^{-1} s^{-1}) \times 10^{-9}$	0.139 ± 0.012
$k'_{21} (M^{-1} s^{-1}) \times 10^{-9}$	2.74 ± 0.11

* Se mantuvo constante durante el ajuste

Los valores estimados mediante análisis global compartimental para los parámetros $k_{01} = 3.09 \times 10^8 s^{-1}$, $k_{02} = 2.58 \times 10^8 s^{-1}$ y $k_{21} = 1.07 \times 10^7 s^{-1}$ están en

III. Resultados y Discusión

perfecta concordancia con los resultados obtenidos anteriormente en el caso de TGIII en ausencia de tampón fosfato (ver apartado III.2.2.2.1.).

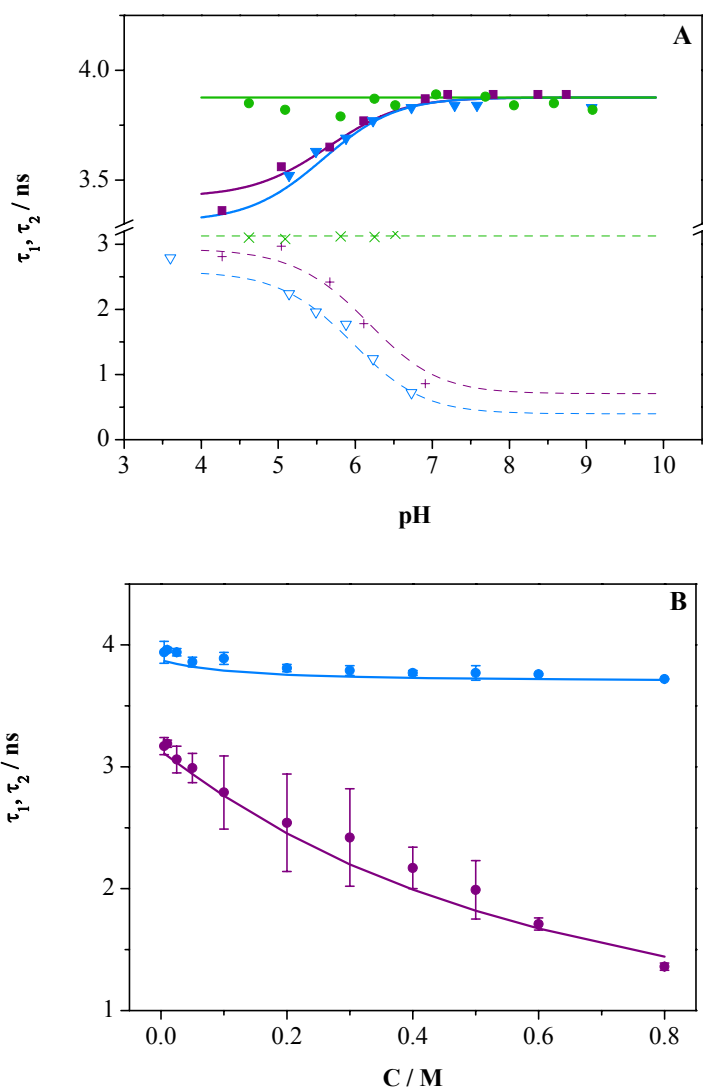


Figura III.20. (A) Dependencia del tiempo de decaimiento τ_1 y τ_2 con el valor del pH y de la concentración de tampón fosfato: τ_1 : (x) 0 M, (+) 0.4 M y (∇) 0.8 M; τ_2 : (●) 0 M, (■) 0.4 M y (\blacktriangledown) 0.8 M. (B) Dependencia de los tiempos de vida τ_1 (●) y τ_2 (●) *versus* distintas concentraciones de fosfato a pH 6.0. En ambas figuras los tiempos de decaimientos representados por las líneas curvas se han calculado con las ecuaciones II.14 y II.15 usando las constantes de velocidad de la tabla III.11 obtenidas del análisis global compartimental; y los puntos corresponden a los tiempos de vida recuperados a través de los análisis globales de los correspondientes decaimientos de fluorescencia.

Para comprobar la validez de las constantes de velocidad calculadas, se simularon los tiempos de decaimiento τ_1 y τ_2 usando los valores de las constantes obtenidas por el análisis global compartimental mostradas en la tabla III.11, en función de la concentración de tampón y valores de pH (curvas en la figura III.20). Estos tiempos se compararon con los tiempos de decaimiento experimentales recuperados a través de los análisis globales exponenciales de los correspondientes decaimientos de fluorescencia (puntos en la figura III.20). La excelente concordancia entre los tiempos de decaimiento simulados y los calculados mediante los ajustes de los decaimientos experimentales del TGIII se puede observar en la figura III.20.

De otra parte, del análisis global compartimental también se obtuvieron los valores de los parámetros espectrales de excitación \tilde{b}_1 (Tabla III.12). Como se observa en el esquema III.4, el factor \tilde{b}_1 se ligó en todos los experimentos con igual λ^{ex} y pH, ya que depende de estas condiciones experimentales.

Tabla III.12

Valores para los parámetros espectrales \tilde{b}_1 a diferentes longitudes de onda de excitación calculados mediante el análisis global compartimental.

<i>pH</i>	λ^{ex} (nm)	$\tilde{b}_1(\lambda^{ex}, pH)$
6	440	0.965 ± 0.082
7.58	440	0.262 ± 0.025
7.79	440	0.175 ± 0.019
5.49	470	0.743 ± 0.026
5.88	470	0.461 ± 0.036
6.73	470	0.180 ± 0.018
6.91	470	0.152 ± 0.016
7.20	470	0.121 ± 0.012
7.29	470	$(8.09 \pm 0.89) \times 10^{-4}$
7.79	470	0.057 ± 0.007

III. Resultados y Discusión

El análisis de dichos datos en lo que se refiere a la dependencia de $\tilde{b}_1(\lambda^{ex}, pH)$ con el pH mostró los resultados esperados, ya que el incremento del pH hace aumentar la concentración de dianión y por lo tanto $\tilde{b}_1(\lambda^{ex}, pH)$ disminuye.

Una evidencia cuantitativa más se puede obtener teniendo en cuenta que los valores de \tilde{b}_1 son funciones de ε_M y de ε_D a la longitud de onda de excitación, así como de las concentraciones de monoanión y dianión en el estado fundamental. Ya que esas concentraciones son, a su vez, función del pH y de la constante de disociación en el estado fundamental de TGIII, se puede definir:

$$\tilde{b}_1(\lambda^{ex}, pH) = \frac{\frac{\varepsilon_M}{\varepsilon_D} [H^+]}{\left(\frac{\varepsilon_M}{\varepsilon_D} [H^+] + K_M \right)} \quad (III.14)$$

El ajuste de la ecuación anterior mediante regresión no lineal por mínimos cuadrados a los datos de \tilde{b}_1 que figuran en la tabla III.12 proporciona como resultado valores de $\varepsilon_M / \varepsilon_D$. Estos valores que se indican en la tabla III.13 son concordantes con los obtenidos anteriormente por espectroscopia de absorción y que se recogen en las tablas III.1 y III.2.

Tabla III.13

Valores para los parámetros espectrales $\varepsilon_M / \varepsilon_D$ calculados con diferentes métodos.

λ (nm)	$\varepsilon_M / \varepsilon_D$ (compartimental)	$\varepsilon_M / \varepsilon_D$ (absorción)
440	1.91 ± 0.20	1.91 ± 0.09
470	0.82 ± 0.24	0.82 ± 0.07

Igualmente, en el esquema III.4 se muestra que \tilde{c}_1 , que depende de λ^{em} , se ligó a cada valor de λ^{em} . La tabla III.14 muestra los valores de los parámetros \tilde{c}_1 obtenidos

mediante análisis global compartimental. La dependencia de $\tilde{c}_1(\lambda^{em})$ con λ^{em} se puede explicar a partir de los espectros de fluorescencia en estado estacionario de la figura III.10. Así, a mayores longitudes de onda, existe relativamente más emisión originada por el monoanión que a las longitudes de onda más cortas, lo que origina mayores valores de $\tilde{c}_1(\lambda^{em})$.

Tabla III.14

Valores para los parámetros espectrales \tilde{c}_1 calculados con la longitud de onda de emisión de 515, 525, 540 y 550 nm.

$\lambda^{em} (nm)$	$\tilde{c}_1(\lambda^{em})$
515	0.269 ± 0.034
525	0.285 ± 0.031
540	0.354 ± 0.037
550	0.377 ± 0.015

III.3. APLICACIÓN COMO ETIQUETA FLUORESCENTE DE ADN

III.3.1. ETIQUETADO DE ÁCIDOS NUCLÉICOS CON EL DERIVADO SUCCINIMIDO DEL TGIII

III.3.1.1. Transaminación de ácidos nucleicos

Entre los variados procedimientos de modificación de ácidos nucleicos para posteriormente etiquetarlos con diversos fluoróforos de interés se ha escogido el de la transaminación, descrito en Material y Métodos (apartado II.2.1.1) La introducción de grupos aminos en los ácidos nucleicos implica una sencilla reacción, aplicable a todo tipo de ácidos nucleicos y a distintos fluoróforos y que utiliza reactivos e instrumentación económicos. La figura III.21 muestra un esquema general de la modificación.

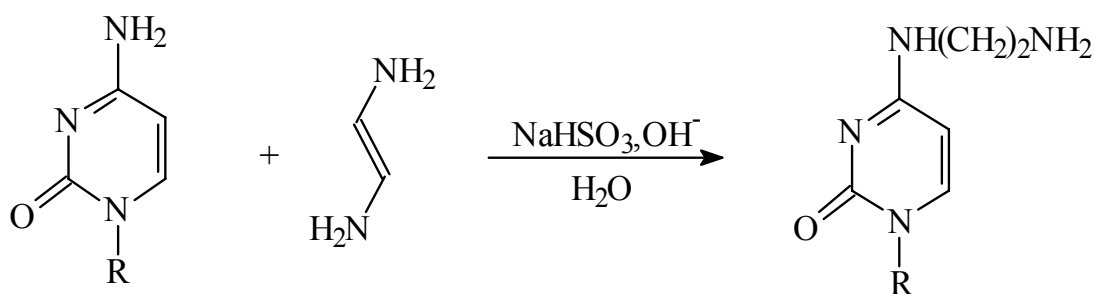


Figura III.21. Esquema general de la reacción utilizada en la modificación de ácidos nucleicos que contienen restos citosina para generar derivados transaminados.

Draper (1984) comprobó que se podía modificar el 95% de poli(C) en poli(aminoetil-C) después de someterlo a reacción durante 3 horas a 42 °C con etilendiamina 3 M y bisulfito sódico 2.5 M a pH 5.5. La extensión de la modificación depende fuertemente del pH, y así a pH <5.0 la citosina puede sufrir una desaminación y formar uracilo (*Shapiro et al., 1970; Draper, 1984*).

Jackson (1991) y *Talavera et al. (2000)* demostraron que a pH 6.0 la reacción de transaminación en poli(C) transcurre a una velocidad aceptable, de forma que hay una clara proporcionalidad entre el porcentaje de modificación y el tiempo de reacción, por

lo que resulta fácil el control de la extensión del porcentaje de modificación deteniendo la reacción mediante enfriamiento y diálisis. Sus resultados también muestran que tras 20 minutos de reacción se modifican, aproximadamente, el 5% de los residuos de citosina. En contraste, la modificación de ADN natural aumenta proporcionalmente con el tiempo sólo en los primeros estadios de la reacción, para luego alcanzar poco a poco una meseta, alcanzándose un 15% de modificación de los residuos citosina aproximadamente después de transcurrida 1 hora de reacción.

Algunos de los resultados anteriores se justifican en base a que poli(C) en disolución forma una estructura ordenada que, a pH neutro y concentración salina milimolar, no interactúa con la misma u otras cadenas (*Broido y Kearns, 1982; Pasman y Garcia-Blanco, 1996*). Sin embargo en cadenas de ADN parece que no es posible modificar cuantitativamente todos los residuos citosina en una sola etapa, debido a que la formación de estructuras secundarias y apareamiento de bases impiden la conversión de algunos restos citosina. No obstante, nuestro principal objetivo es marcar polinucleótidos con etiquetas fluorescentes, de forma que se obtengan sondas con buenas características de hibridación, y para esto se debe modificar sólo un pequeño porcentaje del total de bases (1-3%), ya que, como ha sido demostrado por Yguerabide et al. (1996), una relación de marca menor del 3% no afecta significativamente a la cinética de hibridación ni a la temperatura de fusión de la doble cadena poli(C)/poli(I).

En la modificación realizada en esta Memoria primero se reemplaza el grupo amino en la posición N⁴ de la citosina por una pequeña molécula orgánica que tiene un grupo amino primario mediante la técnica de Shapiro y Weigras (*Shapiro et al., 1970*) modificada por Talavera (*Talavera et al., 1997*). La principal ventaja de este procedimiento de modificación es la introducción de un “brazo espaciador” con una amina activa en un lugar determinado, de forma que a continuación se puede utilizar cualquier reactivo específico de aminas para etiquetar los ácidos nucleicos aminoetilados (*Yguerabide et al., 1996; Talavera et al., 1997*).

Tras realizar la reacción de transaminación explicada en el epígrafe II.2.1.1 de Material y Métodos se registró el espectro de absorción del derivado N⁴-aminoetilado del poli(C) para estudiar posibles cambios en sus características espectrales. Como se

III. Resultados y Discusión

observa en la figura III.22, la modificación de residuos citosina para obtener el derivado N⁴-aminoetilado y posteriormente etiquetado no altera el espectro de absorción UV-Vis de los polinucleótidos no modificados.

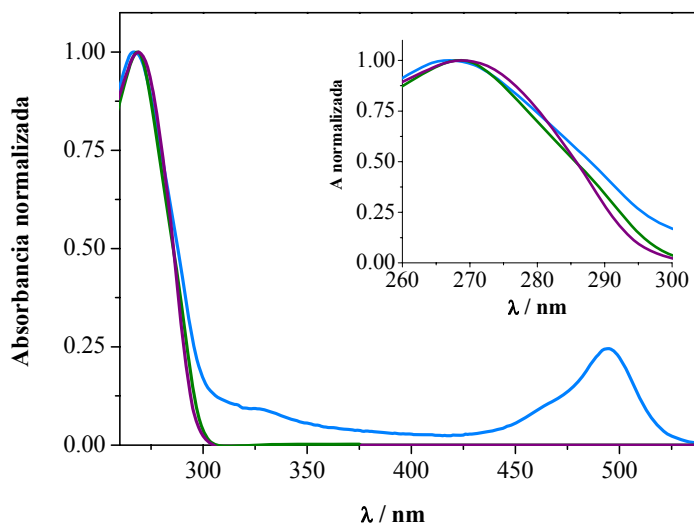


Figura III.22. Espectro de absorción UV-Vis normalizado de una disolución de poli(C) sin modificar (—), modificado por N⁴-transaminación (—), y tras el etiquetado con el éster succinimido del TGIII (—). En la figura insertada se muestra con mayor detalle estos espectros en el rango de absorción característico del poli(C).

III.3.1.2. Etiquetado fluorescente y extensión del marcaje

El poli(C) modificado con los grupos amina se etiquetó con el éster succinimido del TGIII (NHS-TGIII) siguiendo el método de *Reines y Schulman (1979)* descrito en Material y Métodos, epígrafe II.2.1.2. La figura III.23 muestra un esquema de dicho procedimiento.

