



**Universitat de les
Illes Balears**

Facultad de Ciencias

Memoria del Trabajo de Fin de Grado

Escuaramidas como agentes de “Quenching” de fluorescencia

Andreu Figuerola Femenias

Grado de Química

Año académico 2015-16

DNI del alumno: 78218692Q

Trabajo tutelado por Antoni Costa

Departamento de Química

S'autoritza la Universitat a incloure aquest treball en el Repositori Institucional per a la seva consulta en accés obert i difusió en línia, amb finalitats exclusivament acadèmiques i d'investigació	Autor		Tutor	
	Sí	No	Sí	No
	X		X	

Palabras clave:

Fluorescencia, atenuación o "quenching", escuaramida, Stern-Volmer.

Índice

1. Resumen.....	1
2. Objetivo.....	1
3. Introducción.....	2
3.1 Procesos de desactivación no radiativos	2
3.2 Espectroscopía de fluorescencia.....	3
3.2.1 desplazamiento Stokes.....	3
3.2.2 Longitud de onda e imagen especular.....	4
3.3 Variables que afectan a la fluorescencia.....	4
3.3.1 Rendimiento cuántico	4
3.3.2 Fluorescencia y estructura.....	4
3.3.3 Efecto de la rigidez estructural.....	5
3.3.4 Efectos de la temperatura y del disolvente	5
3.3.5 Efecto del pH en la fluorescencia	6
3.3.6 Efecto del oxígeno disuelto.....	6
3.3.7 Efecto de la concentración en la intensidad de fluorescencia.	7
3.4 Desactivación por atenuación o "quenching"	8
3.4.1 Teoría de colisión. ("Quenching dinámico") Ecuación Stern-Volmer	8
3.4.2 Teoría de la atenuación estática ("Quenching" estático).	8
3.5 Antecedentes.....	9
4. Procedimiento experimental.....	10
4.1 Síntesis de escuaramidas	10
4.2 Preparación de disoluciones	11
4.3 Procedimiento de adquisición de los espectros de fluorescencia y UV.	13
5. Resultados y discusión	14
5.1 Umbeliferona vs. escuaramidas	14
5.2 Pireno vs. escuaramidas	18
5.3 Rodamina B vs. escuaramidas.....	22
6. Conclusiones.....	26
7. Bibliografía	27

1. Resumen

En este trabajo se ha estudiado varios derivados de escuaramidas como agentes atenuadores o agentes de “quenching” de fluorescencia. En concreto, se ha realizado el estudio sobre tres fluoróforos distintos; a saber la umbeliferona, el pireno y la rodamina B.

Cada uno de estos fluoróforos se ha tratado con cantidades crecientes del agente atenuador midiendo en cada caso la variación de la intensidad de fluorescencia. Los atenuadores utilizados han sido el escuarato sódico y las escuaramidas **2**, **3** y **4**.

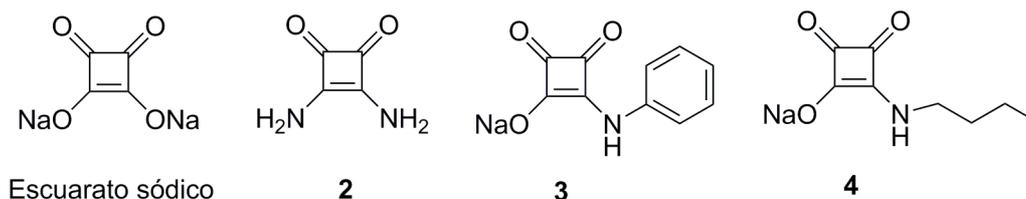


Figura 1. Atenuadores que se han estudiado

Experimentalmente se ha observado que ninguno de los compuestos utilizados como atenuadores afecta a la intensidad de fluorescencia de la rodamina B. Además el escuarato sódico no produce ningún efecto de atenuación sobre ninguno de los fluoróforos utilizado. A partir de este resultado cabe concluir que cualquier efecto de atenuación observado cabe atribuirlo a la presencia de enlaces escuaramida y no al anillo ciclobuten-1,2-diona.

Las escuaramidas **2**, **3**, y **4**, poseen bandas de absorción intensas centradas en 270-290 nm. Como consecuencia producen un efecto de “filtro interno” más o menos acusado sobre la zona de excitación del pireno y de la umbeliferona. Una vez compensado el efecto de filtro interno, se ha observado que la escuaramida **4** produce una atenuación de la emisión de fluorescencia que sigue la ecuación de Stern-Volmer. Sin embargo la escuaramida **3**, una vez corregido el efecto de filtro interno, conduce a un incremento de la intensidad de fluorescencia cuyo origen no ha podido resolverse hasta el momento.

2. Objetivo

El objetivo de este trabajo es estudiar el efecto atenuador (“quenching”) que tienen las escuaramidas sobre distintos fluoróforos. Para realizar el estudio se utilizarán tres fluoróforos representativos, uno de carácter aniónico (umbeliferona), otro neutro (pireno) y uno catiónico (rodamina B).

Cada uno de estos fluoróforos se someterá a la acción de cuatro compuestos derivado del ácido escuárico potencialmente atenuadores de fluorescencia. En casos favorables se evaluará la atenuación de la fluorescencia, aplicando modelos de tipo Stern-Volmer o similar.

3. Introducción

Luminiscencia es el término que se utiliza para describir la emisión de radiación electromagnética, en el rango UV-visible, producida a partir del estado excitado de una molécula. La luminiscencia formalmente se puede dividir en dos categorías, fluorescencia y fosforescencia, dependiendo de la naturaleza del estado excitado.

El diagrama de Jablonski, se utiliza a menudo como el punto de partida para la discusión de absorción de un fotón y de la emisión subsiguiente para ilustrar diversos procesos moleculares que pueden ocurrir en estados excitados. Un diagrama de Jablonski genérico puede verse en la imagen de la Figura 2.

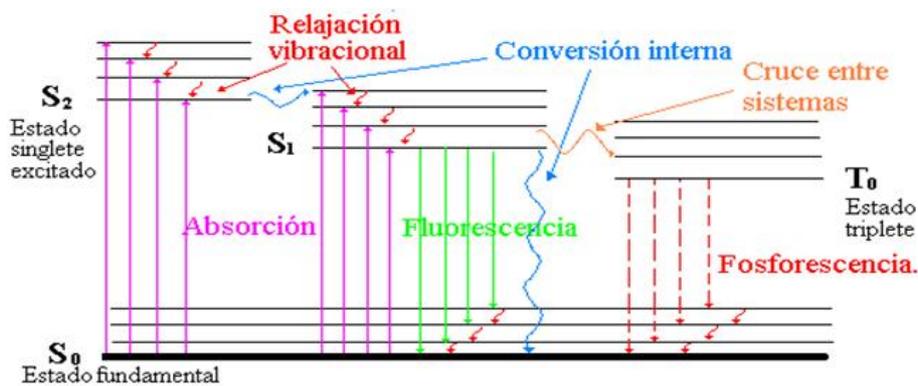


Figura 2. Diagrama parcial de energía para un sistema fotoluminiscente.

Como se puede observar la fluorescencia y la fosforescencia son dos procesos distintos. Estos dos procesos de desactivación implican la emisión de un fotón de longitud de onda mayor de la que ha originado la excitación. La fluorescencia se trata de una transición electrónica permitida, en cambio la fosforescencia implica una transición electrónica desde un estado triplete prohibido. Por ello la emisión de energía mediante fluorescencia tiene un tiempo de vida del orden de 10 ns, en cambio la fosforescencia tiene una vida media mucho mayor, alcanzando los milisegundos o segundos.¹

3.1 Procesos de desactivación no radiativos

La desactivación de un sistema excitado al estado fundamental tiene lugar mediante procesos radiativos: fluorescencia y fosforescencia, y no radiativos.

Entre los procesos no radiativos, el camino más propicio hacia el estado fundamental es aquel que minimiza el tiempo de vida del estado excitado.

- **Relajación vibracional:** El exceso de energía vibracional se pierde inmediatamente como consecuencia de colisiones entre el sistema excitado y las moléculas del entorno; el resultado es una transferencia de energía y un incremento de la temperatura del disolvente.
- **Conversión interna:** Son procesos por los cuales la molécula pasa a un estado electrónico de menor energía sin emisión de radiación. Esta opción suele ser eficaz cuando dos niveles de energía electrónicos están lo suficientemente próximos como para que haya un solapamiento entre los niveles de energía vibracionales. La conversión interna debida a procesos de relajación vibracional intramolecular son muy rápidos (10^{-15} - 10^{-12} s) que los de emisión

radiativa. La conversión interna da lugar a la conocida como “regla de Kasha” según la cual la emisión fluorescente se produce siempre a la misma longitud de onda aunque existan varios niveles excitados (Figura 3).

La quinina² proporciona un ejemplo clásico de este tipo de comportamiento, presenta dos bandas de excitación analíticamente útiles, una centrada a 250 nm y la otra a 350 nm. Sin embargo independientemente de la longitud de onda utilizada para excitar la molécula, la longitud del máximo de emisión es 450 nm, ya que se produce una relajación por conversión interna desde el estado excitado a mayor energía al de menor energía.

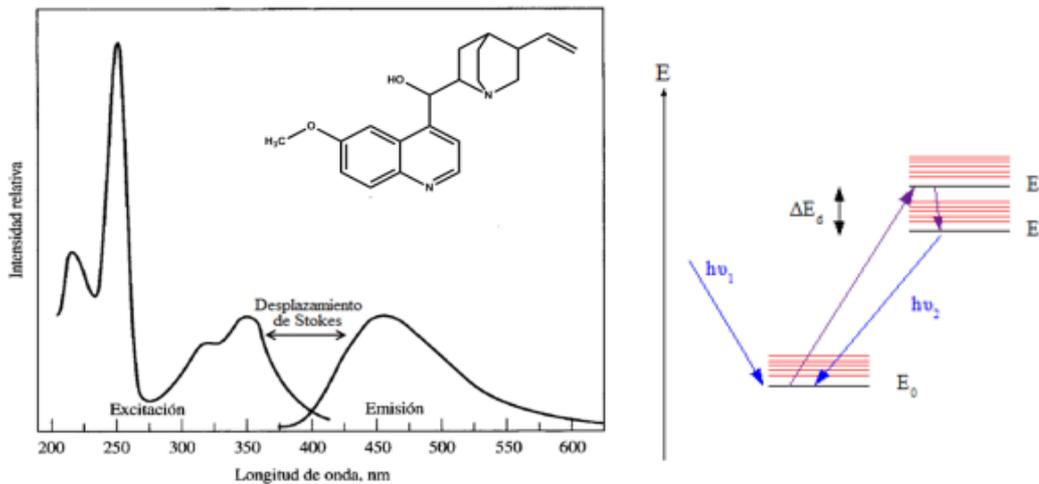


Figura 3. Espectro de excitación y emisión de la quinina en agua.

- **Conversión externa:** La desactivación de un estado electrónico excitado puede incluir la interacción y la transferencia de energía entre la molécula excitada y el disolvente u otros solutos. Estos procesos se denominan procesos de conversión externa o de amortiguación colisional.
- **Cruce entre sistemas:** Es un proceso similar a la conversión interna, la diferencia que presentan es que necesariamente hay un cambio de multiplicidad en el estado excitado.

Estos casos se suele dar en presencia de átomos pesados, tales como bromo o yodo. Los acoplamientos espín/orbital se incrementan en presencia de tales átomos y, de este modo, se favorece un cambio en el espín electrónico.

La presencia de especies paramagnéticas en la disolución, como el oxígeno molecular, también favorece el cruce entre sistemas y consecuentemente disminuye la fluorescencia.

3.2 Espectroscopía de fluorescencia

La espectroscopía de fluorescencia es un fenómeno fotoluminiscente que se da cuando una especie química se excita por medio de radiación electromagnética. Después la especie excitada se relaja al estado fundamental y emite su exceso de energía como fotones. Los espectros de fluorescencia presentan una serie de características generales:

3.2.1 desplazamiento Stokes

Se denomina desplazamiento Stokes a la diferencia de longitud de onda que existe entre el máximo de emisión y el máximo de excitación que coincide con el máximo de adsorción en

UV-vis. Esta diferencia siempre es positiva debido a que la energía de emisión de radiación siempre es menor que la de absorción (Figura 3). Esta pérdida de energía entre la excitación y la emisión sólo se da en moléculas fluorescentes en solución. Una de las causas más comunes de estos desplazamientos es la rápida relajación vibracional en el estado excitado que lo lleva a niveles vibracionales más bajos del estado electrónico excitado.

3.2.2 Longitud de onda e imagen especular

El espectro de emisión mayoritariamente es independiente de la longitud de onda de excitación (Regla de Kasha), a condición de que la frecuencia de excitación este en el rango de absorción de la molécula.

Una de las características de los espectros de fluorescencia, es que el espectro de emisión generalmente es una imagen especular del espectro de absorción. En este caso también existen excepciones (Figura 3), en algunos casos el espectro de emisión no es una imagen especular del de absorción, esto implica que los niveles vibracionales implicados en la molécula son distintos para la emisión y la absorción.

3.3 Variables que afectan a la fluorescencia

La estructura molecular y el entorno químico van a influir en que una sustancia sea o no luminiscente; estos factores también determinan la intensidad de emisión cuando tiene lugar la fotoluminiscencia. En este apartado se considerarán brevemente los efectos de algunas de estas variables.

3.3.1 Rendimiento cuántico

El rendimiento cuántico, o la eficacia cuántica, de la fluorescencia es la relación entre el número de moléculas que emiten fluorescencia respecto al número total de moléculas excitadas.

La discusión sobre los procesos de desactivación sugiere que el rendimiento cuántico de fluorescencia para un compuesto se puede calcular a partir de las constantes de velocidad relativas k_x de los procesos por los que el estado singulete de menor energía se desactiva. – a saber, fluorescencia (k_f), cruce entre sistemas (k_{ces}), conversión externa (k_{ce}), conversión interna (k_{ci}), predisociación (k_{pd}) y disociación (k_d).

Estas relaciones se pueden expresar por la ecuación

$$\Phi = \frac{k_f}{k_f + k_{ces} + k_{ce} + k_{ci} + k_{pd} + k_d} \quad (1)$$

Esta ecuación permite una interpretación cualitativa de muchos de los factores estructurales del entorno que influyen en la intensidad de fluorescencia.

3.3.2 Fluorescencia y estructura

La fluorescencia más intensa y la más útil es la que presentan los compuestos que contienen grupos funcionales aromáticos con transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ de baja energía.

Los compuestos que contienen grupos carbonilo conjugados en estructuras alifáticas también pueden presentar fluorescencia. La mayoría de los hidrocarburos aromáticos no sustituidos son fluorescentes en disolución.

Gran parte de los hidrocarburos aromáticos no sustituidos son fluorescentes en disolución, normalmente la eficacia cuántica se incrementa a mayor número de anillos y con su grado de condensación. Los heterociclos sencillos tales como la piridina y el pirrol, no presentan fluorescencia, pero en cambio los benzoderivados³ sí que la suelen presentar.

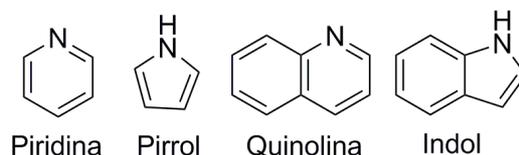


Figura 4. Estructuras de la piridina, pirrol y sus correspondientes benzoderivados fluorescentes.

3.3.3 Efecto de la rigidez estructural

Empíricamente se encuentra que la fluorescencia se ve particularmente favorecida en moléculas que poseen estructuras rígidas.

Por ejemplo, en el siguiente caso compararemos la eficacia cuántica del fluoreno y del bifenilo que son próximas a 1 y 0.2 respectivamente, bajo condiciones de medida similares. La diferencia en el comportamiento parece ser, en gran medida, el resultado de un aumento en la rigidez proporcionado por el puente que forma el grupo metileno en el fluoreno.

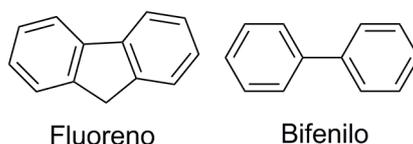


Figura 5. Distintas estructuras fluorescentes, donde se observa que la rigidez estructural nos da un aumento de la fluorescencia.

También se ha recurrido a la influencia de la rigidez estructural para explicar el aumento de la fluorescencia de ciertos agentes quelantes orgánicos cuando están formando un complejo con un ion metálico.

3.3.4 Efectos de la temperatura y del disolvente

La temperatura es un factor que genera variaciones al rendimiento cuántico de la mayoría de moléculas, debido a que, por ejemplo cuando la temperatura se incrementa la probabilidad de que ocurran colisiones es mayor. Este efecto aumenta la probabilidad de desactivación del fluoróforo por conversión externa.

Otro factor a tener en cuenta es el disolvente⁴ en que se realiza la medida, la disminución de la viscosidad del disolvente aumenta la probabilidad de conversión externa. Los disolventes con átomos pesados disminuyen la fluorescencia de las moléculas. Esto es debido a las interacciones espín-orbital que desembocan en un aumento en la velocidad de formación del estado triplete y en la correspondiente disminución de la fluorescencia.

3.3.5 Efecto del pH en la fluorescencia

En un compuesto aromático con sustituyentes ionizables la fluorescencia se verá afectada por el pH. El pH influirá tanto en la longitud de onda como en la intensidad de emisión, tanto de la forma ionizada como de la no ionizada.

Los cambios en la emisión de los compuestos de este tipo surgen del distinto número de especies resonantes asociadas con las formas ácidas y básicas de las moléculas. Por ejemplo, la umbeliferona⁵ presenta una intensidad de fluorescencia menor que su correspondiente anión.

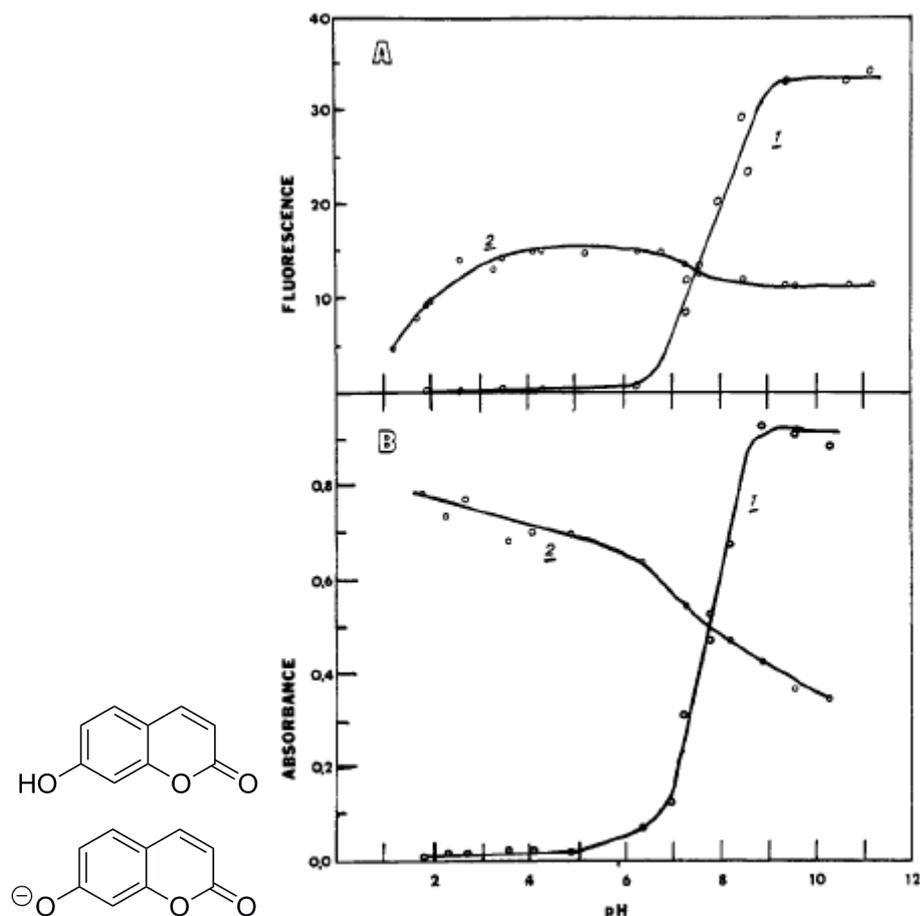


Figura 6. (Izq.) Umbeliferona y su correspondiente anión. (Der.) Intensidad de fluorescencia y absorbancia a diferente pH.

En la forma aniónica el par electrónico del grupo fenóxido entra en conjugación con el anillo aromático, dando lugar a un incremento de la fluorescencia.

La influencia del pH en la fluorescencia de ciertos compuestos se ha utilizado para la detección de puntos finales en valoraciones ácido/base.

3.3.6 Efecto del oxígeno disuelto.

El oxígeno es una molécula paramagnética y como tal favorece la conversión de las moléculas excitadas del fluoróforo desde el estado singlete al estado triplete. Este efecto se traduce a una atenuación (“quenching”) de la intensidad de la emisión fluorescente.⁶

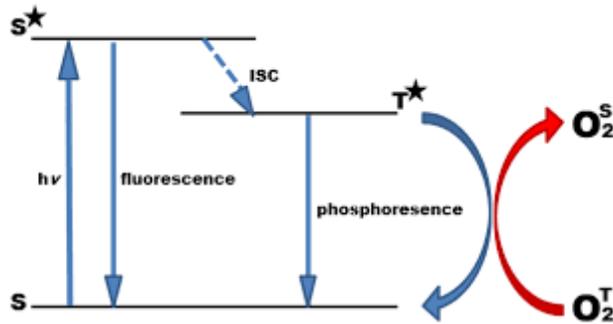


Figura 7. Atenuación por oxígeno.

Adicionalmente, el oxígeno puede oxidar las especies fluorescentes inducidas fotoquímicamente.