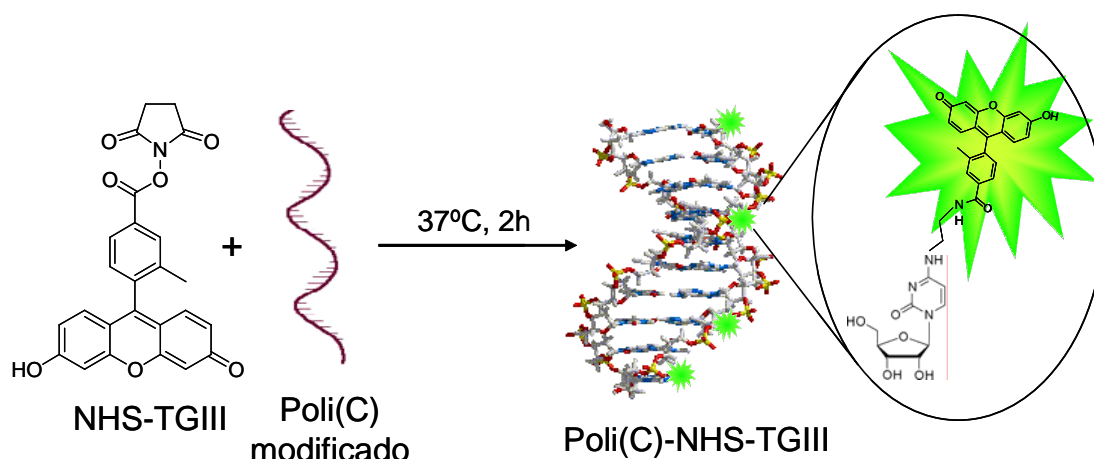


Figura III.23. Esquema de la reacción de etiquetado de poli(C) con NHS-TGIII

Es necesario destacar que tras la modificación del TGIII para la obtención de su éster succinimido y su posterior uso como etiqueta fluorescente, las especies prototrópicas presentes a pHs fisiológicos son diferentes. El éster succinimido se forma a partir del grupo ácido carboxílico del colorante, y la unión del fluoróforo a la biomolécula se hace a través de dicho grupo éster mediante la formación de un grupo amida con el residuo de amina primaria (ver figura III.23). Por tanto, la etiqueta fluorescente NHS-TGIII pierde uno de los grupos protonables con respecto al TGIII, por lo que a pH fisiológico las especies que estarán en equilibrio en las disoluciones acuosas serán la especie neutra y la especie aniónica del NHS-TGIII.

La extensión del etiquetado del poli(C) se determinó mediante espectroscopia de absorción. Como ha sido demostrado por *Yguerabide et al., (1996)* y se ha comentado en el epígrafe anterior, una relación de marca menor del 3% no afecta significativamente a la cinética de hibridación ni a la temperatura de fusión de la doble cadena poli(C)/poli(I); por tanto, durante la reacción de etiquetado se mantuvieron las condiciones experimentales necesarias para intentar que el porcentaje de marca usado se mantuviera por debajo de este valor.

La expresión usada para determinar la relación de etiquetado es la siguiente:

III. Resultados y Discusión

$$\frac{[NHS-TGIII]}{[poli(C)]} \% = \frac{A_{\lambda, \max} / \epsilon_{\lambda, \max}^{NHS-TGIII}}{A_{268} \frac{A_{\lambda, \max}}{\epsilon_{\lambda, \max}^{NHS-TGIII}} \epsilon_{268}^{NHS-TGIII} / \epsilon_{268}^{poli(C)}} \times 100 \quad (III.15)$$

donde $A_{\lambda, \max}$ y $A_{268 \max}$ son las absorbancias a la longitud de onda del máximo de absorción del fluoróforo (λ_{\max}) y 268 nm respectivamente, y $\epsilon_{\lambda, \max}^{NHS-TGIII}$, $\epsilon_{268}^{poli(C)}$ y $\epsilon_{268}^{NHS-TGIII}$ son los coeficientes de absorción molar del NHS-TGIII a λ_{\max} , del poli(C) a 268 nm y del fluoróforo a 268 nm, respectivamente. La ecuación III.15 proporciona la relación de marca entre el fluoróforo (expresado en concentración molar) y poli(C) expresado en concentración molar de bases citosina.

El coeficiente de absorción molar empleado para el poli(C) ($\epsilon_{268}^{poli(C)}$) fue de $5000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Yguerabide *et al.*, 1996). Los coeficientes de absorción molar de la etiqueta fluorescente fueron calculados para el éster succinimido del TGIII en el mismo medio en el que se realizaron los experimentos de hibridación (20 mM TRIS-HCl, EDTA 1 mM y 100 mM NaCl a pH 7.5) mediante la ley de Beer (figura III.24). El valor obtenido para $\epsilon_{268}^{NHS-TGIII}$ fue de $10220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y para $\epsilon_{\lambda, \max}^{NHS-TGIII}$ fue de $68960 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

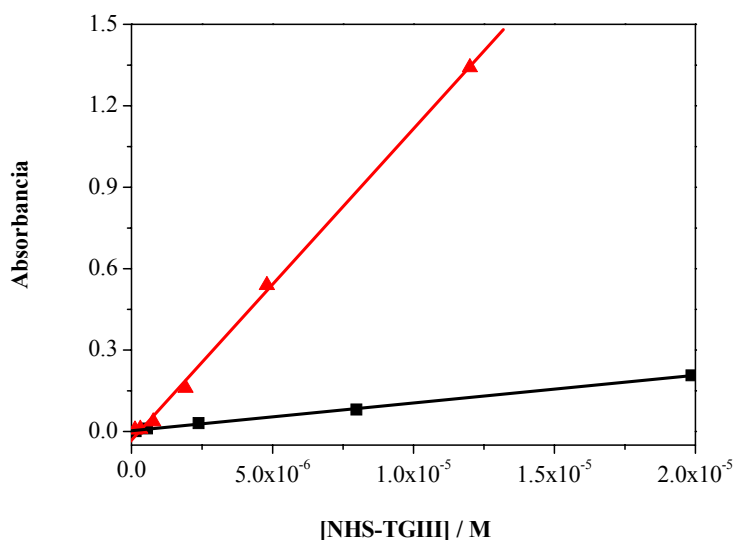


Figura III.24. Ajustes lineales *A versus* [NHS-TGIII] de los valores de absorbancia de disoluciones de diferentes concentraciones de NHS-TGIII en tampón de hibridación (20 mM TRIS-HCl, EDTA 1 mM y 100 mM NaCl a pH 7.5) a las longitudes de onda de 268 nm (—) y 490 nm (—).

El porcentaje de etiqueta de la muestra usada en este trabajo se calculó con los datos de absorción de la figura III.22 (espectro azul) y la ecuación III.15, obteniéndose un resultado del 2.1%, no afectándose significativamente, como se ha expuesto anteriormente, la cinética de hibridación de poli(C)/poli(I) (*Yguerabide et al., 1996*).

A continuación se analizaron las características espectrales del poli(C) etiquetado con el éster de succinimido del TGIII (NHS-TGIII) utilizado en este estudio. El máximo de absorción del poli(C) prácticamente no se modifica tras el etiquetado con el NHS-TGIII, como puede observarse en la figura III.22. En la figura III.25 se representan los espectros de emisión normalizados, obtenidos con una longitud de onda de excitación de 490 nm, de disoluciones de poli(C)-NHS-TGIII, poli(C)-NHS-TGIII/pol(i), y TGIII libre, todos ellos en tampón de hibridación 20 mM TRIS-HCl, EDTA 1mM y 100 mM NaCl a pH 7.5. Como se puede observar, aunque no hay cambios importantes en la forma de los espectros, el correspondiente al poli(C)-NHS-TGIII está algo desplazado hacia el rojo con respecto al espectro del TGIII libre. Asimismo, el espectro del poli(C)-NHS-TGIII/pol(i), a su vez, está ligeramente desplazado hacia longitudes de onda mayores con respecto al del poli(C)-NHS-TGIII sin hibridar. Se debe tener en cuenta que la estructura del TGIII libre en disolución es diferente a la del TGIII cuando está en forma de éster de succinimido, lo que podría producir esa ligera variación en el máximo de emisión. Las pequeñas diferencias en los espectros de emisión del poli(C)-NHS-TGIII antes y después de la hibridación con poli(I) se podría en principio atribuir a que la cercanía de grupos cargados presentes en polinucleótidos genere un microambiente distinto en los alrededores del fluoróforo, produciendo este ligero desplazamiento del máximo.

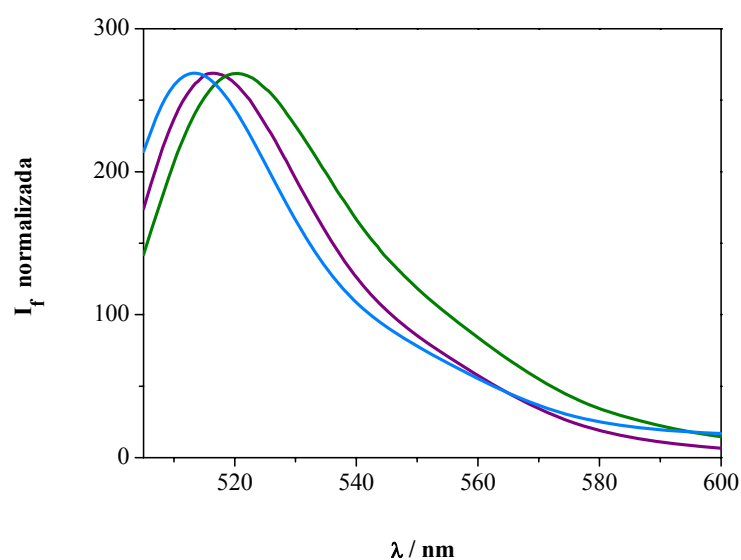


Figura III.25. Espectros de emisión en tampón 20 mM TRIS-HCl, EDTA 1mM y 100 mM NaCl a pH 7.5 de disoluciones de Poli(C)-NHS-TGIII (—), Poli(C)-NHS-TGIII hibridado con poli(I) (—), y TGIII (—). La longitud de onda de excitación fue de 490 nm. El porcentaje de etiquetado de la sonda fue del 2.1%.

III.3.2. APLICACIÓN DEL NHS-TGIII COMO SONDA FLUORESCENTE ÚTIL EN LA DETECCIÓN DE LA HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLÉICOS EN MEDIOS HOMOGÉNEOS

III.3.2.1. Variación de los parámetros fluorescentes del poli(C)-NHS-TGIII tras la hibridación con poli(I)

Brimacombe y Reese (1966) estudiaron como se afectaban las características de hibridación en poli(C) tras la modificación de los grupos que intervienen en la formación de los enlaces de hidrógeno, concluyendo que la alteración de residuos citosina en la posición N⁴ conlleva una disminución de 0.5 °C en la temperatura de fusión de la doble cadena poli(C)/poli(I) por cada 1% de modificación. Asimismo, el efecto específico que la transaminación y el marcaje con fluoresceína o rodamina en poli(C) tiene sobre las características de hibridación de este último con el poli(I) ha sido determinado por *Jackson (1991)*. Dicho autor estudió la desnaturalización térmica de los híbridos poli(C)/poli(I) mediante espectroscopia de absorción UV, concluyendo que la estabilidad de la asociación de fluoróforo-poli(C) con poli(I) es muy similar a la que presenta poli(C) sin modificar, cuando la relación fluoróforo/poli(C) es menor del 5%.

Basándonos en todo lo anterior, en esta Memoria se ha investigado la variación que se produce en los espectros de emisión de homopolinucleótidos sintéticos de citosina modificada (poli(C)) y marcada con el fluoróforo NHS-TGIII, cuando la sonda obtenida hibrida con su cadena complementaria (poli(I)). La figura III.26 muestra los cambios en la intensidad de fluorescencia y el ligero desplazamiento en el espectro de emisión cuando se valora el poli(C)-NHS-TGIII con poli(I). La fluorescencia disminuye progresivamente con el incremento de la concentración de poli(I) hasta que se alcanza la saturación a una relación molar alrededor de 1:1 en bases de nucleótidos de poli(C) y poli(I). Para llevar a cabo las experiencias se hicieron distintas adiciones de 10 µL de una disolución madre de poli(I) y se mantuvo la disolución en agitación y a temperatura controlada (20 °C) durante diez minutos antes de registrar el espectro de fluorescencia. Los espectros se corrigieron por el efecto de dilución.

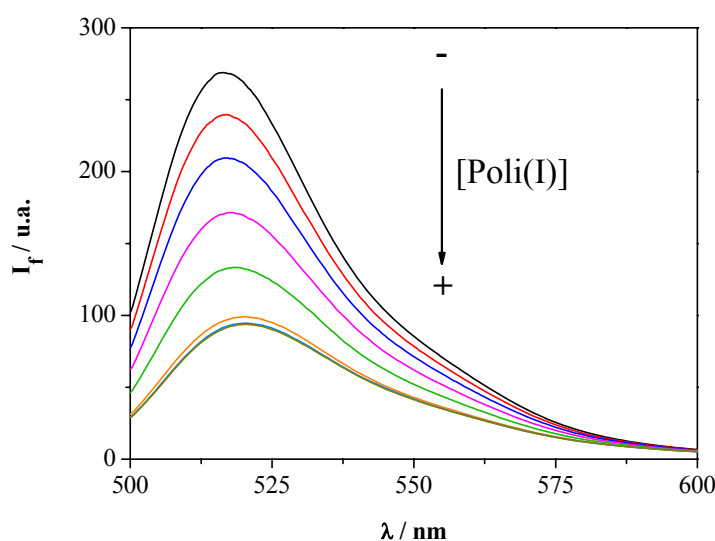


Figura III.26. Espectros de emisión ($\lambda_{exc} = 490 \text{ nm}$) de una disolución de poli(C)-NHS-TGIII en tampón de hibridación con una concentración inicial de $4.68 \times 10^{-5} \text{ M}$ y diferentes concentraciones de poli(I) en el rango de 0 a $5.86 \times 10^{-5} \text{ M}$.

Como se observa en la figura III.26, la intensidad de fluorescencia del máximo de poli(C)-NHS-TGIII disminuye alrededor de un 68% a concentraciones saturantes de poli(I). Este cambio en la intensidad de fluorescencia es independiente de la concentración inicial de poli(C)-NHS-TGIII, ya que el mismo efecto se ha observado al valorar distintas concentraciones de poli(C) ($2.5 \times 10^{-5} \text{ M}$, $4.68 \times 10^{-5} \text{ M}$ y $7 \times 10^{-5} \text{ M}$).

Como se ha demostrado previamente, debido a la alta afinidad en la hibridación entre poli(C) y poli(I), la fracción de bases apareadas de poli(C) aumenta linealmente con la concentración de poli(I) (Yguerabide *et al.*, 1996). Ya que no ocurre un *quenching* adicional a relaciones poli(I)/poli(C)-NHS-TGIII mayores que 1, se puede suponer que la disminución de la intensidad de fluorescencia tras la hibridación es proporcional a la cantidad de bases apareadas. Por tanto, se puede utilizar la siguiente expresión para calcular el porcentaje de poli(C)-NHS-TGIII que está hibridado:

$$\%H = [(I_0 - I) / (I_0 - I_\infty)] \times 100 \quad (\text{III.16})$$

en donde I_0 e I_∞ son las intensidades de fluorescencia de poli(C)-NHS-TGIII a concentración cero y concentraciones saturantes de poli(I), respectivamente.