3.3.7 Efecto de la concentración en la intensidad de fluorescencia.

La intensidad de la emisión fluorescente (F) es proporcional a la intensidad radiante del haz de excitación absorbido por el sistema. Esto es:

$$F = K'(P_0 - P) \quad (2)$$

Donde P_0 es la potencia del haz que incide sobre la disolución y P es su potencia después de atravesar una longitud b del medio. La constante K' depende de la eficacia cuántica del proceso de fluorescencia. Con el objetivo de relacionar F con la concentración (c) de la especie fluorescente, se acude la Ley de Lambert-Beer¹ de la forma:

$$\frac{P}{P_0} = 10^{-\epsilon bc} \quad (3)$$

Donde ϵ es la absorptividad molar de las moléculas fluorescentes y ϵbc es la absorbancia (A). Sustituyendo se obtiene:

$$F = K'P_0(1 - 10^{-\epsilon bc}) \quad (4)$$

El término exponencial de la ecuación puede desarrollarse como una serie de Maclaurin:

$$F = K'P_0 \left[2,303\epsilon bc - \frac{(2,303\epsilon bc)^2}{2!} + \frac{(2,303\epsilon bc)^3}{3!} \dots \right] \quad (5)$$

Siempre que $2,303 \epsilon bc = A < 0,05$ los términos posteriores al corchete son despreciables respecto al primero; en estas condiciones, el error relativo máximo cometido al desprestigiar todos los términos excepto el primero es de 0,13 %. Por ello se puede escribir:

$$F = 2,3 K' \epsilon bc P_0 \quad (6)$$

O cuando P_0 es constante:

$$F = K c \quad (7)$$

En resumen, la intensidad de fluorescencia es directamente proporcional a la concentración de fluoróforo. A elevadas concentraciones de fluoróforo se producen desviaciones de la linealidad por autoamortiguación y la autoabsorción.

Se denomina autoamortiguación a la colisión entre moléculas excitadas (transferencia de energía por vía no radiante). Es de esperar que la autoamortiguación aumente con la concentración debido a la mayor probabilidad de que ocurran colisiones.

La autoabsorción tiene lugar cuando la longitud de onda de emisión solapa con la banda de absorción; entonces, la fluorescencia disminuye porque la radiación emitida es reabsorbida por otras moléculas fluorescentes al atravesar la disolución.

3.4 Desactivación por atenuación o "quenching"

Cuando hablamos del término atenuación nos referimos a cualquier proceso que reduce la intensidad de fluorescencia. Existen una variedad de causas que originan la atenuación de la intensidad e incluso la desaparición de la banda de emisión de fluorescencia. Entre ellas se incluyen: reacciones en estado excitado, reordenamientos moleculares, transferencias de energía, la formación de complejos en el estado fundamental y la desactivación colisional..

3.4.1 Teoría de colisión. ("Quenching dinámico") Ecuación Stern-Volmer

La teoría de colisión se basa en que la atenuación de la fluorescencia se produce por la colisión entre las moléculas presentes en el medio y la consiguiente transferencia de energía.⁷

La teoría de colisión se describe mediante la ecuación de Stern-Volmer.

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_d \tau_0 [Q] = 1 + K_D [Q] \quad (8)$$

En esta ecuación F_0 representa la intensidad de la emisión fluorescente en ausencia de atenuador y F representa la fluorescencia en presencia del agente atenuador; k_d es la constante de atenuación, τ_0 es el tiempo de vida medio del fluoróforo en ausencia de un atenuador y $[Q]$ es la concentración del atenuador.

La ecuación de Stern-Volmer predice una respuesta lineal de la fluorescencia en función de la concentración del agente atenuador.

3.4.2 Teoría de la atenuación estática ("Quenching" estático).

En el apartado anterior se habla de la atenuación a partir de colisión entre moléculas, en este caso la atenuación se debe a la formación de un complejo en el estado fundamental entre el fluoróforo y la molécula atenuadora.

La intensidad de fluorescencia por lo tanto dependerá de la concentración de este complejo, es decir la constante de formación del complejo (K_S).

$$K_S = \frac{[F-Q]}{[F][Q]} \quad (9)$$

Donde $[F-Q]$ es la concentración del complejo, $[F]$ la concentración del fluoróforo y $[Q]$ es la concentración del atenuador. Por lo tanto la concentración total de fluoróforo viene dada por,

$$[F]_0 = [F] + [F - Q] \quad (10)$$

que si se sustituye en la ecuación:

$$K_S = \frac{[F]_0 - [F]}{[F][Q]} = \frac{[F]_0}{[F][Q]} - \frac{1}{[Q]} \quad (11)$$

A continuación se puede sustituir la intensidad de fluorescencia por la concentración de fluoróforo y si se reordena se obtiene.

$$F_0/F = 1 + K_S[Q] \quad (12)$$

Esta ecuación es idéntica a la descrita con la ecuación de Stern-Volmer, por lo tanto distinguir estos dos tipos de atenuación es difícil, ya que ambas producen una respuesta lineal.

Hay distintos métodos para poder diferenciar entre estos dos tipos de atenuación, el más representativo es mediante el cambio de temperatura.⁸

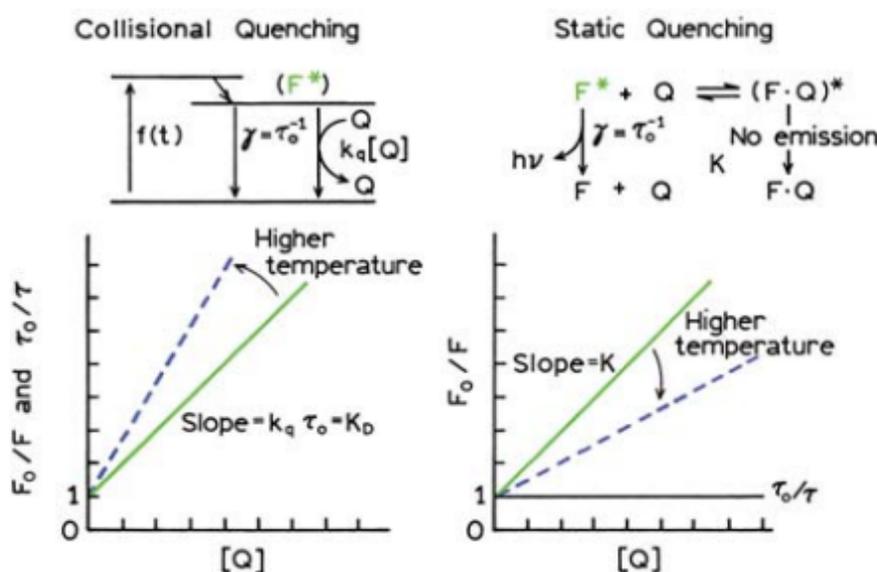


Figura 8. Comparación de atenuación por colisión, estática y efectos de la temperatura

Al tratarse de dos fenómenos distintos la temperatura afectará de manera distinta. En la atenuación por colisión, al aumentar la temperatura las moléculas presentan una mayor movilidad, por lo tanto las colisiones son más frecuentes dando como resultado una mayor atenuación. En el caso de la atenuación estática al aumentar la temperatura la formación de complejos está desfavorecida dando como resultado una atenuación menor.

3.5 Antecedentes

En estudios anteriores del grupo de Química Supramolecular se sintetizó un sensor fluorescente de base escuaramida para fosfolípidos que contenían colina. Se diseñaron y sintetizaron los receptores abióticos sobre la base de unidades no comunes, que son de particular interés como sensores de componentes de membranas celulares.⁹

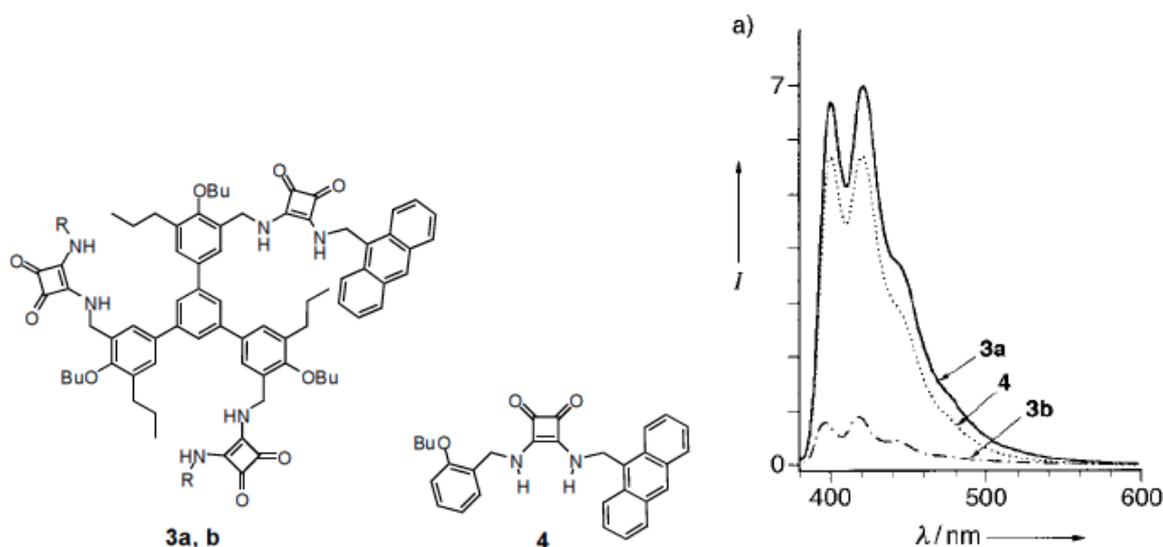


Figura 9. Distintas moléculas que se utilizaron y los espectros que se obtuvieron para cada uno de ellos.

3a R=noctil; **3b** R=4-(N,N-dimetilamino)fenil

En estos estudios se puso de manifiesto que las unidades escuaramida actuaban como atenuadores de fluorescencia del fluoróforo antraceno. Por esta razón en este trabajo se ha estudiado la capacidad atenuadora de algunos derivados simples del ácido escuárico.

4. Procedimiento experimental

El agua utilizada en los procesos de síntesis, elaboración o preparación de muestras se ha purificado por electroósmosis con un equipo ELIX10 (Millipore) y, posteriormente, por tratamiento a través de un equipo MilliQ (Millipore) consiguiendo una resistividad máxima de 18.2 MΩ.

Todos los reactivos y disolventes utilizados han sido adquiridos a través de las casas comerciales Sigma-Aldrich y Scharlau. Las escuaramidas a no ser que se indique la síntesis han sido suministradas por miembros del grupo de Química Supramolecular.

4.1 Síntesis de escuaramidas

Síntesis de escurato sódico.

El ácido escuárico (0.3 g, 2.63 mmol) se disuelve en 10 mL de agua. Se basicifica la disolución con NaOH 1M hasta conseguir un pH ligeramente básico para obtener el escurato sódico. El producto se concentra en rotavapor para obtener la sal de color blanco.

Síntesis de la escuaramida 3.¹⁰

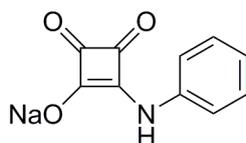


Figura 10. Escuaramida 3.

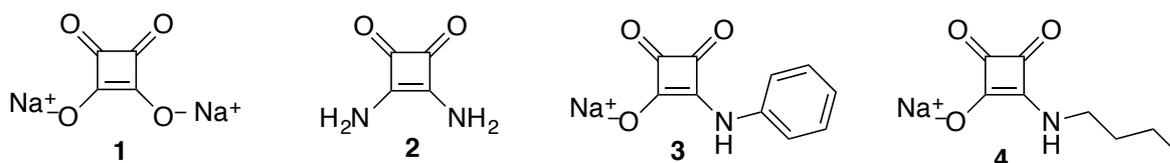
El ácido escuárico (174 mg, 1.53 mmol) se disuelven en agua (4.5 mL) y se le añade anilina (147 mg, 1.58 mmol). Se introduce la disolución en un reactor de microondas (Initiator 2.5) 17 minutos a 100 °C. La disolución se basifica y se lava con éter dietílico, se recoge la parte acuosa y se acidifica, antes de extraer con acetato de etilo. Se recoge la fase de acetato de etilo y se concentra en rotavapor para obtener un precipitado de color blanco sucio. El precipitado se disuelve en la mínima cantidad de agua y se basifica. Se concentra el producto en rotavapor obteniendo un precipitado blanco sucio. Se seca el producto en un desecador con pentóxido de fósforo.

4.2 Preparación de disoluciones

Preparación del tampón. Para la preparación de las disoluciones es necesario hacerlas en un medio tamponado (pH 6.5), ya que se utilizarán fluoróforos que al sufrir variaciones de pH se observaría una variación de la longitud de onda de emisión y la intensidad de la fluorescencia. Este tampón será de una concentración elevada, para que así la fuerza iónica sea un factor que no nos varíe la fluorescencia. Este tampón se utilizará para preparar el resto de disoluciones.

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.6 g, 3.85 mmol) se disuelve en agua (480 mL) obteniendo un pH aproximado de 4.8.¹¹ Se ajusta el pH con una disolución de NaOH 1 M (aproximadamente 2-3 mL) obteniendo un pH de 6.5 y se añade la cantidad restante de agua para un matraz de 500 mL.

Preparación de las disoluciones de las escuaramidas. Procedimiento general. En todos los casos se prepara una disolución madre de mayor concentración (**M1**) y a partir de ella una segunda disolución de menor concentración (**M2**). Las muestras en las que se utilice como fluoróforo la umbiliferona y la rodamina B se prepararán las disoluciones en un 5% de DMSO, ya que hay algunos compuestos que la solubilidad es baja, de este modo ayudamos a su disolución. Cuando utilicemos como fluoróforo el pireno se utilizará un 10% de DMSO, ya que la solubilidad del pireno es extremadamente baja y para mantener los mismos parámetros en todas las disoluciones los atenuadores también se prepararán al 10% en DMSO.



Disoluciones de escuarato sódico 1.

El escuarato sódico (7.9 mg, 0.05 mmol) se disuelve en tampón fosfato (47.5 mL) y se añaden 2.5 mL de DMSO, obteniendo una concentración final de **M1** 1 mM.

Se pipetea 0.5 mL de **M1** y se diluye en un matraz de 50 mL manteniendo la concentración de DMSO, obteniendo una concentración de **M2** 0.01 mM.

Disoluciones de escuaramida 2.

La escuaramida **2** (5.61 mg, 0.05 mmol) se disuelve en DMSO (2.5 mL) y se diluye con tampón (47.5 mL) obteniendo una concentración de **M1** 1 mM. Se pipetea 0.5 mL de **M1** y

se lleva a un volumen final de 50 mL manteniendo la concentración de DMSO, obteniendo una concentración de **M2** 0.01 mM.

Disoluciones de la escuaramida 3.

La escuaramida **3** (5.8 mg, 0.0275 mmol) se prepara siguiendo un procedimiento análogo al descrito en el apartado anterior y se obtiene una concentración de **M1** 1.0 mM. Se pipetea 0.91 mL de **M1** y se lleva a un volumen final de 50 mL manteniendo el 5% de DMSO, obteniendo una concentración de **M2** de 0.01 mM.

Disolución del atenuador 4.

La escuaramida **4** (9.55 mg, 0.05 mmol) se prepara siguiendo el mismo procedimiento que en la escuaramida **2**, obteniendo una concentración de **M1** de 1.0 mM y de **M2** de 0.01 mM.

Disoluciones de los fluoróforos. Los fluoróforos son moléculas que se degradan fácilmente si se dejan expuestos a la luz o en disolución un periodo de tiempo prolongado, por esta razón los fluoróforos se deberán preparar el mismo día en que se deba utilizar.

En todos los casos, se prepara una disolución precursora o "madre" de concentración mayor (**F1**) y a partir de ella por dilución se prepara otra de concentración menor (**F2**). Todas las disoluciones contendrán un 5% de DMSO, exceptuando el pireno que requiere una disolución con 10% de DMSO.

Disoluciones de umbeliferona (7-hidroxycumarina).

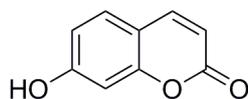


Figura 11. Estructura de la umbeliferona.

La umbeliferona (3.24 mg, 0.02 mmol) se disuelve en DMSO (2.5 mL) y posteriormente se diluye con tampón (47.5 mL) obteniendo una concentración de **F1** de 0.4 mM. Se pipetea 2 mL de **F1** y se lleva a un volumen final de 50 mL manteniendo un 5% de DMSO obteniendo una concentración de **F2** de 0.01 mM. Las disoluciones se envuelven en papel de aluminio y se guardan a baja temperatura (nevera) para que su degradación se la lo más lenta posible. Como se ha comentado anteriormente se trabaja a un pH de 6.5; en este pH la umbiliferona permanece protonada.

Disoluciones de rodamina B.

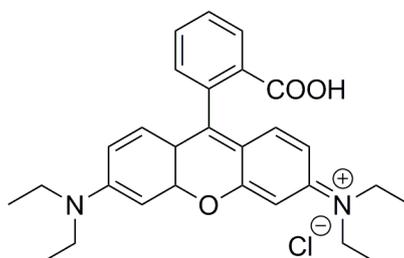


Figura 12. Estructura de la rodamina B.

La rodamina B (2.4 mg, 0.005 mmol) se disuelve como se ha descrito en el caso anterior, obteniendo una concentración de **F1** 1.0 mM. Se pipetea 0.499 mL de **F1** y se llevan a un volumen final de 50 mL manteniendo el 5% de DMSO, obteniendo una concentración de **F2**

de 0.01 mM. Como en el caso anterior se envuelven en papel de aluminio y se introducen en la nevera.

En el pH de trabajo de 6.5 la rodamina B no se ve afectada, la fluorescencia de la rodamina B.¹²

Disolución de pireno.

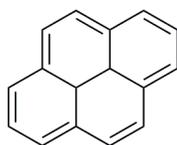


Figura 13. Estructura del pireno.

El pireno (0.5 mg, $2.47 \cdot 10^{-3}$ mmol) se disuelve en DMSO (50 mL) y posteriormente se diluyen con tampón (450 mL) obteniendo una concentración de $4,94 \cdot 10^{-6}$ M. Al terminarla se envuelven con papel de aluminio y se introduce en la nevera.

En el pireno¹³ el pH no influye, ya que no presenta ningún grupo ácido ni básico.

4.3 Procedimiento de adquisición de los espectros de fluorescencia y UV.

Para realizar cada experimento se han preparado 15 muestras utilizando viales de 10 mL con una concentración de fluoróforo constante de 10^{-7} M y la concentración de atenuador variable en un rango de 0 a 1.0 mM. En el caso de la escuaramida **3** la concentración se ha variado de 0 a 0.55 mM.

Los espectros UV se han realizado en cubetas de cuarzo en un espectrofotómetro Agilent Technologies Cary 60 UV-Vis del Grupo de Química Supramolecular. Los espectros de UV-Vis se han obtenido a partir de disoluciones de una concentración de 0.1 mM de los fluoróforos y de todos los atenuadores.

Todos los experimentos se han realizado por triplicado, a temperatura ambiente, utilizando cubetas de cuarzo de 1 cm.

La longitud de onda de excitación para la umbiliferona⁵ y el pireno ha sido de a 330 nm.^{6,14} Las disoluciones de rodamina B se han medido a $\lambda_{exc.} = 527$ nm.^{11,12} El espectrofotómetro utilizado (Shimadzu RF-5301 PC spectrofluorophotometer) del departamento de Química.

5. Resultados y discusión

5.1 Umbeliferona vs. escuaramidás

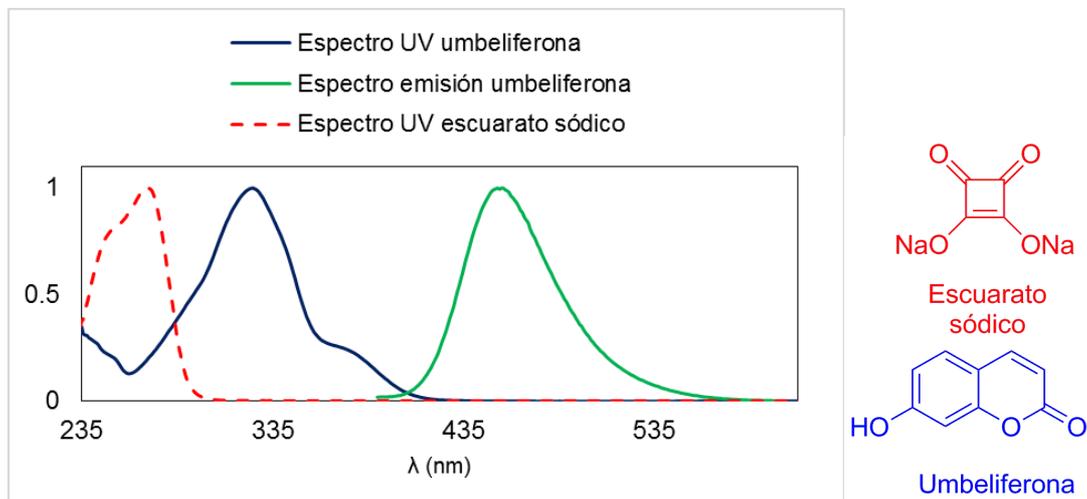


Figura 14. Espectros normalizados de absorción del escuarato sódico y la umbeliferona y espectro de emisión de la umbeliferona ($\lambda_{exc.} = 330$ nm).

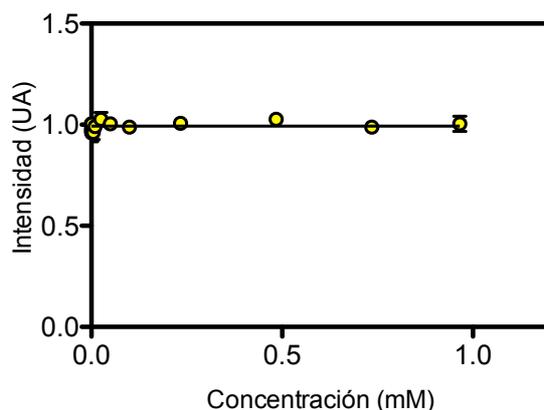


Figura 15. Representación de la intensidad de fluorescencia de la umbeliferona en función de la concentración de escuarato sódico (atenuador/fluoróforo) $_{m\acute{a}x} = 10^4$.

En la Figura 14 la banda de absorción del escuarato sódico no solapa con el máximo de emisión y de excitación de la umbeliferona, por lo tanto no es necesario corregir la fluorescencia.

En la Figura 15 la intensidad de la fluorescencia se mantiene constante en el intervalo de concentraciones, por lo tanto podemos decir que no presenta ningún efecto atenuador sobre la umbeliferona.