La figura III.27 muestra que el tanto por ciento de hibridación aumenta linealmente con la concentración de poli(I) y satura aproximadamente a una relación 1:1 de poli(I)/poli(C). Este resultado apoya la idea de que la intensidad de fluorescencia disminuye linealmente con la fracción de poli(C)-NHS-TGIII que está hibridada.

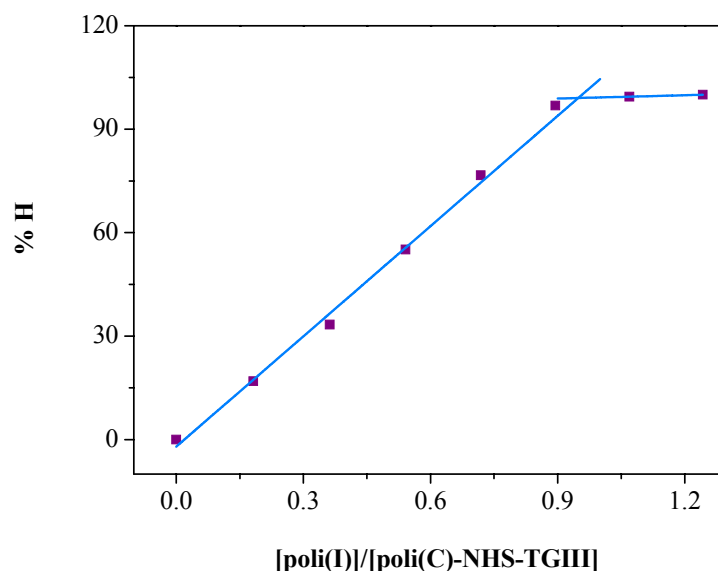


Figura III.27. Representación del porcentaje de hibridación poli(C)-NHS-TGIII con poli(I) frente a la relación poli(I)/poli(C)-NHS-TGIII. Las concentraciones de poli(C)-NHS-TGIII fueron corregidas por el efecto de la dilución durante la valoración.

Al objeto de estudiar también el efecto de la hibridación en el equilibrio anión-neutro de la etiqueta fluorescente, se ha valorado la acidez del colorante. Para ello se obtuvieron las intensidades de fluorescencia correspondientes al poli(C)-NHS-TGIII y al poli(I)/poli(C)-NHS-TGIII en disoluciones tamponadas (20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl) y no tamponadas (1 mM EDTA, 100 mM NaCl) a diferentes valores de pH. La figura III.28 muestra como el pK_a aparente del conjugado de NHS-TGIII cambia de 6.71 (cuando está en la cadena sencilla) a 7.31 (cuando está en la doble cadena). Así, en el intervalo del pH fisiológico la concentración relativa de moléculas de NHS-TGIII en su forma aniónica es menor en poli(I)/poli(C)-NHS-TGIII que en poli(C)-NHS-TGIII. El desplazamiento en el pK_a aparente puede atribuirse al incremento de la densidad de carga local negativa de los grupos fosfatos en los polinucleótidos hibridados, haciendo que sea más difícil que la forma neutra se pueda desprotonar y formar el anión.

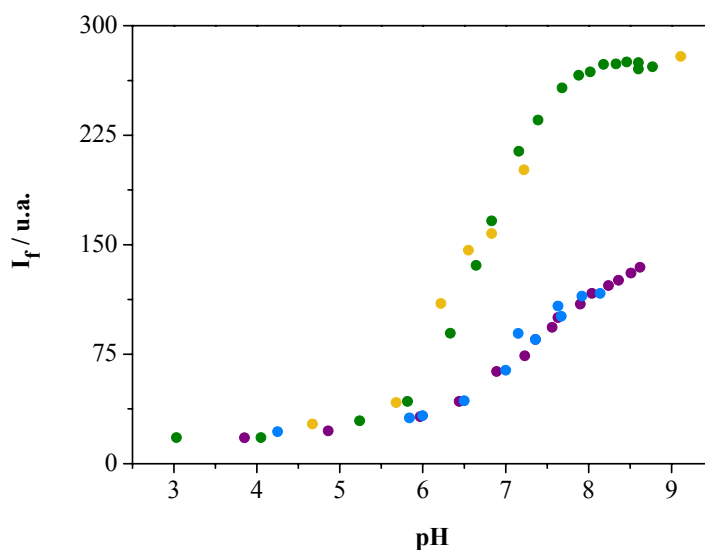


Figura III.28. Cambios de la intensidad de fluorescencia en el estado estacionario en función del pH para poli(C)-NHS-TGIII (●) y poli(I)/poli(C)-NHS-TGIII (●), ambos en tampón Tris-HCl 20 mM, EDTA 1 mM, NaCl 100 mM; y poli(C)-NHS-TGIII (●) y poli(I)/poli(C)-NHS-TGIII (●), ambos en disoluciones no tamponadas (EDTA 1 mM, NaCl 100 mM). (Longitud de onda de excitación de 490 nm; longitud de onda de emisión de 515 nm; concentración de poli(C)-NHS-TGIII 4.68×10^{-5} M).

Tal y como se comentó anteriormente y se muestra en la figura III.25, el espectro de emisión ($\lambda_{\text{ex}} = 490$ nm) de la cadena hibridada presenta un ligero desplazamiento del espectro hacia el rojo en comparación con la cadena sin hibridar, de manera similar a la fluoresceína y a los Tokyo Green tras la aparición de la especie monoaniónica y neutra, respectivamente (Álvarez-Pez *et al.*, 2001; Crovetto *et al.*, 2007; Paredes *et al.*, 2009). Para corroborar la influencia del desplazamiento del equilibrio anión-neutro en la hibridación, se han registrado los espectros de emisión de disoluciones a pH 7.35 de poli(C)-NHS-TGIII y poli(I)/poli(C)-NHS-TGIII con excitación a 440 nm. A esta longitud de onda la absorbancia de la forma neutra es mayor que la del anión, lo que permite excitar preferentemente a la forma neutra. Como se puede observar en la figura III.29, la intensidad de fluorescencia alrededor de 550 nm es mayor cuando poli(C)-NHS-TGIII hibrida con poli(I). Esto quiere decir que a pH 7.35 hay mayor relación neutro/anión cuando el colorante está en la doble cadena, lo que significa que en una disolución a pH 7.35 la hibridación con poli(I) aumenta el pK_a

aparente del conjugado de NHS-TGIII, aumentando la concentración de su forma neutra.

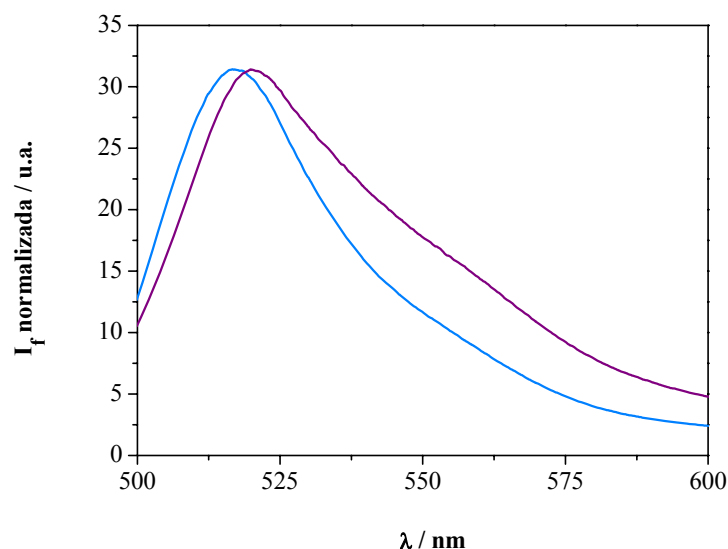


Figura III.29. Espectros de emisión normalizados, con excitación a 440 nm, de poli(C)-NHS-TGIII (—) y de la doble cadena poli(I)/poli(C)-NHS-TGIII (—) en tampón de hibridación a pH 7.35.

Al objeto de profundizar en la interpretación del mecanismo de *quenching* de fluorescencia observado en la sonda desarrollada, se han realizado estudios complementarios mediante espectroscopia de fluorescencia con resolución temporal. Las experiencias preliminares se complementaron con otras en las que se midieron los tiempos de vida de fluorescencia del fluoróforo etiquetado en poli(C) en diferentes condiciones.

Con esta finalidad se recogieron los decaimientos de disoluciones de poli(C)-NHS-TGIII y poli(I)/poli(C)-NHS-TGIII a pH 7.35 y 9.10, y excitación 488 nm. A pH 7.35 la mejor función de ajuste fue monoexponencial para poli(C)-NHS-TGIII y biexponencial para poli(I)/poli(C)-NHS-TGIII, mientras que a pH 9.10 la mejor función de ajuste fue monoexponencial en ambos casos, con un tiempo de vida recuperado de 4.03 ns.

III. Resultados y Discusión

Tal y como se describió en la sección de Material y Métodos, la señal de fluorescencia se detectó con el polarizador de emisión situado a 54.7° con respecto al de excitación, al objeto de eliminar los efectos de la difusión rotacional de los fluoróforos en los decaimientos de fluorescencia. Esta precaución es particularmente necesaria cuando el fluoróforo se encuentra enlazado a una macromolécula, ya que en estos casos si la velocidad de emisión tiene un valor similar al de la velocidad de despolarización debida al movimiento Browniano de las moléculas excitadas, aparece la contribución de un término exponencial con un tiempo de vida de aproximadamente la mitad del verdadero tiempo de vida del fluoróforo, que conduciría a una incorrecta interpretación de la ley de decaimiento (Shinitzky, 1972).

La tabla III.15 recoge los tiempos de vida recuperados junto con sus pre-exponenciales normalizados, obtenidos mediante análisis global (con los tiempos de vida ligados) de 6 decaimientos con 20000 cuentas en su máximo cada uno. Dado que los valores de tiempo de vida obtenidos son muy parecidos a los valores recuperados para las formas neutra y aniónica de otro fluoróforo de la familia de los Tokyo Green (TGII) en disolución (*Paredes et al., 2009*), y que las estructuras químicas y formas prototrópicas del TGII y del colorante etiquetado en esta Memoria son similares, se puede asumir que el tiempo de vida mayor corresponde a la forma aniónica, mientras que el tiempo de vida menor corresponde a la forma neutra del NHS-TGIII etiquetado.

Tabla III.15

Tiempos de vida, coeficientes pre-exponenciales normalizados y tiempo de vida medio correspondientes a disoluciones de poli(C)-NHS-TGIII y de éste totalmente hibridado con poli(I) a pH 7.35.

<i>Muestra</i>	τ_1 (ns)	α_1	τ_2 (ns)	α_2	τ_{med} (ns)
poli(C)-NHS-TGIII	4.03	1.00			4.03
Poli(I)/poli(C)-NHS-TGIII	4.03	0.83	0.73	0.17	3.47

Sobre esta base y haciendo uso de los pre-exponenciales normalizados de los tiempos de vida (ver tabla III.15), se puede considerar que la proporción de la forma neutra aumenta al pH fisiológico, debido al desplazamiento del pK_a hacia valores más altos cuando poli(C)-NHS-TGIII hibrida con poli(I). Esto provoca la disminución del valor medio del tiempo de vida, lo que a su vez hace que descienda la intensidad de fluorescencia en estado estacionario. Simples cálculos muestran que teniendo en cuenta el pK_a de 7.3 de poli(I)/poli(C)-NHS-TGIII, a pH 7.35 se obtiene un cociente de 1.10 para la relación anión/neutro de NHS-TGIII. Considerando que la relación de los coeficientes de absorción molar de las formas aniónica y neutra de disoluciones de un derivado muy similar, TGII, es de 4.34 a 488 nm (*Paredes et al., 2009*), la relación entre moléculas excitadas de las formas aniónica y neutra debería ser 4.77, lo que resulta concordante con la relación de 4.88 calculada a partir de los factores pre-exponenciales normalizados (abundancia) de los tiempos de vida.

Por otra parte, en la figura III.28 también se puede observar una disminución de la fluorescencia alrededor del 48% a pH 9, una región de pH en donde el desplazamiento del pK_a no influye en la relación anión/neutro, como demuestra el tiempo de vida único que presenta tanto el poli(C)-NHS-TGIII como el poli(C)-NHS-TGIII hibridado con poli(I). Dado que los citados tiempos de vida de poli(C)-NHS-TGIII y de poli(I)/poli(C)-NHS-TGIII a valores altos de pH son los mismos (alrededor de 4.03 ns), debe ocurrir un *quenching* estático mediante el cual las moléculas de NHS-TGIII próximas a poli(I) son desactivadas de forma instantánea. De nuevo mediante simples cálculos, si se adiciona este *quenching* estático (de un valor porcentual aproximado del 48%) a la disminución porcentual del valor medio del tiempo de vida a pH 7.35 (alrededor del 14%), se obtiene un 62% de disminución total de la intensidad de fluorescencia, que resulta bastante concordante con el 68% de disminución en la intensidad de fluorescencia en estado estacionario que se puede observar en la figura III.26 a concentraciones saturantes de poli(I).

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:

- Se ha propuesto la síntesis del ácido 4-(6-hidroxi-3-oxo-3H-xanten-9-ilo)-3-metil-benzoico (**Tokyo Green III**), un nuevo colorante fluorescente de la familia de los nuevos derivados de la fluoresceína, Tokyo Green.
- El precursor del TGIII, el 4-(6-hidroxi-3-oxo-3H-xanten-9-il)-3-metil-benzoico metil éster puede emplearse como sonda fluorescente intracelular, ya que los grupos ésteres muestran una mayor permeabilidad celular.
- Además, el derivado ácido carboxílico puede modificarse con facilidad introduciendo grupos reactivos específicos a determinados grupos funcionales, como por ejemplo la incorporación de ésteres de succinimido como grupos reactivos de aminas primarias.

Tras su síntesis, se ha descrito el equilibrio ácido-base a pHs cercanos al fisiológico en estado fundamental del fluoróforo TGIII a través de medidas absorciométricas y fluorimétricas en estado estacionario. Con respecto a estos estudios se pudo concluir:

- Se ha establecido la presencia de dos especies prototrópicas diferentes en el intervalo de pH fisiológico: monoaniónica y dianiónica. Mediante la aplicación de la metodología de ajustes no lineales por mínimos cuadrados, se ha calculado la constante ácido-base implicada en el mencionado equilibrio. El valor del pK_a obtenido en disolución acuosa fue de 6.20 ± 0.03 .
- Asimismo, empleando la metodología de análisis utilizada, se obtuvieron los perfiles espectrales de absorción de las dos especies prototrópicas implicadas, así como los coeficientes de absortividad molar de cada una de ellas.
- En el estudio de la influencia de la fuerza iónica sobre el valor del pK_a^{app} aparente del TGIII se concluyó que el valor del pK_a^{app} no varia

IV. Conclusiones

apreciablemente con el aumento de la fuerza iónica, lo que hace que sea un fluoróforo prometedor para uso intracelular.

- Se analizó 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 dos especies prototrópicas.

También se ha estudiado el efecto de un aceptor/dador protónico, como es el sistema tampón fosfato, sobre el equilibrio ácido-base, así como su capacidad para promover la reacción de transferencia protónica en el estado excitado entre las especies monoaniónica y dianiónica del colorante. Sobre este punto se han establecido las siguientes conclusiones:

- Pudo concluirse que en ausencia de aceptor/dador adecuado no se produce reacción de intercambio protónico en el estado excitado entre las especies monoaniónica y dianiónica del TGIII. Por lo tanto, en estas condiciones las curvas de intensidad de fluorescencia frente al pH aportan información sobre el pK_a del estado fundamental.
- La adición del sistema tampón fosfato no tiene efectos significativos sobre los espectros de absorción, por lo tanto, la adición del mencionado tampón no modifica el estado fundamental del TGIII.
- En cambio, la adición de concentraciones crecientes del aceptor/dador protónico origina una mayor contribución de la especie dianiónica en los espectros de emisión. Esto demuestra que las especies del tampón se comportan como aceptores y dadores de protones adecuados en la transferencia protónica en el estado excitado de las especies monoaniónica y dianiónica del colorante.
- Se empleó el análisis global compartimental para el estudio de la cinética de la reacción de transferencia protónica en el estado excitado entre las especies monoaniónica y dianiónica del TGIII promovida por tampón fosfato. 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 $k_{01} = (0.309 \pm 0.004) \times 10^9 \text{ s}^{-1}$ (correspondiendo a un tiempo de vida de la especie monoaniónica de $(3.236 \pm 0.004) \times 10^{-9} \text{ ns}$, $k_{02} = (0.258 \pm 0.001) \times 10^9 \text{ s}^{-1}$ (lo que representa un tiempo de vida de la especie dianiónica de $(3.876 \pm 0.001) \times 10^{-9} \text{ ns}$, $k_{21} = (0.001 \pm 0.001) \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $k_{12}^B = (0.139 \pm 0.012) \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $k_{21}^B = (2.74 \pm 0.11) \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

- 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.

Posteriormente al estudio fotofísico del colorante ácido carboxílico (TGIII) se ha sintetizado por primera vez el derivado éster succinimido, el 2,5 dioxopirrolidin-1-il-4-(3-hidroxi-6-oxo-6H-xanten-9-il)-3-metilbenzoato (NHS-TGIII), y se ha estudiado su aplicación en el etiquetado de cadenas sencillas de ácidos nucleicos para la detección de la hibridación de ADN en medios homogéneos. Del citado estudio podemos obtener las siguientes conclusiones:

- Se ha demostrado que el éster de succinimido de TGIII es idóneo para el etiquetado de biomoléculas que posean grupos aminas en su estructura, mediante la formación de enlaces covalentes muy estables. Como ejemplo, se ha empleado en el etiquetado del homopolímero ácido polirribocitidílico (Poli(C)).
- El NHS-TGIII se presenta como una sonda útil en la detección de la hibridación de ácidos nucleicos en medios homogéneos. La detección y cuantificación de la secuencia específica de ADN se realiza con gran

IV. Conclusiones

sensibilidad estudiando el descenso en la intensidad de fluorescencia del colorante etiquetado tras la hibridación con su cadena complementaria.

- Debido a la simplicidad del método utilizado en esta Memoria se presenta la posibilidad de realizar un nuevo ensayo para la detección de ácidos nucleicos con grandes ventajas frente a los usados habitualmente en la detección de ADN o ARN.

Bibliografia



- Abdel-Shafi, A.A., *Spectrochim. Acta*, **57**, 1819-1828 (2001).
- Abel, A.P.; Weller, M.G.; Duveneck, G.L.; Ehrat, M.; Widmer, H.M., *Anal. Chem.*, **68**, 2905-2912 (1996).
- Abler, J.K.; Reddy, K.R.; Lee, C.S., *J. Chromatogr. A.*, **759**, 139-147 (1977).
- Acuña, A.U.; Amat, F.; Catalán, J.; Costela, A.; Figuera, J.M.; Muñoz, J.M., *Chem. Phys. Lett.*, **132**, 567-569 (1986a).
- Acuña, A.U.; Costela, A.; Muñoz, J.M., *J. Phys. Chem.*, **90**, 2807-2808 (1986b).
- Acuña, A.U.; Amat-Guerri, F.; Catalán, J.; Costela, A.; Dhoula, A.; Figuera, J.M.; Florido, F.; Sastre, R., *Chem. Phys. Lett.*, **187**, 98-101 (1991).
- Agmon, N., *J. Chem. Phys.*, **88**, 5639-5642 (1988).
- Agmon, N., *J. Phys. Chem. A*, **109**, 13-35 (2005).
- Ainsworth, S., *J. Phys. Chem.*, **65**, 1968-1972 (1961).
- Álvarez-Pez, J.M.; Talavera, E.M.; Afkir, M.; Ballesteros, L.; Bermejo, R., *Spectr. Biol. Mol.*, **1**, 253-254 (1997).
- Álvarez-Pez, J.M., Ballesteros, L.; Talavera, E.M.; Yguerabide, J., *J. Phys. Chem. A.*, **105**, 6320-6332 (2001).
- Allen, D.J.; Benkovic, S.J., *Biochem.*, **28**, 9586-9593 (1989).
- Allen, D.J.; Darke, P.L.; Benkovic, S.J., *Biochem.*, **28**, 4601-4607 (1989).
- Al-Soufi, W.; Novo, M.; Mosquera, M., *Appl. Spectrosc.*, **55**, 630-636 (2001).
- Ameloot, M.; Hendrickx, H., *Biophys. J.*, **44**, 27-38 (1983).
- Ameloot, M.; Beechem, J. M.; Brand, L., *Chem. Phys. Lett.*, **129**, 211-219 (1986).
- Ameloot, M.; Boens, N.; Andriessen, R.; Van den Bergh, V.; De Schryver, F.C., *J. Phys. Chem.*, **95**, 2041-2047 (1991).
- Ameloot, M., *Methods Enzymol.*, **210**, 237-279 (1992a).
- Ameloot, M.; Boens, N.; Andriessen, R.; Van den Bergh, V.; De Schryver,

V. Bibliografía

- F.C., *Methods Enzymol.*, **210**, 314-340 (1992b).
- Anderson, D.H., *Lect. Notes in Biomath.*, **50**, 157-170 (1983).
 - Andriessen, R.; Boens, N.; Ameloot, M.; De Schryver, F.C., *J. Phys. Chem.*, **95**, 2041-2047 (1991).
 - Ansorge, W.; Sproat, B.; Stegemann, J.; Schwager, C.; Zenke, M., *Nucleic Acids Res.*, **15**, 4593-4602 (1987).
 - Arnaut, L.G.; Formosinho, S.J., *J. Phys. Chem.*, **92**, 685-691 (1988).
 - Arnaut, L.G.; Formosinho, S.J., *J. Photochem. Photobiol. A.*, **75**, 1-20 (1993).
 - Arnott, S.; Hukins, P.; Dover, S.; Fuller, W.; Hodgson, A., *J. Mol. Biol.*, **81**, 107-122 (1973).
 - Artom, C.; Sarzana, G.; Segré, E., *Arch. Int. Physiol.*, **47**, 245-276 (1938).
 - Azadnia, A.; Campbell, R.; Sharma, M., *Anal. Biochem.*, **218**, 444-448 (1994).
 - Azek, F.; Grossiord, C.; Joannes, M.; Limoges, B.; Brossier, P., *Anal. Biochem.*, **284**, 107-113 (2000).



- Badea, M.G.; Brand, L., *Methods Enzymol.*, **61**, 378-425 (1979).
- Bajzer, V.; Prendergast, F.G., *Methods Enzymol.*, **210**, 201-204 (1992).
- Balcerowska, G.; Siuda, R., *Appl. Surf. Sci.*, **83**, 144-145 (1999).
- Balón, M.; Hidalgo, J.; Guardado, P.; Muñoz, M.A.; Carmona, C.J., *Chem. Soc. Perkin Trans.*, **2**, 85-91 (1993).
- Balón, M.; Muñoz, M.A.; Hidalgo, J.; Carmona, M.C.; Sánchez, M., *J. Photochem.*, **36**, 193-204 (1987).
- Banerjee, D.; Pal, S.K., *J Phys. Chem. B.*, **111**, 5047-5052 (2007).
- Bard, Y., "Nonlinear Parameter Estimation", Academic Press (1974).
- Bardez, E.; Boutin, P.; Valeur, B., *Chem. Phys. Lett.*, **191**, 142-148 (1992).
- Bardez, A.; Chatelain, A.; Larrey, B.; Valeur, B., *J. Phys. Chem.*, **98**, 2357-

-
- 2366 (1994).
- Bardez, E., *Isr. J. Chem.*, **39**, 319-332 (1999).
 - Basañez, G.; Shinnar, A.E.; Zimmerberg, J., *FEBS Lett.*, **532**, 115-120 (2002).
 - Becquerel, H., *Acad. Sci.*, **122**, 420-421 (1896).
 - Beechem, J.M.; Knutson, J.R.; Ross, J.B.A.; Turner, B.W.; Brand, L., *Biochem.*, **22**, 6054-6058 (1983).
 - Beechem, J.M.; Ameloot, M.; Brand, L., *Anal. Instrum.*, **14**, 379-402 (1985a).
 - Beechem, J.M.; Ameloot, M.; Brand, L., *Chem. Phys. Lett.*, **120**, 466-472 (1985b).
 - Beechem, J.M.; Gratton, E.; Ameloot, M.; Knutson, J. R.; Brand, L., *J. Phys. Chem.*, **95**, 2041-2047 (1991).
 - Beechem, J.M., *Methods Enzymol.*, **210**, 37-54 (1992).
 - Benjathapanun, N.; Boyle, W.J.O.; Grattan, K.T.V., *Measurement*, **24**, 1-7 (1998).
 - Benke, A.R.; Thomson, R.M.; Shaw, L.A., *Am. J. Physiol.*, **114**, 137-146 (1935).
 - Berg, N.J.; Lee, J.N., “*Acousto-Optic Signal Processing*”, Marcel Dekker (1983).
 - Bermejo, R.; Fernandez, E.; Álvarez-Pez, J.M.; Talavera, E.M., *J. Lumin.*, **99**, 113-124 (1997).
 - Berson, A.M.; Finger, P.T.; Sherr, D.L.; Emery, R.; Alfieri, A.A.; Bosworth, J.L., *J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **36**, 861-865 (1996).
 - Bevington, P.; Robinson, D.K., “*Data Reduction and Error Analysis for the Physical Sciences*”, McGraw-Hill (1993).
 - Birch, D.J.S.; Imhof, R.E., *J. Phys. E: Sci. Instrum.*, **10**, 1044-1049 (1977).
 - Birch, D.J.S.; Imhof, R.E., *Rev. Sci. Instrum.*, **52**, 1026-1212 (1981).
 - Birch, D.J.S.; Hungerford, G.; Imhof, R.E., *Rev. Sci. Instrum.*, **62**, 2045-2048 (1991).
 - Birch, D.J.S.; McLoskey, D.; Sanderson, A.; Suhling, K.; Holmes, A.S., *J. Fluores.*, **4**, 91-102 (1994).
-

V. Bibliografía

- Blakeslee, D.; Baines, M.G., *J. Immunol. Methods*, **13**, 305-320 (1976).
- Bloomfield, V.; Crothers, D.; Tinoco Jr., D.I., “*Physical Chemistry of Nucleic Acids*”, Harper & Row (1974).
- Boens, N.; Ameloot, M.; Yamazaki, I.; De Schryver, F.C., *Chem. Phys.*, **121**, 73-86 (1988).
- Boens, N.; Janssens, L.D.; De Schryver, F.C., *Biophys. Chem.*, **33**, 77-90 (1989).
- Boens, N.; Tamai, N.; Yamazaki, I., *Photochem. Photobiol.*, **52**, 911-917 (1990)
- Boens, N.; Baeyens, W.R.G.; De Keukeleire, D.; Korkidis, K., “*Luminescence Techniques in Chemical and Biochemical Analysis*”, Marcel Dekker (1991).
- Boens, N.; Andriessen, R.; Ameloot, M.; Van Dommelen, L.; De Schryver, F.C., *J. Phys. Chem.*, **96**, 6331-6342 (1992).
- Boens, N.; Van Dommelen, L.; Ameloot, M., *Biophys. Chem.*, **48**, 301-313 (1993).
- Boens, N.; Kowalczyk, A., *Chem. Phys. Lett.*, **260**, 326-330 (1996a).
- Boens, N.; Kowalczyk, A.; Cielen, E., *J. Phys. Chem.*, **100**, 4879-4887 (1996b).
- Boens, N.; Szubiakowski, J.; Novikov, E.; Ameloot, M., *J. Chem. Phys.*, **112**, 8260-8266 (2000).
- Boens, N.; Basarić, N.; Novikov, E.; Crovetto, L.; Orte, A.; Talavera, E.M.; Álvarez-Pez, J.M., *J. Phys. Chem. A.*, **108**, 8180-8189 (2004).
- Boens, N.; De Schryver, F.C., *J. Phys. Chem. A.*, **109**, 7371-7384 (2005).
- Boens, N.; Qin, W.; Basarić, N.; Orte, A.; Talavera, E.M.; Álvarez-Pez, J.M., *J. Phys. Chem. A.*, **110**, 9334-9343 (2006).
- Boens, N.; De Schryver, F.C., *Chem. Phys.*, **325**, 461-471 (2006).
- Boens, N.; Novikov, E.; Van der Auweraer, M., *Math. Bio.*, **209**, 624-643 (2007).
- Bollinger, L.M.; Thomas, G.E., *Rev. Sci. Instrum.*, **32**, 1044-1050 (1961).
- Boutot, J.P.; Delmotte, J.C.; Miehé, J.A.; Sipp, B., *Rev. Sci. Instrum.*, **48**,

1405-1407 (1977).

- Bowman, L.E.; Berglund, K.A.; Nocera, D.G., *Rev. Sci. Instrum.*, **64**, 338-341 (1993).
- Brand, L.; Laws, W. R., *Ser. A.*, **69**, 319-340 (1983).
- Brimacombe, R.L.; Reese, C.B., *J. Mol. Biol.*, **18**, 529-540 (1966).
- Brigham, K.L.; Meyrick, B.; Berry, L.C.; Repine, J.E., *J. Dev. Physiol.*, **9**, 225-238 (1987).
- Brinkley, M., *Bioconjugate Chem.*, **3**, 2-13 (1992).
- Britten, R.J., Khone, D.E., *Science*, **161**, 529-540 (1968).
- Brochon, J.C., *Methods Enzymol.*, **240**, 262-311 (1994).
- Broido, M.S.; Kearns, D.R., *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 5207-5216 (1982).
- Brownellet, G.L.; Berman, M.; Robertson, J.S., *Int. J. Al. Rad. Isotopes*, **19**, 249-262 (1968).
- Buchberger, E.M.; Mollay, B.; Weixelbaumer, W.; Kauffmann, H.F.; Klöpffer, W., *J. Chem. Phys.*, **89**, 635-652 (1988).
- Bulteau, A.; Moreau, M.; Nizard, C.; Friguet, B., *Free Radical Biol. Med.*, **32**, 1157-1170 (2002).