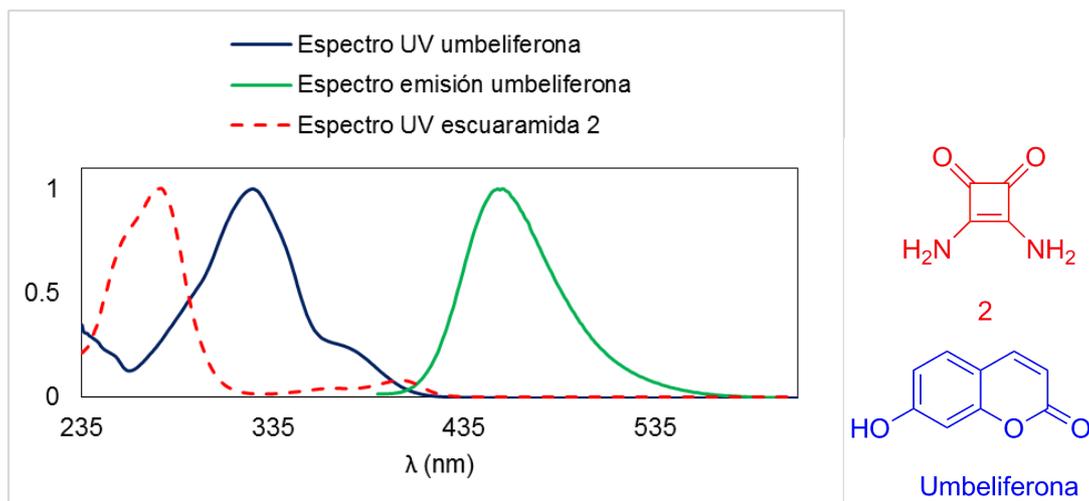


Figura 16. Espectros normalizados de absorción de **2** y la umbeliferona y espectro de emisión de la umbeliferona ($\lambda_{exc.} = 330$ nm).

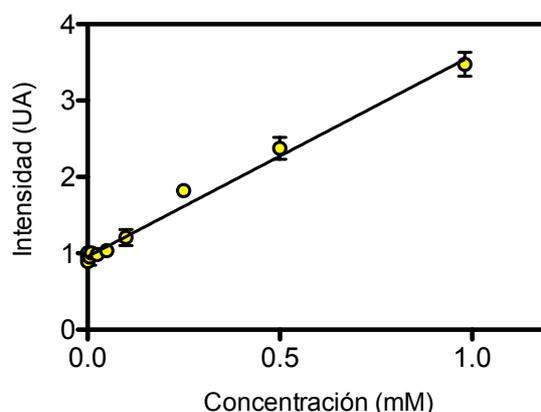


Figura 17. Representación de la intensidad de fluorescencia de la umbeliferona en función de la concentración de **2** (atenuador/fluoróforo) $_{m\acute{a}x} = 10^4$.

La banda de absorción de **2** (Figura 16) no coincide con ninguna banda de absorción ni de emisión de la umbeliferona, por lo tanto no es necesario corregir la fluorescencia. La intensidad de fluorescencia aumenta (Figura 17), con lo cual no presenta ningún efecto de atenuación sino que, al contrario se observa un incremento concentración-dependiente de la intensidad de fluorescencia.

La umbeliferona puede presentar dos formas, la protonada y la aniónica. La intensidad de fluorescencia es mayor en la forma aniónica.⁵ Al pH de la disolución (6.5) hay una pequeña parte que está presente en forma aniónica. Al aumentar la concentración de escuaramida, ésta se compleja^{15,16} (Figura 18) con la forma aniónica haciéndola más estable y por consiguiente desplazando el equilibrio a la forma aniónica, y como consecuencia un aumento de la fluorescencia.

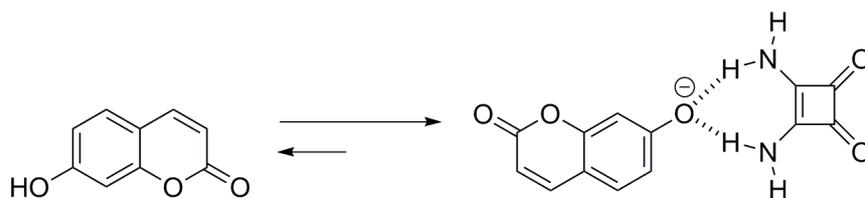


Figura 18. Desplazamiento del equilibrio por estabilidad del anión.

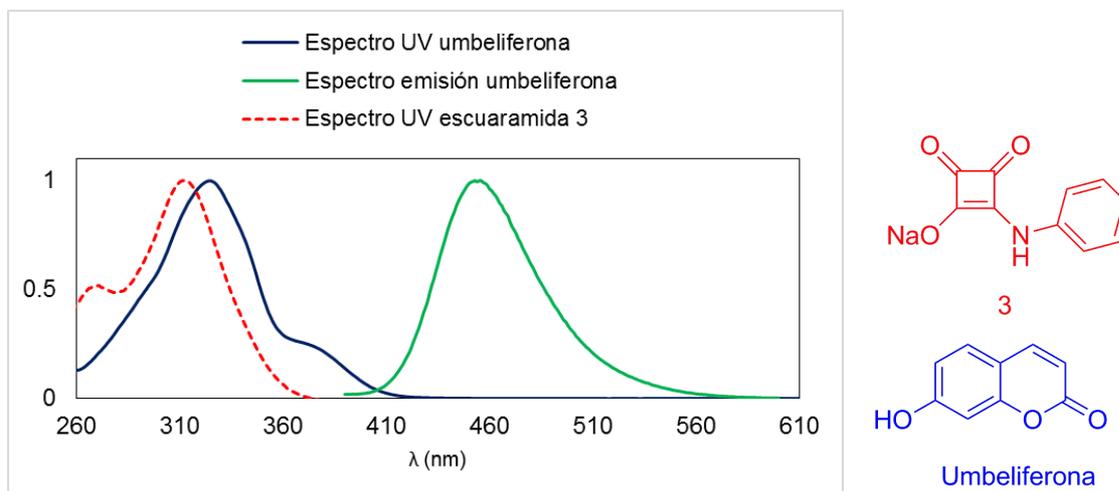


Figura 19. Espectros normalizados de absorción de **3** y la umbeliferona y espectro de emisión de la umbeliferona ($\lambda_{exc.} = 330$ nm).

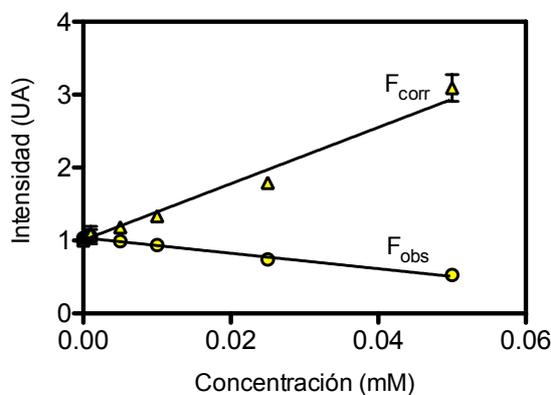


Figura 20. Representación de la intensidad de fluorescencia de la umbeliferona en función de la concentración de **3** (atenuador/fluoróforo) $_{m\acute{a}x}=250$.

La banda de absorción de **3** (Figura 19) prácticamente se solapa con la absorción de la umbeliferona. Por lo tanto la fluorescencia observada debe corregirse para compensar el efecto de “filtro interno” del atenuador. Un método habitual de corrección es el de T. Larson, M. Wedborg y D. Turner¹⁷⁻¹⁸, que se basa en la siguiente ecuación.

$$F_{corr} = F_{obs} \cdot 10^{(A_{exc} + A_{em})/2} \quad (13)$$

Donde F_{corr} corresponde a la fluorescencia corregida, F_{obs} a la fluorescencia observada, A_{exc} a la absorbancia a la longitud de onda de excitación y A_{em} a la absorbancia a la longitud de onda de emisión.

La fluorescencia aumenta (Figura 20), el aumento de la fluorescencia se debe a la misma razón que la escuaramida, al aumentar la concentración de **3** desplaza el equilibrio de la umbeliferona hasta la forma aniónica (Figura 21), haciendo así un aumento de la fluorescencia.

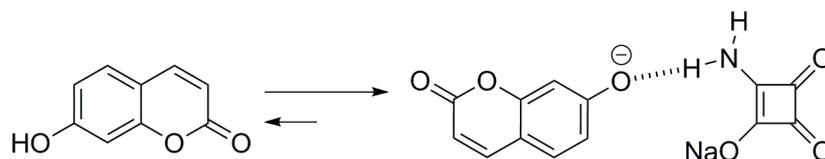


Figura 21. Desplazamiento del equilibrio por estabilidad del anión.

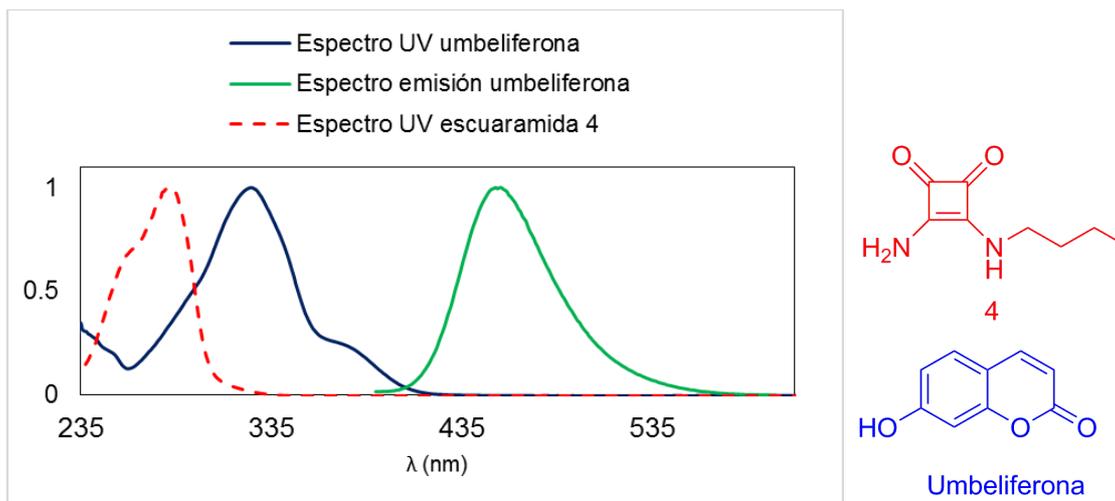


Figura 22. Espectros normalizados de absorción de **4** y la umbeliferona y espectro de emisión de la umbeliferona ($\lambda_{exc.} = 330$ nm).