- Cai, X.H.; Zhao, Z.F., *Anal. Chim. Acta*, **212**, 341-347 (1988).
- Cai, H.; Xu, C.; He, P.G.; Fang, Y.Z., *J. Electroanal. Chem.*, **510**, 78-85 (2001).
- Campillo, A.J.; Clarck, J.H.; Shapiro, S.L.; Winn, K.R., *Springer Ser. Chem. Phys.*, **4**, 319-326 (1978).
- Capomacchia, A.C.; Schulman, S.G., *Anal. Chim. Acta*, **59**, 471-473 (1972).
- Cardullo, R.A.; Agrawal, S.; Flores, C.; Zamecnik, P.C.; Wolf, D.E., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **85**, 8790-8794 (1988).
- Carle, G.F.; Olsen, M., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **82**, 3756-3759 (1985)

V. Bibliografía

- Carmeli, I.; Huppert, D.; Tolbert, L.M.; Haubrich, J.E., *Chem. Phys. Lett.*, **260**, 109-114 (1996).
- Carmona, P.; Navarro, P.; Hernanz, A., “*Optical Spectroscopy and Molecular Physics*”, Kluwer Academic Publishers (1997).
- Caruthers, M.H.; Beaton, G.; Wu, J.V.; Wiesler, W., *Methods Enzymol.*, **211**, 3-20 (1995).
- Caturla F.; Enjo J.; Bernabeu M.C.; *Le Serre S. Tetrahedron*, **60**, 1903–1911 (2004).
- Chamberlin, M.; Patterson, D., *J. Mol. Biol.*, **12**, 410-428 (1965).
- Chan, M.S.; Bolton, J.R., *Solar Energ.*, **24**, 561-574 (1980).
- Chandran S.S.; Dickson K.A.; Raines R.T., *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 1652–1653 (2005).
- Chapple, M.R.; Johnson, G.D.; Davidson, R.S., *J. Microsc.*, **159**, 245-253 (1990).
- Chattopadhyay, N.; Chowdury, M., *J. Photochem.*, **38**, 301-307 (1987).
- Chattopadhyay, N.; Dutta, R.; Chowdhury, M., *J. Photochem. Photobiol. A.*, **47**, 249-257 (1989a).
- Chattopadhyay, N.; Samanta, A.; Kundu, T.; Chowdhury, M., *J. Photochem. Photobiol. A.*, **48**, 61-68 (1989b).
- Chattopadhyay, N.; Chakraborty, T.; Nag, A.; Chowdhury, M., *J. Photochem. Photobiol. A.*, **52**, 199-204 (1990).
- Chattopadhyay, N., *J. Photochem. Photobiol. A.*, **88**, 1-8 (1995).
- Chattopadhyay, N., *J. Mol. Sci.*, **4**, 460-480 (2003).
- Chen, N.; Chrambach, A., *Electrophoresis*, **18**, 1126-1132 (1997).
- Chen, R.F.; Knutson, J.R., *Anal. Biochem.*, **172**, 61-77 (1988).
- Cheng, Y.; Dovivhi, N.J., *Science*, **242**, 562-564 (1988).
- Chignell, C.F.; Sik, R.H., *Free Rad. Biol. Med.*, **34**, 1029-1034 (2003).
- Chiu, H.; Chih, T.; Hsian, Y.; Tseng, C.; Wu, M.; Wu, Y., *Biochem. Pharmacol.*, **65**, 319-327 (2003).
- Choi, K.J.; Boczer, B.P.; To, M.R., *Springer Ser. Chem. Phys.*, **38**, 368-370 (1984).

-
- Chou, P.; McMorro, D.; Aartsma, T.J.; Kasha, M., *J. Phys. Chem.*, **88**, 4596-4599 (1984).
 - Chu, G.; Vollrath, D.; Davis, J., *Science*, **234**, 1582-1585 (1986).
 - Chu, G.; Orgel, L.E., *Nucleic Acids Res.*, **16**, 3671-3678 (1988).
 - Clark, S.M.; Lai, E.; Birren, B.W.; Hood, L., *Science*, **241**, 1203-1209 (1988).
 - Clark, M.; Cramer, R.D.; Van Opdenbosch, N., *J. Comput. Chem.*, **10**, 982-1012 (1989).
 - Clower, C.; Solntsev, K.M.; Kowalik, J.; Tolbert, L.M.; Huppert, D., *J. Phys. Chem. A.*, **106**, 3114-3122 (2002).
 - Cohen, B.; Huppert, D., *J. Phys. Chem. A.*, **105**, 7157-7164 (2001).
 - Cohen, B.; Huppert, D.; Solntsev, K.M.; Tsfadia, Y.; Nachliel, E.; Gutman, M., *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 7539-7547 (2002).
 - Conte, J.C.; Martinho, J.M.G., *Chem. Phys. Lett.*, **134**, 350-354 (1987).
 - Connolly, B.A., *Nucleic Acids Res.*, **15**, 3131-3139 (1987).
 - Cover, W.E.; Cornelisse, C.J.; Fleuren, G.J., *Cytometry*, **15**, 117-128 (1994).
 - Crovetto, L.; Orte, A.; Talavera, E.M.; Álvarez-Pez, J.M., *J. Lumin.*, **17**, 230-232 (2002).
 - Crovetto, L., *Tesis Doctoral*, Universidad de Granada (2003).
 - 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**, 6082-6092 (2004).
 - Crovetto, L.; Paredes, J.M.; Ríos, R.; Talavera, E.M.; Álvarez-Pez, J.M., *J. Phys. Chem. A.*, **111**, 13311-13320 (2007).
 - Crovetto, L.; Ríos, R.; Álvarez-Pez, J.M.; Paredes, J.M.; Lozano-Velez, P.; del Valle, C.; Talavera, E.M., *J. Phys. Chem. B.*, **112**, 10082-10085 (2008).
 - Cukier, R. I.; Zhu, J., *J. Phys. Chem.*, **110**, 9587-9596 (1999).



- Davenport, L.M.; Knutson, J.R.; Brand, L., *Biochemistry*, **25**, 1186-1195 (1986).
- Daxecker, H.; Raab, M.; Markovic, S.; Karimi, A.; Griesmacher, A.; Mueller, M., *Clin. Chim. Acta*, **325**, 171-175 (2002).
- Demas, J.N.; Crosby, G.A., *J. Phys. Chem.*, **75**, 991-1024 (1971).
- Denhardt, D.T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **23**, 641-646 (1966).
- Denk, W.; Strickler, J.H.; Webb, W.W., *Science*, **248**, 73-76 (1990).
- DePetris, S., *Methods Membr. Biol.*, **9**, 1-201 (1978).
- Diamandis, E.P., *Clin. Biochem.*, **21**, 139-150 (1988).
- Dias A.; Varela, A.P.; Miguel, M.G.; Becker, R.S.; Burrows, H.D.; Maçanita A.L., *J. Phys. Chem.*, **100**, 17970-17977 (1996).
- Dias A.; Varela, A.P.; Miguel, M.G.; Maçanita A.L.; Becker, R.S., *J. Phys. Chem.*, **96**, 10290-10296 (1992).
- Dias, F.B.; Lima, J.C.; Maçanita, A.L.; Horta, A.; Piérola, I.F., *J. Phys. Chem. A.*, **104**, 17-24 (2000).
- Didenko V.V., *Biotechniques*, **31**, 1106–1121 (2001).
- Diehl, H.; Markuszewski, R., *Talanta*, **32**, 159-165 (1985).
- Diehl, H.; Horchak-Morris, N.; Hefley, A.J.; Munson, L.F.; Markuszewski, R., *Talanta*, **33**, 901-905 (1986).
- Diehl, H.; Horchak-Morris, N., *Talanta*, **34**, 739-741 (1987).
- 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**, 467-473 (1990).
- Draper, D.; Gold, L., *Biochem.*, **19**, 1774-1781 (1978).
- Draper, N.R.; Smith, R., “*Applied Regression Analysis*”, Wiley (1981).
- Draper, D., *Nucleic Acids Res.*, **12**, 989-1001 (1984).
- Draxler, S.; Lippitsch, M.E., *J. Phys. Chem.*, **97**, 11493-11496 (1993).

-
- Dreider, J.; Breitmaier, E.B.; Gocke, E.; Apfel, C.M.; Page, M.G., *Mutat. Res.*, **513**, 169-182 (2002).
 - Dutta, P; Halder, A.; Mukherjee, S.; Sen, P.; Sen, S.; Bhattacharyya, K., *Langmuir*, **18**, 7867-7871 (2002).



- Eaimtrakarn, S.; Prasad, Y.V.; Puthli, S.P.; Yoshikawa, Y.; Shibata, N.; Takada, K., *Int. J. Pharmaceutics*, **250**, 111-117 (2003).
- Eastwood, D.; Cline-Love, L.J., “*Progress in Analytical Luminescence*”, Am. Soc. for Testing & Materials (1988).
- Eaton, D.F., *Tetrahedron*, **43**, 1551-1570 (1987).
- Ebato, H.; Gentry, C.A.; Herron, J.N.; Muller, W.; Okahata, Y.; Ringsdorf, H.; Suci, P.A., *Anal. Chem.*, **66**, 1683-1689 (1994).
- Eisenfeld, J.; Ford, C.C., *J. Biophys.*, **26**, 73-83 (1979).
- Elaesser, T., “*Femtosecond Chemistry*“, VCH Publishers (1995).
- Ellouze, C.; Pilot, F.; Takahashi, M., *J. Biochem.*, **121**, 521-526 (1997).
- Escabi-Pérez, J.R.; Fendler, J.H., *J. Am. Chem. Soc.*, **100**, 2234-2236 (1978).



- Fang, X.H.; Liu, X.J.; Schuster, S.; Tan, W.H., *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 2921-2922 (1999).
- Feldhaus, M.J.; Siegel, R.W.; Opresco, 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**, 163-170 (2003).

V. Bibliografía

- Felsenfeld, G.; Miles, H., *Ann. Rev. Biochem.*, **37**, 407-430 (1967).
- Fink, D.W.; Willis, C.R., *J. Chem. Phys.*, **53**, 4720-4722 (1970).
- Fix, A.; Schröder, T.; Wallenstein, R., *Optoelectron. Rev.*, **23**, 106-110 (1991).
- Fixler, D.; Tirosh, R.; Zinman, T.; Shainberg, A.; Deutsch, M., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **300**, 23-28 (2003).
- Fontaniella, B.; Márquez, A.; Rodríguez, C.W.; Piñon, D.; Solas, M.T.; Vicente, C.; Legaz, M.E., *Plant Physiol. Bioch.*, **40**, 881-889 (2002).
- Forés, M.; Scheiner, S., *Chem. Phys.*, **246**, 65-74 (1999).
- Forés, M.; Durán, M.; Solà, M., *Chem. Phys.*, **260**, 53-64 (2000).
- Formosinho, S.J.; Arnaut, L.G., *J. Photochem. Photobiol. A.*, **75**, 21-48 (1993).
- Förster, T., *Z. Elektrochem.*, **54**, 42-46 (1950).
- Förster, A.C.; McInnes, J.L.; Skingle, D.C.; Symons, R.H., *Nucleic Acids Res.*, **13**, 745-761 (1985).
- Freeman, B.A.; Rosen, G.M.; Barber, M.J., *J. Biol. Chem.*, **261**, 6590-6593 (1986).
- Furusjö, E.; Danielsson, L.G., *Anal. Chim. Acta*, **373**, 83-94 (1998).



- Gafni, A.; Modlin, R.L.; Brand, L., *J. Phys Chem.*, **80**, 898-904 (1976).
- Gebeyehu, G.; Rao, P.Y.; Soochan, P.; Simms, D.A.; Klevan, L., *Nucleic Acids Res.*, **15**, 4513-4534 (1987).
- Gelb, L.D.; Khone, D.E.; Martin, M., *J. Mol. Biol.*, **57**, 129-145 (1971).
- Genosar, L.; Cohen, B.; Huppert, D., *J. Chem. Phys. A.*, **104**, 6689-6698 (2000).
- George, L.D.; Ponta, G.M., *Eng. Geol.*, **65**, 159-167 (2002).
- Ghigginio, K.P.; Skilton, P.F.; Thistlewaite, P.J., *J. Photochem.*, **31**, 113-121

(1985).

- Gibson, K.J.; Benkovic, S.J., *Nucleic Acids Res.*, **15**, 6455-6467 (1987).
- Godfrey, K., “*Compartmental Models and Their Application*”, Academic Press (1983).
- Gil, S.; Rodríguez, E., “*Física Re-creativa*”, McGraw-Hill, (2003).
- Gillam, I.C.; Tener, G.M., *Anal. Biochem.*, **157**, 199-207 (1986).
- Gillespie, P.; Spiegelman, S., *J. Mol. Biol.*, **12**, 829-842 (1966).
- Glazer, A.N.; Rye, H.S., *Nature*, **359**, 859-861 (1992).
- Goldberg, S.Y.; Pines, E.; Huppert, D., *Chem Phys. Lett.*, **192**, 77-81 (1992).
- Gong, B.; Gong, G., *Anal. Chim. Acta*, **394**, 171-175 (1999).
- Goudier, I.; Del Rio, M.; Crabbe, L.; Copois, V.; Ychou, M.; Auffray, C.; Martineau, P.; Mechti, N.; Pommier, Y.; Pau, B., *FEBS Letters*, **529**, 232-236 (2002).
- Gratama, J.W.; Kraan, J.; Levering, W.; Van Bockstaele, D.R.; Rijkers, G.T.; Vanderschoot, C.E., *Cytometry*, **30**, 109-117 (1997).
- Grinvald, A.; Steinberg, I.Z., *Anal. Biochem.*, **59**, 583-598 (1974).
- Grofcsik, A.; Kubinyi, M.; Ruzsinszky, A.; Veszpremi, T.; Jones, W. J., *J. Mol. Struct.*, **555**, 15-19 (2000).
- Grunstein, M.; Hogness, D., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **72**, 3961-3966 (1975).
- Gryczynski, I.; Malk, H.; Lakowicz, J.R., *Biospectr.*, **2**, 9-15 (1996).
- Guyot, G.; Arnaud, R.; Lemaire, J., *J. Chem. Phys.*, **72**, 647-653 (1975).



- Habenicht, A.; Hjelm, J.; Mukhtar, E.; Bergström, F.; Johansson, L.B.A., *Chem. Phys. Lett.*, **354**, 367-375 (2002).
- Hall, B.D.; Spiegelman, S., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **47**, 137-146 (1961).
- Hansen, J.E.; Pines, E.; Fleming, G.R., *J. Phys. Chem.*, **96**, 6904-6910 (1992).
- Haralambidis, J.; Duncan, L.; Angus, K.; Tregear, G.W., *Nucleic Acids Res.*,

V. Bibliografía

- 18**, 493-499 (1990a).
- Haralambidis, J.; Angus, K.; Pownall, S.; Duncan, L.; Chai, M.; Tregear, G.W., *Nucleic Acids Res.*, **18**, 501-505 (1990b)
 - Hartman, K.; Rich, A., *J. Am. Chem. Soc.*, **87**, 2033-2039 (1965).
 - Haugland, R.P., “*Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*”, Molecular probes (1996).
 - Haugland, R.P., “*Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*”, Molecular Probes (2002).
 - Haugland R.P.; Spence M.T.Z.; Johnson I.D.; Basey A., “*A Guide to Fluorescent Probes and Labelling Technologies*”, Molecular probes (2005).
 - Hayatsu, H., *Nucleic Acids Res. Mol. Biol.*, **16**, 75-124 (1976).
 - Healey, B.G.; Matson, R.S.; Walt, D.R., *Anal. Biochem.*, **251**, 270-279 (1997).
 - Hearon, J.Z., *Ann. NY Acad. Sci.*, **108**, 36-40 (1963).
 - Hermans, B.; De Schryver, F.C.; van Stam, J.; Boens, N.; Jerome, R.; Teyssie, P.; Trossaert, G.; Goethals, E.; Schacht, E., *Macromolecules*, **28**, 3380-3386 (1995).
 - Hoffman, J.; Sernetz, M., *Anal. Biochem.*, **131**, 180-186 (1983).
 - Houghtan, R.W., *J. Marine Syst.*, **37**, 31-46 (2002).
 - Houston, B.; Peddie, D., *Anal. Biochem.*, **177**, 263-267 (1989).
 - Howorth, J.R.; Ferguson, I.; Wilcox, D., *Proc. SPIE*, **2388**, 356-359 (1995).
 - Hoyer, R.H.; McCarthy, B.J.; Bolton, E.T., *Science*, **144**, 957-967 (1964).
 - Htun, M.T.; Suwaiyan, A.; Baig, A.; Klein, U.K.A., *Chem. Phys. Lett.*, **243**, 71-77 (1995).
 - Htun, M.T.; Suwaiyan, A.; Baig, A.; Klein, U.K.A., *Chem. Phys. Lett.*, **264**, 596-604 (1997)
 - Htun, M.T.; Suwaiyan, A.; Baig, A.; Klein, U.K.A., *J. Phys. Chem. A.*, **102**, 8230-8235 (1998).
 - Htun, M.T., *Chem. Phys. Lett.*, **328**, 437-445 (2000).
 - Htun, T., *J. Fluoresc.* **13**, 323-329 (2003).
 - Huang, W.E.; Smith, C.C.; Lerner, D.N.; Thronton, S.F.; Oram, A., *Water*

Research, **36**, 1843-1853 (2002).

- Huang, Z., *Biochem.*, **30**, 8535-8540 (1991).
- Huang, Z.; Thompson, N.L., *Biophys. J.*, **70**, 2001-2007 (1996).
- Huppert, D.; Kolodney, E.; Gutman, M.; Nachliel, E., *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 6949-6953 (1982).
- Hynes, J.T.; Tran-Thi, T.H; Granucci, G., *J. Photochem. Photobiol. A.*, **154**, 3-11 (2002).



- Il'ichev, Y.V.; Demyashkevich, A.B.; Kuzmin, M.G.J., *Phys. Chem.*, **95**, 3438-3444 (1991).
- Inoue, K.; Okumura, H.; Higuchi, T.; Oka, H.; Yoshimura, Y.; Nakazawa, H., *Clin. Chim. Acta*, **325**, 157-163 (2002).
- Ireland, J.F.; Wyatt, P.A.H., *Adv. Phys. Org. Chem.*, **12**, 131-221 (1976).



- Jablonski, E.; Moomaw, E.W.; Tullis, R.H.; Ruth, J.L., *Nucleic Acids Res.*, **14**, 6115-6123 (1986).
- Jacobs, D.; Angles, M.L.; Goodman, A.E.; Neilan, B.A., *FEMS Microbiol. Lett.*, **152**, 65-73 (1997).
- Jacques, J.A., "*Compartmental Analysis in Biology and Medicine*", Elsevier (1972).
- Jameson, D.M.; Sawyer, W.H., *Methods Enzymol.*, **246**, 283-300 (1995).
- Jankowski, A.; Stefanowicz, P., *J. Photochem. Photobiol. A.*, **84**, 143-149 (1994).

V. Bibliografía

- Jankowski, A.; Wiczek, W.; Janiak, T., *J. Photochem. Photobiol. A.*, **85**, 69-75 (1995).
- Jankowski, A. Dobryszewski, P.; Lipiski, J.; Stefanowicz, P., *J. Fluoresc.*, **8**, 103-113 (1998).
- Janssens, L.D.; Boens, N.; Ameloot, M.; De Schryver, F.C., *J. Phys. Chem.*, **94**, 3564-3576 (1990).
- Jockusch, S.; Martí, A.A.; Turro, N.J.; Li, Z.; Li, X.; Ju, J.; Stevens, N.; Akins, D.L., *Photochem. Photobiol. Sci.*, **5**, 493–498 (2006).
- Johnson, M.L.; Correia, J.J.; Halvorson, H.R.; Yphantis, D.A., *Biophys. J.*, **36**, 575-588 (1981).
- Johnson, M.L.; Frasier, S.G., *Methods Enzymol.*, **117**, 301-342 (1985).
- Jolley, M.E.; Stroupe, S.D.; Schwenzler, K.S.; Wang, C.J.; Lu-Steffes, M.; Hill, H.D.; Popelka, S.R.; Holen, J.T.; Kelso, D.M., *Clin. Chem.*, **27**, 1575-1579 (1981).



- Kamiya, M.; Kobayashi, T.; Hama, Y.; Koyama, Y.; Bernardo, M.; Nagano, T.; Choyke, P. L.; Urano, Y., *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 3918-3929 (2007).
- Kankare, J., *J. Anal. Chem.*, **42**, 1322-1326 (1970).
- Karolczak, J.; Komar, D.; Kubicki, J.; Wrózowa, T.; Dobek, K.; Ciesielska, B.; Maciejewski, A., *Chem. Phys. Lett.*, **344**, 154-164 (2001).
- Kasaian, M.T.; Jacobberger, J.W.; Neet, K.E., *Exp. Cell Res.*, **210**, 77-85 (1994).
- Kasha, M., *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, **82**, 2379-2392 (1986).
- Kelly, R.B.; Cozzarelli, N.R.; Deutscher, M.P.; Lehman, I.R.; Kornberg, A., *J. Biol. Chem.*, **245**, 39-44 (1970).
- Kelly, R.N.; Schulman, S.G., “*Molecular Fluorescence Spectroscopy: Methods and Applications Part II*”, Wiley (1988).

-
- Khalil, M.M.H.; Boens, N.; De Schryver, F.C., *J. Phys. Chem.*, **97**, 3111-3122 (1993).
 - Khalil, M.M.H.; Boens, N.; Van der Auweraer, M.; Ameloot, M.; Andriessen, R.; Hofkens, J.; De Schryver, F.C., *J. Phys. Chem.*, **95**, 9375-9381 (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**, 7421-7435 (1995).
 - Kimura, K.; Arata, Y.; Yasuda, T.; Kinoshita, K.Jr.; Nakanishi, M., *Biochim. Biophys. Acta*, **1104**, 9-14 (1992).
 - Kinoshita, S.; Ohta, H.; Kushida, T., *Rev. Sci. Instrum.*, **52**, 572-575 (1981).
 - Klöpffer, W., *Adv. Photochem.*, **10**, 311-358 (1977).
 - Knochel, P.; Dohle, W.; Gommerman, N.; Kneisel, F.F.; Kopp, F.; Korn, T.; Sapountzis, I.; Vu, V., *Angew. Chem. Int.*, **42**, 4302-4320 (2003).
 - Knutson, J.R.; Beechem, J.M.; Brand, L., *Chem. Phys. Lett.*, **102**, 501-507 (1983).
 - Kobayashi, T.; Urano, Y.; Kamiya, M.; Ueno, T.; Kojima, H.; Nagano, T., *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 6696-6697 (2007).
 - Kobayashi, Y.; Amitani, K.; Watanabe, F.; Miyai, K., *Clin. Chin. Acta.*, **92**, 241-247 (1979).
 - Koide, Y.; Urano, Y.; Kenmoku, S.; Kojima, H.; Nagano, T., *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 10324-10325 (2007).
 - Koziolowa, A.; Visser, N.V.; Koziol, J.; Szafran, M.M., *J. Photochem. Photobiol. A.*, **93**, 157-163 (1996).
 - Kremisky, J.N.; Wooters, J.L.; Dougherty, J.P.; Meyers, R.E.; Collins, M.; Brown, E.L., *Nucleic Acids Res.*, **15**, 2891-2909 (1987).
 - Kronick, M.N., *J. Immunol. Methods*, **92**, 1-13 (1986).
 - Kronick, M.N.; Grossman, P.D., *Clin. Chem.*, **29**, 1582-1586 (1983).
 - Kunzelmann, S.; Webb, M.R., *ACS Chemical Biology*, **5**, 415-425 (2010).
 - Kvietys, P.R.; Inauen, W.; Bacon, B.R.; Grisham, M.B., *J. Al. Physiol.*, **257**, 1640-1646 (1989).



- Laenen, K.; Laubereau, A., *Opt. Lett.*, **19**, 1553-1555 (1994).
- Lakowicz, J.R.; Balter, A., *Chem. Phys. Lett.*, **92**, 117-121 (1982).
- Lakowicz, J.R.; Gryczynski, I., *J. Fluoresc.*, **2**, 237-247 (1992a).
- Lakowicz, J.R.; Gryczynski, I.; Danielsen, E., *Chem. Phys. Lett.*, **191**, 47-53 (1992b).
- Lakowicz, J.R.; “*Principles of Fluorescence Spectroscopy*”, Kluwer Academic/Plenum Publisher (1999).
- 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**, 846-853 (1997).
- Langer, P.R.; Waldrop, A.A., Ward, D.C., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **78**, 6633-6637 (1981).
- Lasser, N.; Feitelson, J., *J. Phys. Chem.*, **77**, 1011-1016 (1973).
- Laws, W.R.; Brand, L., *J. Phys. Chem.*, **83**, 795-802 (1979).
- Laws, W.R.; Sutherland, C., *J. Photochem. Photobiol.*, **44**, 365-370 (1986).
- Leary, J.J.; Brigati, D.J.; Ward, D.C., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **80**, 4045-4049 (1983).
- Lee, J.; Griffin, R.D.; Robinson, G.W., *J. Chem. Phys.*, **82**, 4920-4925 (1985).
- Lee, J., *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 427-434 (1989).
- Leonhardt, H.; Gordon, L.; Livingston, T., *J. Phys. Chem.*, **75**, 245-249 (1971).
- Li, F.; Omori, N.; Sato, K.; Jin, G.; Nagano, I.; Manabe, Y.; Shoji, M.; Abe, K., *Brain Res.*, **958**, 83-88 (2002).
- Lima, J.C.; Abreu, I.; Brouillard, R.; Maçanita, A.L., *Chem. Phys. Lett.*, **298**, 189-195 (1998).
- Linden, S.M.; Neckers, D.C., *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 1257-1260 (1988).

-
- Lindqvist, A.K.; Magnusson, P.K.; Balciuniene, J.; Wadelius, C.; Lindholm, E.; Alarcon-Riquelme, M.E.; Gyllensten, U.B., *Genome Res.*, **6**, 1170-1176 (1996).
 - Loken, M.R.; Hayes, J.W.; Gohlke, J.R.; Brand, L., *Biochem.*, **11**, 4779-4786 (1972).
 - López, R.J.; González, F.; Moreno, F., *Rev. Sci. Instrum.*, **63**, 3268-3273 (1992).
 - Lorite, P.; Aranega, A.E.; Luque, F.; Palomeque, T., *Heredity*, **78**, 578-582 (1997).
 - Lu, I.; Sharma, L.K.; Bai, Y., *Cell. Research*, **19**, 802-815 (2009).
 - Ludescher, R.D., *Spectroscopy*, **5**, 20-31 (1990).
 - Lytle, E.; Kelsey, M.S., *Anal. Chem.*, **46**, 855-860 (1974).
 - Lytle, F. E.; Dinke, D. M.; Fisher, W.G., *Appl. Spectrosc.*, **47**, 2002-2006 (1993).



- Maçanita, A.L.; Moreira, P.F. Jr.; Lima, J.C.; Quina, F.H.; Yihwa, C.; Vautier-Giongo, C., *J. Phys. Chem. A.*, **106**, 1248-1255 (2002).
- Makrigiorgos, G.M.; Kassis, A.I.; Mahmood, A.; Bump, E.A.; Savides, P., *Free Radical Biol. Med.*, **22**, 93-100 (1997).
- Mallard, F.; Marchand, G.; Ginot, F.; Campagnolo, R., *Biosens. Bioelectron.*, **20**, 1813-1820 (2005).
- Mannelli, F.; Minunni, A.; Tombelli, S.; Wang, R.H.; Spiriti, M.M.; Mascini, M., *Bioelectrochem.*, **66**, 129-138 (2005).
- Marmur, J., Doty, P., *J. Mol. Biol.*, **3**, 585-594 (1961).
- Marquardt, D.W., *J. Soc. Indust. Al. Math.*, **11**, 431-441 (1963).
- Marquette, C.A.; Blum, L., *J. Anal. Chim. Acta*, **506**, 127-132 (2004).
- Martí, A.A.; Steffen, J.; Nathan, S.; Ju, J.; Turro, N.J., *Acc. Chem.*, **40**, 402-

V. Bibliografía

- 409 (2007).
- Martin, M.; Lindqvist, L., *J. Lumin.*, **10**, 381-390 (1975).
 - Martynov, I.Y.; Demyashkevich, A.B.; Kuzmin, M.G., *Russ. Chem. Rev.*, **46**, 1-15 (1977).
 - Massad, A.; Huppert, D., *Chem. Phys. Lett.*, **180**, 409-415 (1991).
 - Massey M.; Algar W.R.; Krull U.J., *Anal. Chim. Acta*, **568**, 181-189 (2006).
 - Matayoshi, E.D.; Sawyer, W.H.; Jovin, T.M., *Biochem.*, **30**, 3538-3543 (1991).
 - Mathies, R.A.; Peck, K.; Stryer, L., *Anal. Chem.*, **62**, 1786-1791 (1990).
 - Maus, M.; Cotlet, M.; Hofkens, J.; Gensch, T.; De Schryver, F.C.; Schaffer, J.; Seidel, C.A.M., *Anal. Chem.*, **73**, 2078-2086 (2001).
 - McCarthy, B.J.; Bolton, E.T., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **50**, 156-164 (1963).
 - McLoskey, D.; Birch, D.J.S.; Sanderson, A.; Suhling, K.; Welch, E.; Hicks, P.J., *Rev. Sci. Instrum.*, **67**, 2228-2237 (1996).
 - Meinkoth, J.; Wahl, G., *Anal. Biochem.*, **138**, 267-271 (1984).
 - Melo, M.J.; Bernardo, M.A.; Melo, E.C.; Pina, F., *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, **92**, 957-968 (1996).
 - Meloun, M.; Capek, J.; Miksík, P.; Brereton, R.G., *Anal. Chim. Acta*, **423**, 51-68 (2000).
 - Mertz, J.; Xu, C.; Webb, W.W., *Opt. Lett.*, **47**, 2532-2534 (1995).
 - Meuwis, K.; Depuydt, G.; Boens, N.; De Schryver, F.C., *Chem. Phys. Lett.*, **246**, 641-648 (1995a).
 - Meuwis, K.; Boens, N.; De Schryver, F.C.; Gallay, J.; Vincent, M., *J. Biophys.*, **68**, 2469-2473 (1995b).
 - Meuwis, K.; Boens, N.; Gallay, J.; Vincent, M., *Chem. Phys. Lett.*, **287**, 412-420 (1998).
 - Miller, E.; Tulyanthan, O.; Isacoff, E. Y.; Chang, C., *J. Nat. Chem. Biol.*, **3**, 263-267 (2007).
 - Miralles, E.; Prat, D.; Compano, R.; Granados, M., *Analyst.*, **122**, 553-558 (1997).
 - Miller, D.S.; Barnes, D.M.; Pritchard, J.B., *Amer. J. Physiol.*, **267**, 16-25

(1994).