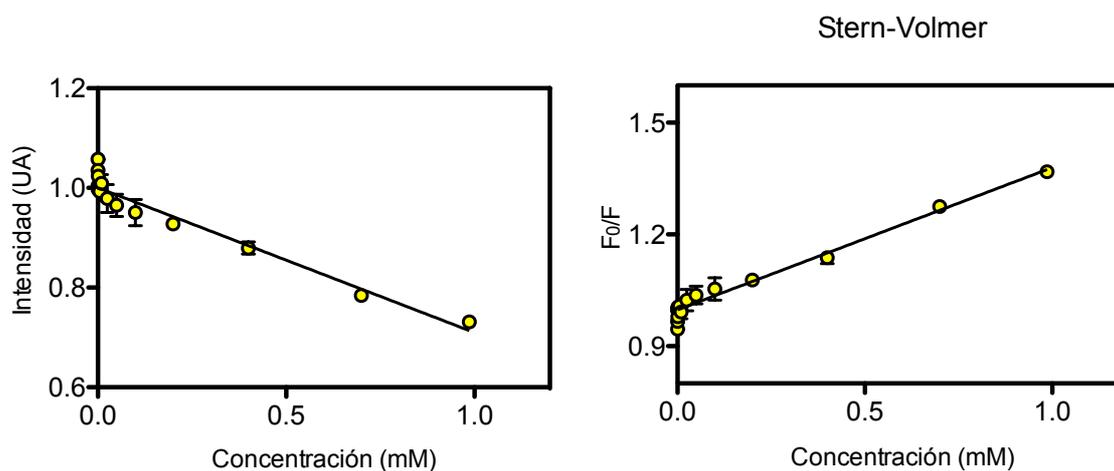


Figura 23. (Izq.) Representación de la intensidad de fluorescencia de la umbeliferona en función de la concentración de la escuaramida **4** (atenuador/fluoróforo) $_{m\acute{a}x} = 10^4$. (Der.) Gráfico Stern-Volmer.

La banda de absorción de **4** (Figura 22) no solapa con la banda de absorción y emisión de la umbeliferona, por lo tanto no hace falta corregir la fluorescencia.

La fluorescencia (Figura 23 Izq.) disminuye progresivamente. Al aplicarle la ecuación de Stern-Volmer¹ cumple la linealidad, por lo tanto podemos afirmar que esta molécula atenúa la emisión de fluorescencia, ya sea por atenuación estática como dinámica.

5.2 Pireno vs. escuaramidás

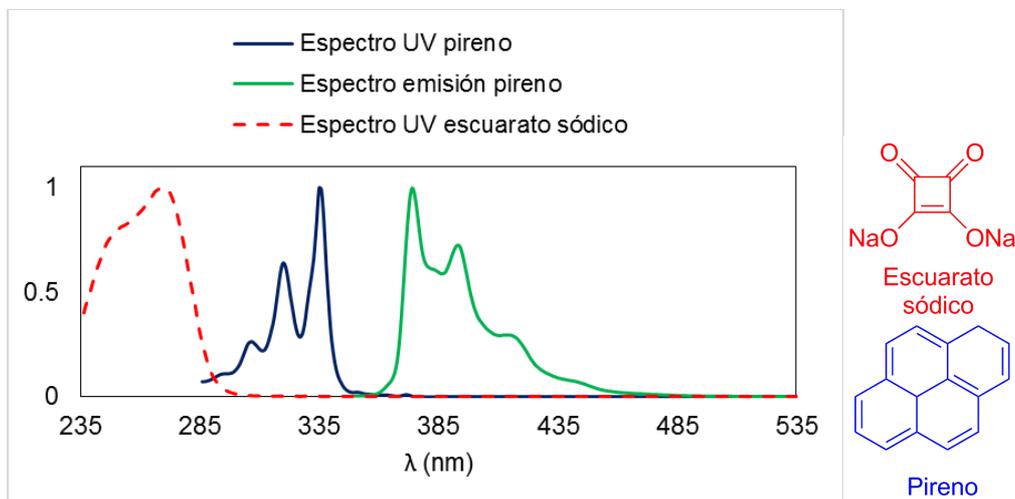


Figura 24. Espectros normalizados de absorción del escuarato sódico y el pireno y espectro de emisión del pireno ($\lambda_{exc.} = 330 \text{ nm}$).

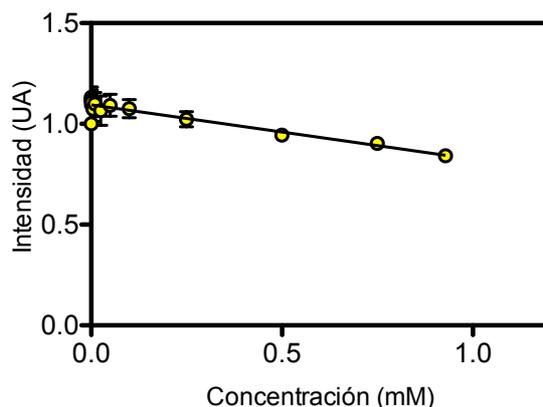


Figura 25. Representación de la intensidad de fluorescencia del pireno en función de la concentración de escuarato sódico (atenuador/fluoróforo)_{máx}= 10^4 .

En la Figura 24 la banda de absorción del atenuador no coincide con las bandas de absorción y de emisión del pireno, por lo tanto no hace falta corregir el valor de la fluorescencia.

En el pireno la intensidad de la fluorescencia (Figura 25) se mantiene constante (< 10%) en todo el rango de concentraciones. Considerando que la concentración del agente atenuador es 10^4 veces superior a la del fluoróforo, podemos concluir que el escuarato sódico no prácticamente no atenúa al pireno.

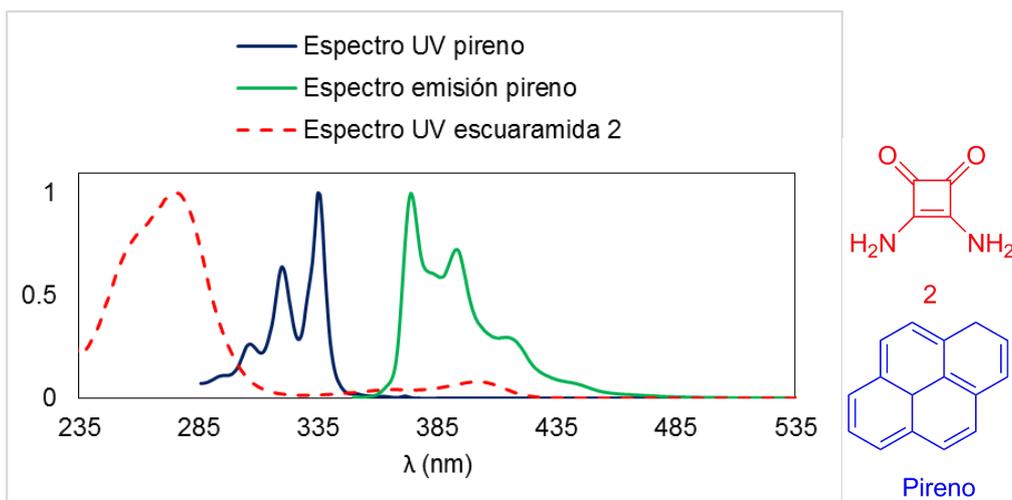


Figura 26. Espectros normalizados de absorción de **2** y el pireno y espectro de emisión del pireno ($\lambda_{exc.} = 330 \text{ nm}$).

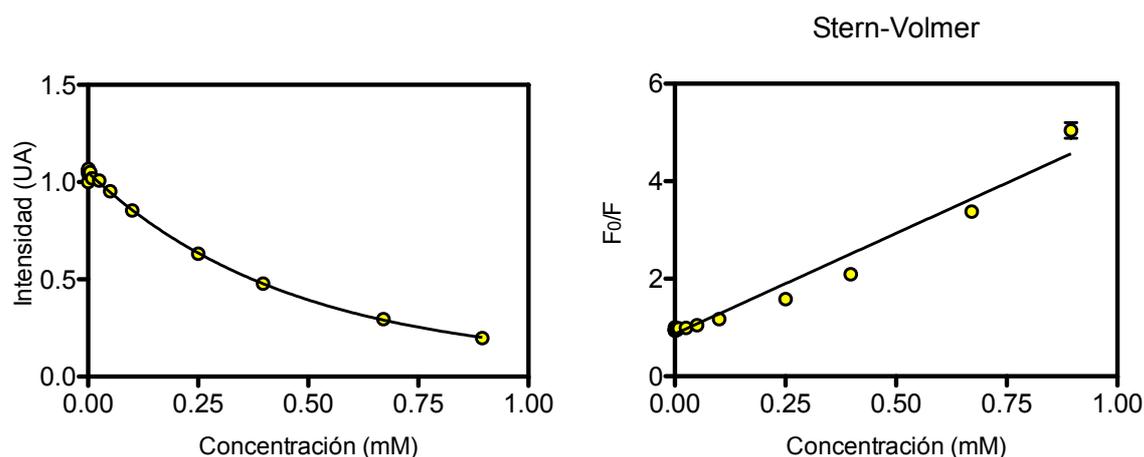


Figura 27. (Izq.) Representación de la intensidad de fluorescencia del pireno en función de la concentración de **2** (atenuador/fluoróforo) $_{m\acute{a}x} = 10^4$. (Der.) Gráfico Stern-Volmer.

En este caso (Figura 27 Izq.) se observa una disminución de la intensidad de fluorescencia, a diferencia de los casos anteriores aquí se aprecia una disminución exponencial. Al aplicar la ecuación de Stern-Volmer¹ (Figura 27 Der.) se puede apreciar que se desvía de la linealidad y tiene una tendencia exponencial. En este caso se debe a una combinación de atenuación estática y dinámica.⁷

La atenuación combinada presenta la siguiente fórmula.

$$\left(\frac{F_0/F-1}{[Q]}\right) = 1 + K_{app}[Q] \quad (14)$$

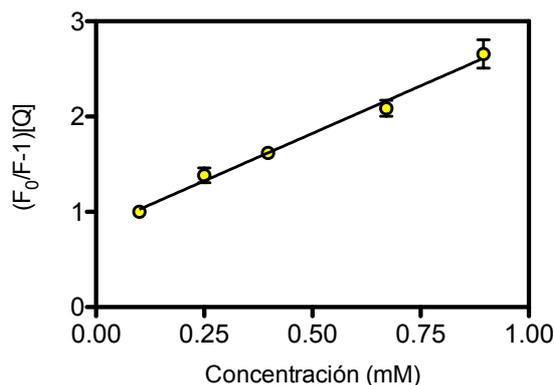


Figura 28. Gráfica de atenuación combinada, estática y dinámica $(\text{atenuador/fluoróforo})_{\text{máx}}=10^4$.

A concentraciones muy bajas de atenuador este fenómeno es difícil de calcular, ya que pequeñas variaciones hacen que no se cumpla la ecuación. Cuando la concentración es mayor, la posibilidad de error es menor, y a partir de aquí se realizan los cálculos. La recta obtenida se presenta en la Figura 28 y sigue la linealidad, por lo tanto podemos afirmar que la atenuación es combinada.