- Miura, T.; Urano, Y.; Tanaka, K.; Nagano, T.; Ohkubo, K.; Fukuzumi, S., *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 8666-8671 (2003).
- Mishra, A.K., *Mol. Supramol. Photochem.*, **8**, 577-579 (2001).
- Montero, S.; Morilla, J.H.; Tejeda, G.; Fernández, J.M., *Eur. Phys. J.*, **52**, 31-34 (2009).
- Montcourrier, P.; Mangeat, P.H.; Valembois, C.; Salazar, G.; Sahuquet, A.; Duperray, C.; Rochefort, H., *J. Cell. Sci.*, **107**, 2381-2391 (1994).
- Moreira, P.F.Jr.; Giestas, L.; Yihwa, C.; Vautier-Giongo, C.; Quina, F.H.; Maçanita, A.L.; Lima, J.C., *J. Phys. Chem. A.*, **107**, 4203-4210 (2003).
- Morrison, L.E.; Stols, L.M., *Biochem.*, **32**, 3095-3104 (1993).
- Mottram, L.F.; Boonyarattanakalin, S.; Kovel, R.E.; Peterson, B.R., *Org. Lett.*, **8**, 581-584 (2006).
- Mujumdar, R.B.; Ernst, L.A.; Mujumdar, S.R.; Lewis, C.J.; Waggoner, A.S., *Bioconjugate Chem.*, **4**, 105-111 (1993).
- Munkholm, C.; Parkinson, D.R.; Walt, D.R., *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 2608-2612 (1990).
- Murchie, A.I.H.; Clegg, R.M.; Kitzing, E.; Duckett, D.R.; Diekmann, S.; Lilley, D.M., *Nature*, **341**, 763-766 (1989).



- Nag, K.; Taneva, S.G.; Perezgil, J.; Cruz, A.; Keough, K.M.W., *Biophys. J.*, **72**, 2638-2650 (1997).
- Nedergaard, M.; Desai, S.; Pulsinelli, W., *Anal. Biochem.*, **187**, 109-114 (1990).
- Nouadje, G.; Simeon, N.; Dedieu, F.; Nertz, M.; Puig, P.; Couderc, F., *J. Chromatogr. A.*, **765**, 337-343 (1997).
- Nygaard, A.P.; Hall, B.D., *J. Mol. Biol.*, **9**, 125-142 (1963).



- O'Connor, D. V.; Phillips, D., *"Time-correlated Single Photon Counting"*, Academic Press (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**, 350-355 (1996).
- Oi, V.T.; Glazer, A.N.; Stryer, L., *J. Cell. Biol.*, **93**, 981-986 (1982).
- Orte, A.; Crovetto, L.; Bermejo, R.; Talavera, E.M.; Álvarez-Pez, J.M., *J. Lumin.*, **17**, 233-234 (2002).
- Orte, A. *Tesis Doctoral*, Universidad de Granada (2004).
- Orte, A.; Crovetto, L.; Talavera, E.M.; Boens, N.; Álvarez-Pez, J.M., *J. Phys. Chem. A.*, **109**, 734-747 (2005a).
- Orte, A.; Bermejo, R.; Talavera, E.M.; Crovetto, L.; Álvarez-Pez, J.M., *J. Phys. Chem. A.*, **109**, 2840-2846 (2005b).
- Orte, A.; Talavera, E.M.; Maçanita, A.L.; Orte J.C.; Álvarez-Pez, J.M., *J. Phys. Chem. A.*, **109**, 8705-8718 (2005c).
- Oser, A.; Roth, W.K.; Valet, G., *Nucleic Acids Res.*, **16**, 1181-1196 (1988).



- Pappayee, N.; Mishra, A.K., *Spectrochim. Acta A.*, **56**, 1027-1034 (2000).
- Paradiso, A.M.; Tsien, R.Y.; Machen, T.E., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **81**, 7436-7440 (1984).
- Pardo, A.; Reyman, D.; Martín, E.; Poyato, J.M.L., *J. Lumin.*, **51**, 269-274 (1992).

-
- Paredes, J.M.; Crovetto, L.; Rios, R.; Orte, A.; Álvarez-Pez, J.M.; Talavera, E.M., *Phys. Chem.*, **11**, 5400-5407 (2009).
 - Paredes, J.M.; Orte, A.; Crovetto, L.; Álvarez-Pez, J.M.; Rios, R.; Ruedas-Rama, M.J.; Talavera, E.M., *Phys. Chem.*, **12**, 323–327 (2010).
 - Parthenopoulos, D. A.; McMorrow, D.; Kasha, M., *J. Phys. Chem.*, **95**, 2668-2674 (1991).
 - Pasmán, Z.; García-Blanco, M.A., *Nucl. Acids Res.*, **24**, 1638-1645 (1996).
 - Patolsky, F.; Lichtenstein, A.; Willner, I., *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 418-419 (2000).
 - Pavelavrancic, M.; Pfeifer, E.; Schroder, W.; Vondohren, H.; Kleinkauf, H., *J. Biol. Chem.*, **269**, 14962-14966 (1994).
 - Petrov, V.; Seifert, F.; Noack, F., *Appl. Phys. Lett.*, **65**, 268-270 (1994).
 - Pina, F.; Melo, M. J.; Bernardo, M. A.; Luis, S. V.; García-España, E., *J. Photochem. Photobiol. A.*, **126**, 65-69 (1999).
 - Pina, F.; Melo, M. J.; Alves, S.; Ballardini, R.; Maestri, M.; Passaniti, P., *New J. Chem.*, **25**, 747-752 (2001).
 - Pines, E.; Huppert, D., *Chem. Phys. Lett.*, **126**, 88-91 (1986a).
 - Pines, E.; Huppert, D., *J. Chem. Phys.*, **84**, 3576-3577 (1986b).
 - Pines, E.; Huppert, D., *J. Chem. Phys.*, **88**, 5620-5630 (1988).
 - Pines, E.; Fleming, G.R., *J. Phys. Chem.*, **95**, 10448-10457 (1991).
 - Politi, M. J.; Brandt, O.; Fendler, J.H., *J. Phys. Chem.*, **89**, 2345-2354 (1985).
 - Poltl, R.; Luckenbach, C.; Fimmers, R.; Ritter, H., *Electrophoresis*, **18**, 2871-2873 (1997).
 - Pouget, J.; Mugnier, J.; Valeur, B., *J. Phys. E.*, **22**, 855-862 (1989).
 - Prater, M.R.; Gogal, R.M.; Blaylock, B.L.; Longstreth, J.; Holladay, S.D., *Food Chem. Toxicol.*, **40**, 1863-1873 (2002).
 - Purkayastha, P.; Bera, S. Ch.; Chattopadhyay, N., *J. Mol. Liq.*, **88**, 33-42 (2000).



- Rayburn, A.L.; Gill, B.S., *Am. J. Bot.*, **74**, 574-580 (1987).
- Read, M. A.; Neidle, S., *J. Biochem.*, **39**, 13422-13432 (2000).
- Regel, R.H.; Ferris, J.M.; Ganf, G.G.; Brookes, J., *Aquat. Toxicol.*, **59**, 209-223 (2002).
- Reines, S.A.; Schulman, L.H., *Methods Enzymol.*, **59**, 146-156 (1979).
- Reisfeld, A.; Rothemberg, J.M.; Bayer, E.A.; Wilchek, M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **142**, 519-526 (1987).
- Rescigno, A.; Segre, G., “*Drug and Tracer Kinetics*”, Blaisdell Publishing Co. (1966).
- Rescigno, A., *Pharm. Res.*, **39**, 471-478 (1999).
- Rescigno, A., *Pharm. Res.*, **44**, 335-346 (2001).
- Reyes-Lopez, M.; Serrano-Luna, J.J.; Negrete-Abascal, E.; León-Sicairos, N.; Guerrero-Barrera, A.L.; de la Garza, M., *Exp. Parasitol.*, **99**, 132-140 (2001).
- Reyman, D.; Viñas, M.H.; Poyato, J.M.L.; Pardo, A., *J. Phys. Chem. A.*, **101**, 768-775 (1997).
- Reyman, D.; Viñas, M.H.; Camacho, J.J., *J. Photochem. Photobiol. A.*, **120**, 85-91 (1999).
- Rigby, P.W.; Dickman, M.; Rhodes, C.; Berg, P., *J. Mol. Biol.*, **113**, 237-248 (1977).
- Roberts, C.J.; Raymond, C.K.; Yamashiro, C.T.; Stevens, T.H., *Methods Enzymol.*, **194**, 644-661 (1991).
- Robertson, A.; Klein, M.E.; Tremont, M.A.; Boller, K.J.; Wallenstein, R., *Opt. Lett.*, **25**, 657-659 (2000).
- Royall, J.A.; Ischiropoulos, H., *Arch. Biochem. Biophys.*, **302**, 348-355 (1993).
- Rozwadowski, M., *Acta Phys. Pol.*, **20**, 1005-1017 (1961).
- Rutherford, E.; Soddy, B. A., *Philos. Mag.*, **4**, 370-396 (1902).

-
- Rutherford, E., *Philos. Trans. Royal Soc. Lond.*, **204**, 169-175 (1904).
 - Ryan, E.T.; Xiang, T.; Johnson, K.P.; Fox, M.A., *J. Phys. Chem.*, **100**, 9395-9402 (1996).
 - Rye, H.S.; Yue, S.; Wemmer, D.E.; Quesada, M.A.; Haugland, R.P.; Mathies, R.A.; Glazer, A.N., *Nucleic Acids Res.*, **20**, 2803-2812 (1992).
 - Rye, H.S.; Glazer, A N., *Nucleic Acids Res.*, **23**, 1215-1222 (1995).



- Safavi, A.; Baezzat, M.R., *Anal. Chim. Acta*, **358**, 121-125 (1998).
- Safavi, A.; Karimi, M.A., *Talanta*, **57**, 491-500 (2002).
- Sakurovs, R.; Ghiggino, K.P., *J. Photochem.*, **18**, 1-8 (1982).
- Samanta, A.; Chattopadhyay, N.; Nath, D.; Kundu, T.; Chowdhury, M., *Chem. Phys. Lett.*, **121**, 507-512 (1985).
- Santangelo, P.J.; Nix, B.; Tsourkas, A.; Bao, G., *Nucleic Acids Res.*, **32**, 51-57 (2004).
- Sarkar, M.; Sengupta, P.K., *Chem. Phys. Lett.*, **179**, 68-72 (1991).
- Sarkar, M.; Ray, J.G.; Sengupta, P.K., *J. Photochem. Photobiol. A.*, **95**, 157-160 (1996).
- Sasic, S., *Spectrochim. Acta, A.*, **14**, 323-326 (2001).
- Sassolas, A.; Leca-Bouvier, B.; Loic J., *Chem. Rev.*, **108**, 109-139 (2008).
- Schmitt, E.; Lehmann, E.; Metzler, M.; Stoer, H., *Toxicol. Lett.*, **136**, 133-136 (2002).
- Schulman, S.G.; Winefordner, J.D., *Talanta*, **17**, 607-616 (1970).
- Schulman, S.G.; Rosenberg, L.S., *J. Phys. Chem.*, **83**, 447-451 (1979).
- Schulman, S.G.; Vogt, B.S., *J. Phys. Chem.*, **85**, 2074-2079 (1981).
- Schwartz, D.C.; Cantor, C.R., *Cell.*, **37**, 67-72 (1984).
- Schwartz, N.J.; Peteanu, L.A.; Harris, C.B., *J. Phys. Chem.*, **96**, 3591-3598 (1992).

V. Bibliografía

- Schweitzer, G; Xu, L.; Craig, B.; De Schryver, F.C., *Opt. Commun.*, **142**, 283-288 (1997).
- Seabra, S.H.; Souza, W.; Da Matta, R.A., *Exp. Parasitol.*, **100**, 62-70 (2002).
- Seixas de Melo, J. ; Maçanita, A.L., *Chem. Phys. Lett.*, **204**, 556-562 (1993).
- Sevall, J.S., *Mol. Cell. Probes*, **14**, 249-253 (2000).
- Shah, J.; Joshi, N.B.; Pant, D.D., *Indian J. Pure Al. Phys.*, **21**, 677-679 (1983).
- Shah, J.; Joshi, NB.; Pant, D.D., *Curr. Sci.*, **53**, 255-256 (1984).
- Shah, J.; Pant, D.D., *Curr. Sci.*, **54**, 1040-1043 (1985).
- Shaikh, S.; Ruby, A.J.; Williams, G., *Am. J. Ophthalmol.*, **135**, 1-6 (2003).
- Shapiro, R.; Weisgras, J.M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **92**, 422-424, (1970).
- Sharma, S.; Johnson, R.W.; Desai, T.A., *Al. Surf. Sci.*, **206**, 218-229 (2003).
- Sheldon, L., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **83**, 9085-9092 (1986).
- Shizuka, H.; Fukushima, M.; Fujii, T.; Kobayashi, T.; Ohtani, H; Hoshino, M., *Bull. Chem. Soc. Japan.*, **58**, 2107-2112 (1985).
- Shizuka, H.; Ogiwara, T.; Narita, A.; Sumitani, M.; Yoshihara, K., *J. Phys. Chem.*, **90**, 6708-6723 (1986).
- Sheppard, C.W., *J. Al. Phys.*, **19**, 70-76 (1948).
- Shinitzky M., *J. Chem. Phys.*, **56**, 5979-5981 (1972).
- Shiobara, S; Kamiyama, R.; Tajima, S.; Shizuka, H.; Tobita, S., *J. Photochem. Photobiol. A.*, **154**, 53-60 (2002).
- Shizuka, H., *Acc. Chem. Res.*, **18**, 141-147 (1985).
- Shizuka, H.; Fukushima, M.; Fujii, T.; Kobayashi, T.; Ohtani, H; Hoshino, M., *Bull. Chem. Soc. Japan.*, **58**, 2107-2112 (1985).
- Shizuka, H.; Ogiwara, T.; Narita, A.; Sumitani, M.; Yoshihara, K., *J. Phys. Chem.*, **90**, 6708-6723 (1986).
- Sikorska, E.; Koziolowa, A.J., *Photochem. Photobiol. A.*, **95**, 215-221 (1996).
- Sims, P., *J. Biochem.*, **23**, 3248-3260 (1984).
- Singer, V.L.; Jones, L.J.; Yue, S.T.; Haugland, R.P., *Anal. Biochem.*, **249**, 228-238 (1997).