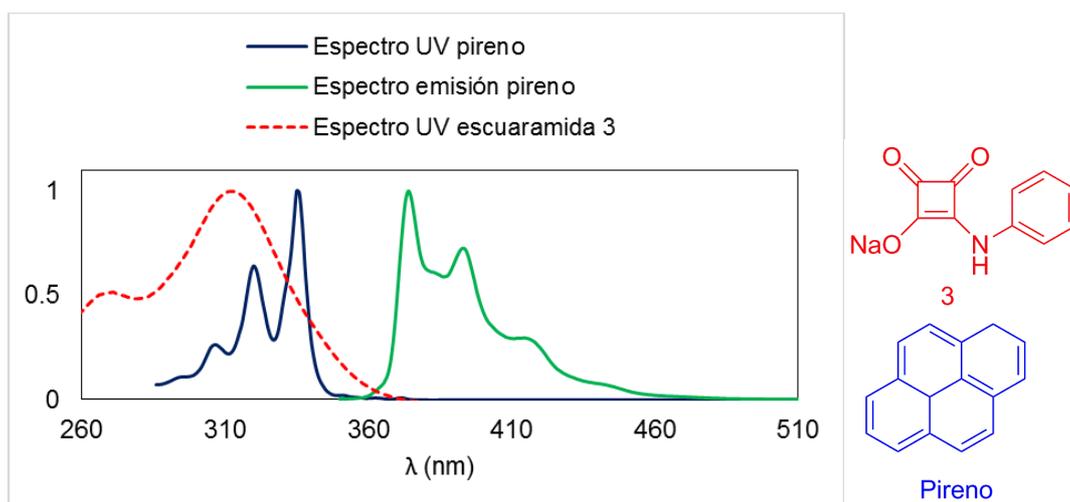


Figura 29. Espectros normalizados de absorción de **3** y el pireno y espectro de emisión del pireno ($\lambda_{\text{exc.}}=330$ nm).

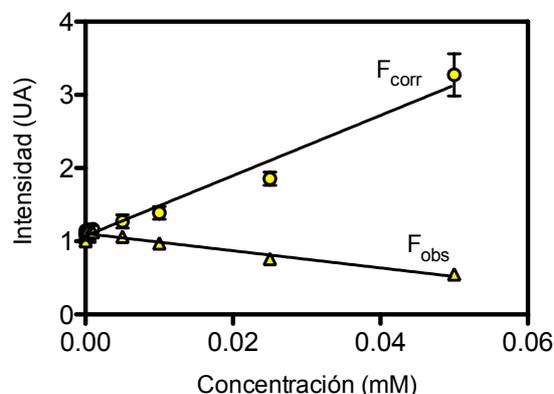


Figura 30. Representación de la intensidad de fluorescencia del pireno en función de la concentración de **3** $(\text{atenuador/fluoróforo})_{\text{máx}}=250$.

La banda de absorción de **3** se solapa con la banda de absorción del pireno (Figura 29), por lo tanto se debe usar la fluorescencia corregida.¹⁷⁻¹⁸ Al utilizar la fluorescencia corregida se observa un incremento linealmente dependiente de la concentración de **3** (Figura 30).

No se ha encontrado ningún motivo concluyente por el cual pueda ser explicado este comportamiento.

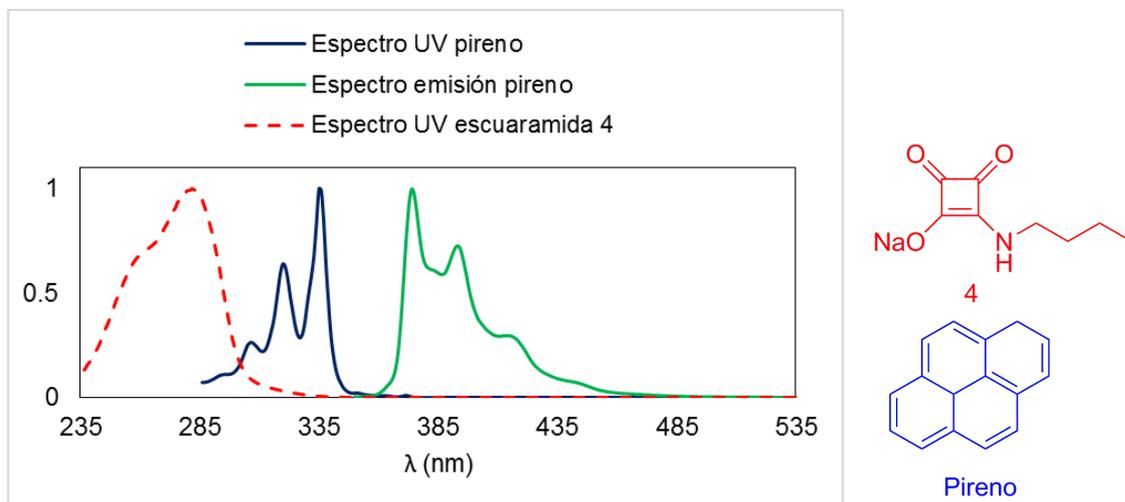


Figura 31. Espectros normalizados de absorción de **4** y el pireno y espectro de emisión del pireno ($\lambda_{exc.} = 330$ nm).

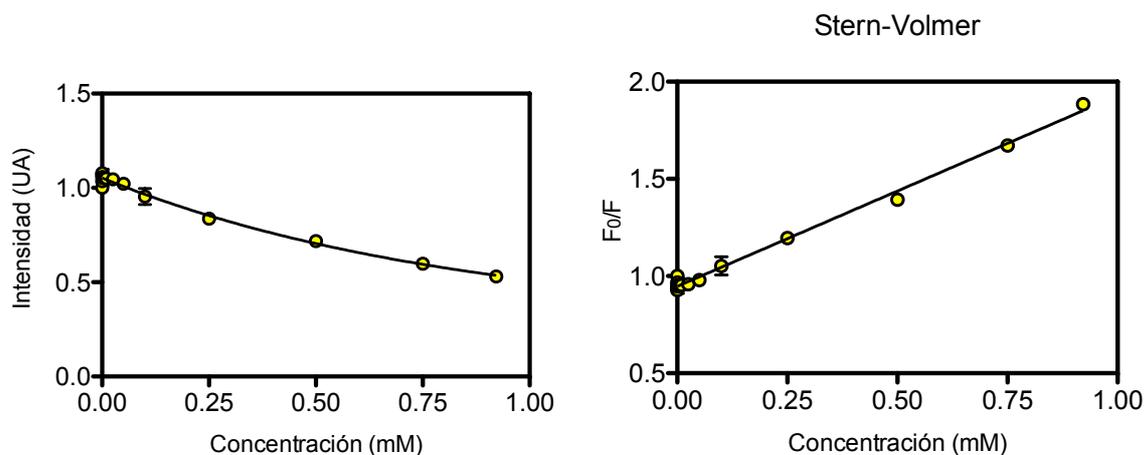


Figura 32. (Izq.) Representación de la intensidad de fluorescencia del pireno en función de la concentración de **4** (atenuador/fluoróforo)_{máx} = 10^4 . (Der.) Gráfico Stern-Volmer

La absorción de **4** (Figura 31) no afecta al pireno por lo tanto no hace falta corregir la fluorescencia.

En la Figura 32 Izq. la intensidad de fluorescencia va disminuyendo gradualmente. Al aplicar la ecuación de Stern-Volmer¹ (Figura 32 Der.) se cumple la linealidad de la ecuación, por lo tanto podemos afirmar que se trata de atenuación estática o dinámica.

5.3 Rodamina B vs. escuaramidas

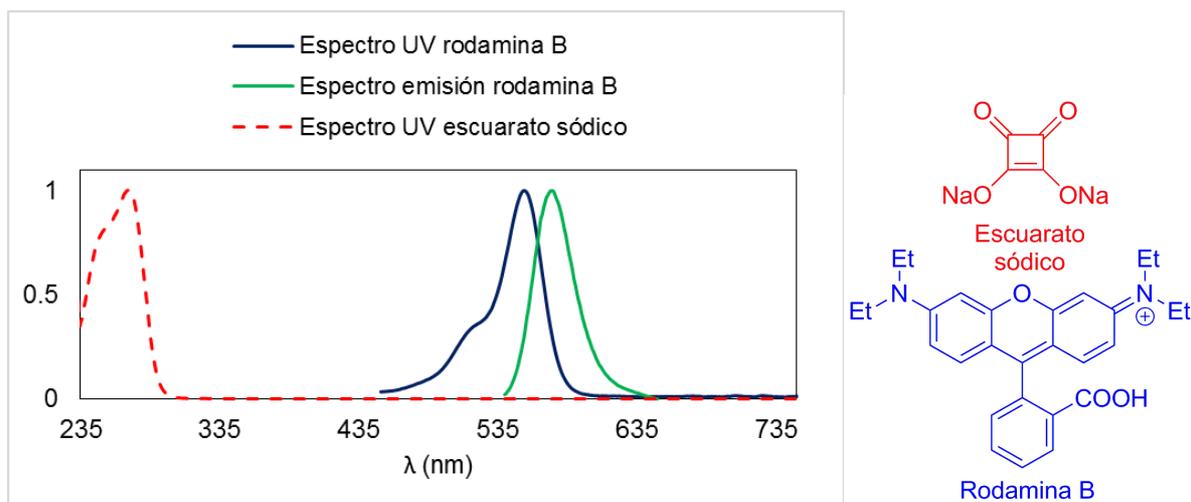


Figura 33. Espectros normalizados de absorción del escuarato sódico y la rodamina B y espectro de emisión de la rodamina B ($\lambda_{exc.} = 527$ nm).

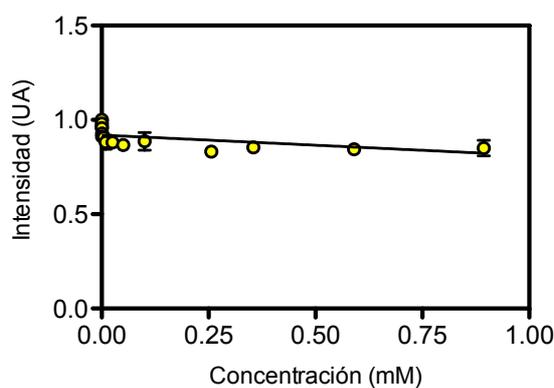


Figura 34. Representación de la intensidad de fluorescencia de la rodamina B en función de la concentración de escuarato sódico (atenuador/fluoróforo) $_{m\acute{a}x} = 10^4$.

En la rodamina B las bandas (Figura 33) de absorción y emisión están a una distancia mucho mayor de los atenuadores, por lo tanto no tendremos que aplicar la corrección de la fluorescencia en ninguno de estos casos.

La fluorescencia (Figura 34) se mantiene constante en todo el rango de concentraciones, entonces podemos afirmar que el escuarato sódico no tiene ningún efecto sobre la rodamina B.

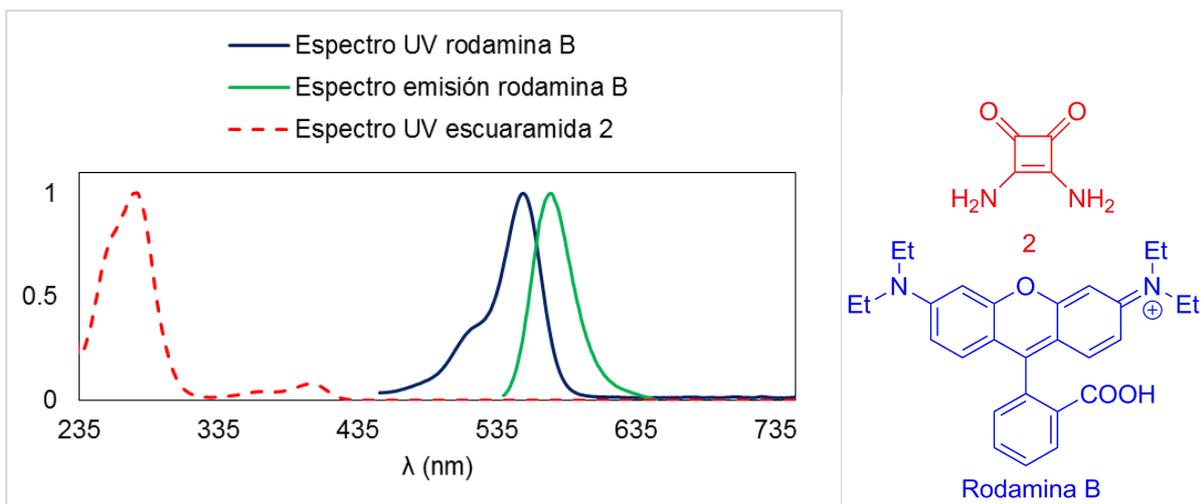


Figura 35. Espectros normalizados de absorción de **2** y la rodamina B y espectro de emisión de la rodamina B ($\lambda_{exc.} = 527 \text{ nm}$).