-
- Sjöback, R.; Nygren, J.; Kubista, M., *Spectrochim. Acta A.*, **51**, 7-21 (1995).
 - Slentz, B.E.; Penner, N.A.; Regnier, F.E., *J. Chromatogr. A.*, **984**, 97-107 (2003).
 - Small, E.W.; Libertini, L.J.; Isenberg, I., *Rev. Sci. Instrum.*, **55**, 879-885 (1984).
 - Small, E.W., *Methods Enzymol.*, **210**, 237-279 (1992).
 - 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**, 674-679 (1986).
 - Smith, M.L.; Sanders, J.Z.; Kaiser, R.J.; Heiner, C.; Kent, S.B.H.; Hood, L.E., *Nature*, **321**, 674-679 (1989).
 - Soini, E.; Kojola, H., *Clin. Chem.*, **29**, 65-68 (1983).
 - Solntsev, K.M.; Il' Ichev, Y.V.; Demyashkevich, A.B.; Kuzmin, M.G., *J. Photochem. Photobiol. A.*, **78**, 39-48 (1994).
 - Solntsev, K.M.; Huppert, D.; Agmon, N., *J. Phys. Chem. A.*, **103**, 6984-6997 (1999).
 - Solntsev, K.M.; Huppert, D.; Agmon, N.; Tolbert, L.M., *J. Phys. Chem. A.*, **104**, 4658-4669 (2000).
 - Solntsev, K.M.; Tolbert, L.M.; Cohen, B.; Huppert, D.; Hayashi, Y.; Feldman, Y., *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 9046-9047 (2002).
 - Solntsev, K.M.; Bartolo, E.A.; Pan, G.; Muller, G.; Bommireddy, S.; Huppert, D.; Tolbert, L.M., *Israel J. Chem.*, **49**, 227-233 (2009).
 - Somanath, P.R.; Gandhi, K.K., *Anim. Reprod. Sci.*, **74**, 195-205 (2002).
 - Song, L.; Hennink, E.J.; Young, T.; Tanke, H.J., *J. Biophys.*, **68**, 2588-2600 (1995).
 - Song, L.; Varma, C.A.G.O.; Verhoeven, J.W.; Tanke, H., *J. Biophys.*, **70**, 2959-2968 (1996).
 - Southern, E.M., *J. Mol. Biol.*, **98**, 503-517 (1975).
 - Spears, K.G.; Cramer, L.E.; Hoffland, L.D., *Rev. Sci. Instrum.*, **49**, 255-262 (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.*

V. Bibliografía

- Pharmacol.*, **65**, 361-376 (2003).
- Sriram, K.; Benkovic, S.A.; Miller, D.B.; O'Callaghan, J.P., *Neuroscience*, **115**, 1335-1346 (2002).
 - Stein, R.A.; Ludescher, R.D.; Dahlberg, P.S.; Fajer, P.G.; Bennett, R.L.; Thomas, D.D., *Biochem.*, **29**, 10023-10031 (1990).
 - Stefl, R.; Cheatham, T.E.; Spacková, N.A.; Fadrná, E.; Berger, I.; Koca, J.; Sponer, J., *Biophys. J.*, **85**, 1787-1804 (2003).
 - Straume, M.; Johnson, M.L., *Methods Enzymol.*, **210**, 87-105 (1992).
 - Straume, M., *Methods Enzymol.*, **240**, 89-121 (1994).
 - Stryer, L.; Glazer, A.N.; Oi, V.T., *United States Patent n° 4.520.110* (1985).
 - Su, X.D.; Wu, Y.J.; Knoll, W., *Biosens. Bioelectron.*, **21**, 719-726 (2005).
 - Sugar, I.P.; Zeng, J.; Chong, P.L., *J. Phys. Chem.*, **95**, 7524-7534 (1991).
 - Sujatha, J.; Mishra, A.K., *J. Fluoresc.*, **7**, 169-171 (1997).
 - Suwaiyan, A.; Al-Adel, F.; Hamdan, A.; Klein, U.K.A., *J. Phys. Chem.*, **94**, 7423-7429 (1990).
 - Swietach, P.; Patiar, S.; Supuran, C.T.; Harris, A.L.; Vaughan-Jones, R.D., *J. Biol. Chem.*, **284**, 20299-20310 (2009).
 - Szmecinski, H.; Lakowicz, J.R., *Anal. Chem.*, **65**, 1668-1674 (1993).



- Talavera, E.M.; Álvarez-Pez, J.M.; Ballesteros, L.; Bermejo, R., *Appl. Spectrosc.*, **51**, 401-406 (1997).
- Talavera, E.M.; Afkir, M.; Salto, R.; Vargas, A.M.; Álvarez-Pez, J.M., *J. Photochem. Photobiol. B.*, **59**, 9-14 (2000).
- Talavera, E.M.; Bermejo, R.; Crovetto, L.; Orte, A.; Álvarez-Pez, J.M., *Appl. Spectrosc.*, **57**, 208-215 (2003).
- Tan, W.; Wang, K.; Drake, T.J., *Chem. Biol.*, **8**, 547-553 (2004).
- Tang, C.L.; Rosenberg, W.R.; Ukachi, T.; Lane, R.J.; Cheng, L.K., *Laser*

-
- Focus World*, **26**, 107-111 (1990).
- Tanke, H.J.; Dirks, R.W., *Biotechnol.*, **16**, 49–54 (2005).
 - Teorell, T., *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, **57**, 205-225 (1937a).
 - Teorell, T., *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* **57**, 226-240 (1937b).
 - Thiele, D.; Guschlbauer, W., *Biopolymers*, **8**, 361-378 (1969a).
 - Thiele, D.; Guschlbauer, W., *Biopolymers*, **10**, 143-157 (1969b).
 - Thiele, D.; Guschlbauer, W., *Biochem. Biophys.*, **272**, 22-26 (1969c).
 - Titus, J.A.; Haugland, R.P.; Sharrow, S.O.; Segal, D.M., *J. Immunol. Methods*, **50**, 193-204 (1982).
 - Tolbert, L.M.; Haubrich, J.E., *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 8163-8165 (1990).
 - Tolbert, L.M.; Haubrich, J.E., *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 10593-10600 (1994).
 - Tolbert, L.M.; Solntsev, K.M., *Acc. Chem. Res.*, **35**, 19-27 (2002).
 - Torchinsky, A.; Toder, V.; Savion, S.; Shepshelovich, J., *Diabetologia*, **40**, 635-640 (1997).
 - Tran-Thi, T.H.; Gustavsson, T.; Prayer, C.; Pommeret, S.; Hynes, J.T., *Chem. Phys. Lett.*, **329**, 421-430 (2000).
 - Tsourkas, A.; Bao, G., *Briefing Funct. Genomics Proteomics*, **1**, 372-384 (2003).
 - Turko, B.T.; Nairn, J.A.; Sauer, K., *Rev. Sci. Instrum.*, **54**, 118-120 (1983).
 - Turton, J.A.; Andrews, C.M.; Havard, A.C.; Robinson, S.; York, M.; Williams, T.C.; Gibson, F.M., *Food Chem. Toxicol.*, **40**, 1849-1861 (2002).
 - Tutundjian, R.; Minier, C.; Foll, F.L.; Leboulenger, F., *Mar. Environ. Res.*, **54**, 443-447 (2002).
 - Tyagi, S.; Kramer, F.R., *Nat. Biotechnol.*, **17**, 303-308 (1996).



- Urano, Y.; Kamiya, M.; Kinda, K.; Ueno, T.; Hirose, K.; Nagano, T., *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 4888-4894 (2005).

V. Bibliografía

- Uzhinov, B.M.; Druzhinin, S.I., *Usp. Khim.*, **67**, 140-154 (1998).



- Van den Bergh, V.; Boens, N.; De Schryver, F.C.; Ameloot, M.; Gallay, J.; Kowalczyk, A., *Chem. Phys.*, **166**, 249-258 (1992).
- Van den Bergh, V.; Kowalczyk, A.; Boens, N.; De Schryver, F.C., *J. Phys. Chem.*, **98**, 9503-9508 (1994).
- Van den Bergh, V.; Boens, N.; De Schryver, F. C.; Ameloot, M.; Steels, P.; Gallay, J.; Vincent, M.; Kowalczyk, A., *J. Biophys.*, **68**, 1110-1119 (1995a).
- Van den Bergh, V.; Boens, N.; De Schryver, F.C.; Gallay, J.; Vincent, M., *Photochem. Photobiol.*, **61**, 442-447 (1995b).
- Van den Zegel, M.; Boens, N.; Dames, D.; De Schryver, F.C., *Chem. Phys.*, **101**, 311-335 (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**, 1469-1473 (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**, 5582-5590 (1997).
- Van der Donckt, E., *Prog. React. Kinet.*, **5**, 274-298 (1970).
- Varela, A.P.; Dias, A.; Miguel, M.G.; Becker, R.S.; Maçanita, A.L., *J. Phys. Chem.*, **99**, 2239-2240 (1995a).
- Varela, A.P.; Miguel, M.G.; Maçanita, A.L.; Burrows, H.D.; Becker, R.S., *J. Phys. Chem.*, **99**, 16093-16100 (1995b).
- Vera, J.C.; Rivas, C.I.; Cortes, P.A.; Carcamo, J.O.; Delgado, J., *Anal. Biochem.*, **174**, 38-45 (1988).
- Vermes, I.; Haanen, C.; Steffens-Nakken, H.; Reutelingsperger, C., *J.*

Inmunol. Meth., **184**, 39-51 (1995).

- Vert, F.T.; Sánchez, I.Z.; Torrent, A.O., *J. Photochem.*, **23**, 355-368 (1983).
- Vigil, M.R.; Renamayor, C.S.; Piérola, I.; Lima, J.C.; Melo, E.C.; Maçanita, A.L., *Chem. Phys. Lett.*, **287**, 379-387 (1998).
- Viscidi, R.P.; Connelly, C.J.; Yolken, R.H., *J. Clin. Microol.*, **23**, 311-317 (1986).
- Visser, A.J.W.G.; Van Hoek, A., *Photochem. Photobiol.*, **33**, 35-40 (1981).
- Vogt, B.S.; Schulman, S.G., *Chem. Phys. Lett.*, **95**, 159, (1983).



- Wadsworth, P.; Salmon, E.D., *Methods Enzymol.*, **134**, 519-528 (1986).
- Wahl, P.; Auchet, J.C., *Biochem. Biophys.*, **285**, 99-117 (1972).
- Wang, Z.; Lee, Y.; Fiori, S.; Leung, C.S.; Zhu, Y.S., *Patt. Recog. Lett.*, **24**, 1409-1415 (2003).
- Wang, S.; Gaylord, B.S.; Bazan, G.C., *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 5446-5451 (2004).
- Ware, W. R.; Doemeny, L. J.; Nemzek, T. L., *J. Phys. Chem.*, **77**, 2038-2048 (1973)
- Washbrook, R.; Riley, P.A., *Brit. J. Cancer.*, **75**, 1417-1420 (1997).
- Watson, R.A.; Landon, J.; Shaw, E.J.; Smith, D.S., *Clin. Chim.*, **73**, 51-55 (1976).
- Webb, S.P.; Yeh, S.W.; Phillips, L.A.; Tolbert, M.A.; Clark, J.H., *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, 7286-7288 (1984).
- Webb, S.P.; Philips, L.A.; Yeh, S.W.; Tolbert. L.M.; Clark, J.H., *J. Phys. Chem.*, **90**, 5154-5164 (1986).
- Webb, M.R., *P.N.A.S.*, **89**, 4884-4887 (1992).
- Webb, W.W.; Rigler, R.; Elson E.S., *Appl. Opt.*, **40**, 3969-3983 (2001).
- Weber, K.Z., *Phys. Chem. B.*, **15**, 18-44 (1931).

V. Bibliografía

- Weber, D.G., *Nature*, **190**, 27-29 (1961).
- Weller, A., *Z. Elektrochem.*, **56**, 662-668 (1952).
- Weller, A., *Z. Elektrochem.*, **58**, 849-853 (1954).
- Weller, A., *Naturwiss.*, **42**, 175-176 (1955)
- Weller, A., *Z. Phys. Chem.*, **15**, 438-453 (1958).
- Weller, A., *Prog. React. Kinet.*, **1**, 189-223 (1961).
- Wells, S.; Johnson, I., “*Three-Dimensional Confocal Microscopy: Volume Investigation of Biological Specimens*”, Academic Press (1994).
- Wenska, G.; Skalski, B.; Insinska, M.; Paszyc, S.; Verrall, R.E., *J. Photochem. Photobiol. A.*, **108**, 135-142 (1997).
- Wetmur, J.G.; Davidson, N., *J. Mol. Biol.*, **31**, 349-370 (1968).
- Wiechmann, M.; Port, H.; Laermer, F.; Frey, W.; Elsaesser, T., *Chem. Phys. Lett.*, **165**, 28-34 (1990).
- Willner, I.; Patolsky, F.; Weizmann, Y.; Willner, B., *Talanta*, **56**, 847-856 (2002).
- Wittwer, C.T.; Herrmann, M.G.; Moss, A.A.; Rasmussen, R.P., *Biotechniques*, **22**, 130-131 (1997).
- Woodrooffe C.C.; Won A.C.; Lippard S.J., *Inorg. Chem.*, **44**, 3112–3120 (2005).
- Wu, S.; Dovichi, N.J., *J. Chromatogr.*, **480**, 141-155 (1989).



- Xie, H.; Zhang, C.Y.; Gao, Z.Q., *Anal. Chem.*, **76**, 1611-1617 (2004).
- Xu P.H.; Wang, S.; Korystov, D.; Mikhailovsky, A.; Bazan, G.C.; Moses, D.; Heeger, A., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **102**, 530-535 (2005).



- Yamazaki, I.; Tamai, N.; Kume, H.; Tsuchiya, H. Oba, K.; *Rev. Sci. Instrum.*, **56**, 1187-1194 (1985).
- Yang, R.; Schulman, S.G., *J. Fluoresc.*, **11**, 109-112 (2001).
- Yang, R.; Schulman, S.G., *J. Fluoresc.*, **13**, 89-93 (2003).
- Yao, X.; Li, X.; Toledo, F.; Zurita-Lopez, C.; Gutova, M.; Momand, J.; Zhou, F.M., *Anal. Biochem.*, **354**, 220-228 (2006).
- Yguerabide, J.; *Methods Enzymol.*, **26**, 498-578 (1972).
- Yguerabide, J.; Yguerabide, E.E., “*Optical Techniques in Biological Research. Nanosecond Fluorescence Spectroscopy*”, Academic Press (1984)
- Yguerabide, J.; Talavera, E.M.; Álvarez, J.M.; Quintero, B., *Photochem. Photobiol.*, **60**, 435-441 (1994).
- Yguerabide, J.; Ceballos, A., *Anal. Biochem.*, **228**, 208-220 (1995).
- Yguerabide, J.; Talavera, E.M.; Álvarez-Pez, J.M.; Afkir, M., *Anal. Biochem.*, **241**, 238-247 (1996).
- Yorozu, T.; Hoshino, M.; Imamura, M.; Shizuka, H., *J. Phys. Chem.*, **86**, 4422-4426 (1982).
- Yu, C.; Xu, S.; Chen, S.; Zhang, M.; Shen, T., *J. Photochem. Photobiol. B.*, **68**, 73-78 (2002).



- Zeng, H.H.; Wang, K.M.; Yang, X.H.; Yu, R.Q., *Anal. Chim.*, **287**, 267-273 (1994).
- Zhang, Z.; Grattan, K.T. V.; Hu, Y.; Palmer, A.W.; Meggit, B.T., *Rev. Sci. Instrum.*, **67**, 2590-2594 (1996).

V. Bibliografía

- Zhang, P.; Beck, T.; Tan, W., *Angew. Chem.*, **40**, 402– 405 (2001).
- Zhang, J.; Chen, X.; Hu, Z.; Ma, X., *Anal. Chim.*, **471**, 203-209 (2002).
- Zuckermann, R.; Corey, D.; Schultz, P., *Nucleic Acids Res.*, **15**, 53005-5321 (1987)
- Zuk, R.F.; Rowley, G.L.; Ullman, E.F., *Clin. Chem.*, **25**, 1554-1560 (1979).
- Zuker, M.; Szabo, A.G.; Bramall, L.; Krajcarski, D.T.; Selinger, B., *Rev. Sci. Instrum.*, **56**, 14-22 (1985).