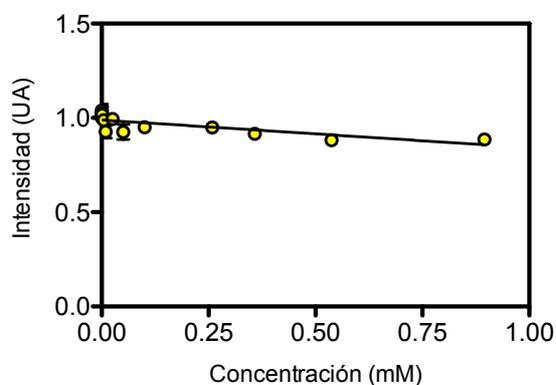


Figura 36. Representación de la intensidad de fluorescencia de la rodamina B en función de la concentración de **2** ($(atenuador/fluoróforo)_{m\acute{a}x} = 10^4$).

La intensidad de fluorescencia (Figura 36) se mantiene prácticamente constante en todo el rango de concentraciones, por lo tanto podemos afirmar que la escuaramida no tiene efecto de atenuación frente a la rodamina B.

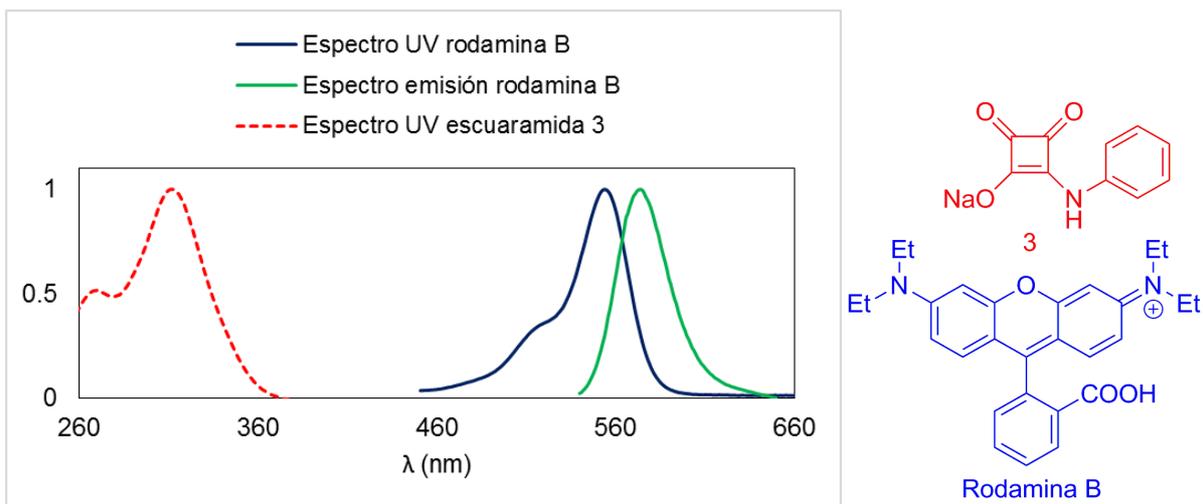


Figura 37. Espectros normalizados de absorción de **3** y la rodamina B y espectro de emisión de la rodamina B ($\lambda_{exc.} = 527 \text{ nm}$).

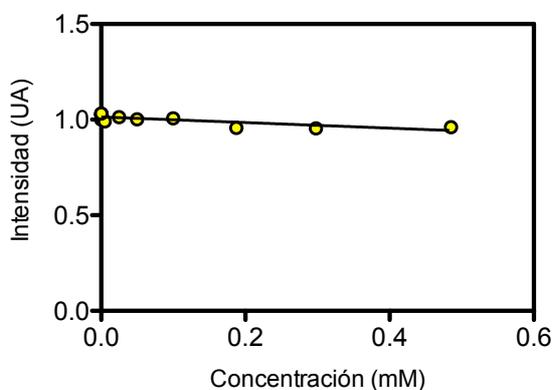


Figura 38. Representación de la intensidad de fluorescencia de la rodamina B en función de la concentración de **3** (atenuador/fluoróforo) $_{m\acute{a}x}=250$.

La intensidad de fluorescencia (Figura 38) se mantiene prácticamente constante en todo el rango de **3**, por lo tanto podemos decir que **3** no tiene efecto atenuador sobre la rodamina B.

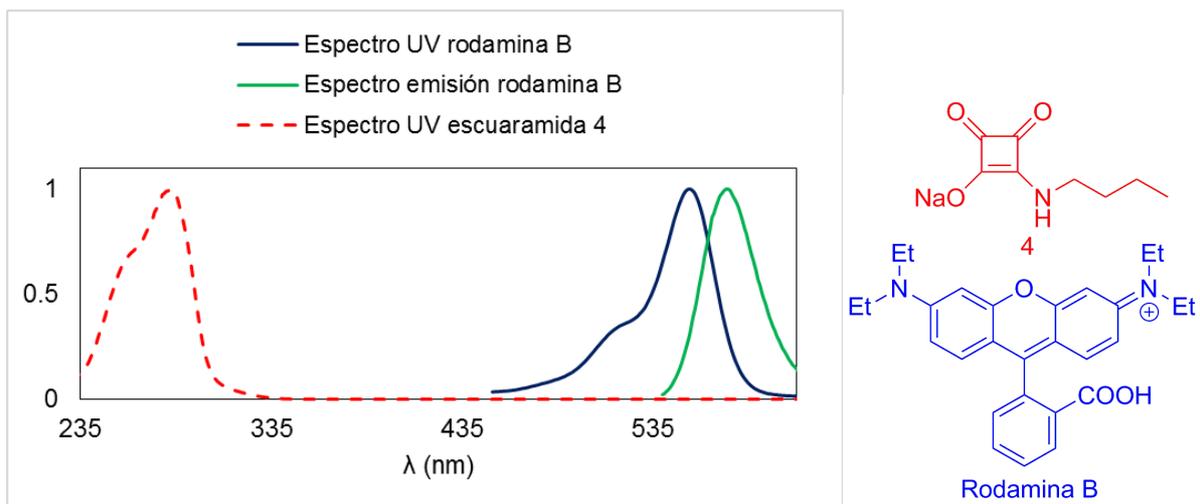


Figura 39. Espectros normalizados de absorción de **4** y la rodamina B y espectro de emisión de la rodamina B ($\lambda_{exc.} = 527 \text{ nm}$).

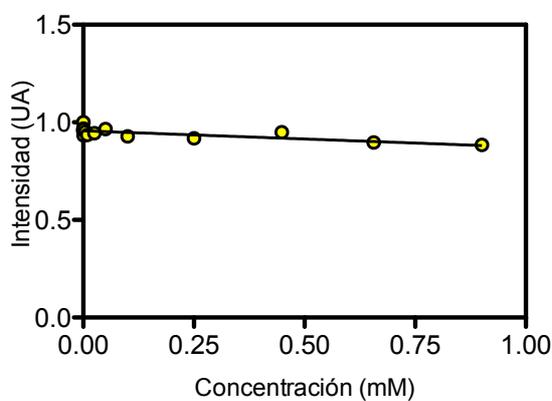


Figura 40. Representación de la intensidad de fluorescencia de R en función de la concentración de **4** ($(atenuador/fluoróforo)_{máx} = 10^4$).

La intensidad de fluorescencia (Figura 40) se mantiene constante en las distintas concentraciones de **4**, por lo tanto podemos afirmar que **4** no atenúa a la rodamina B.

6. Conclusiones

Las conclusiones más importantes de este trabajo son:

- La rodamina B con todos los atenuadores utilizados no presenta ningún tipo de perturbación de la fluorescencia ni se observan efectos de filtro interno.
- Se ha demostrado que el escuarato sódico no presenta ningún efecto atenuante frente a los fluoróforos utilizados.
- La escuaramida **2** y **3** (presenta filtro interno)¹⁷⁻¹⁸ frente a la umbeliferona se ha visto que desplazan el equilibrio ácido-base de la umbeliferona gracias a su capacidad de complejarse¹⁶ con la forma básica de la umbeliferona.
- En la escuaramida **2** con pireno se ha observado que se combina la atenuación dinámica y estática.⁷
- La escuaramida **3** con pireno produce un efecto de filtro interno,¹⁷⁻¹⁸ que, una vez corregido, conduce a un incremento de la fluorescencia, desconociendo la causa de que se provoque dicho aumento.
- Se ha observado que la escuaramida **4** es un agente de atenuación y que cumple la ecuación de Stern-Volmer¹ frente a la umbeliferona y el pireno.

7. Bibliografía

- ¹ Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Crouch, S. R.; González Sergio Cervantes; Anzures María Bruna. *Principios de análisis instrumental*; Cengage Learning. México, **2008**.
- ² Drobnik, J.; Yeagers, E. *J. Mol. Spect.* **1966**, *19* (1-4), 454–455.
- ³ Ravichandiran, P.; Vasanthkumar, S. *Journal of Taibah University for Science* **2015**, *9* (4), 538–547.
- ⁴ Melhuish, W. H. *J. Phys. Chem.* **1961**, *65* (2), 229–235.
- ⁵ Fink, D. W.; Koehler, W. R. *Anal. Chem.* **1970**, *42* (9), 990–993.
- ⁶ Zolkapli, M.; Mahmud, Z.; Herman, S. H.; Abdullah, W. F. H.; Noorl, U. M.; Saharudin, S. *2014 IEEE 10th International Colloquium on Signal Processing and its Applications* **2014**.
- ⁷ Lakowicz, J. R. *Principles of fluorescence spectroscopy*; Kluwer Academic/Plenum: New York, **1999**.
- ⁸ Ahmad, A.; Kurkina, T.; Kern, K.; Balasubramanian, K. *ChemPhysChem* **2009**, *10* (13), 2251–2255.
- ⁹ Tomàs, S.; Prohens, R.; Deslongchamps, G.; Ballester, P.; Costa, A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38* (15), 2208–2211.
- ¹⁰ López, C.; Vega, M.; Sanna, E.; Rotger, C.; Costa, A. *RSC Adv.* **2013**, *3* (20), 7249.
- ¹¹ Piña, M. N.; Soberats, B.; Rotger, C.; Ballester, P.; Deyà, P. M.; Costa, A. *New J. Chem.* **2008**, *32* (11), 1919.
- ¹² Coppeta, J.; Rogers, C. *Experiments in Fluids* **1998**, *25* (1), 1–15.
- ¹³ Rutkaite, R.; Swanson, L.; Li, Y.; Armes, S. *Polymer* **2008**, *49* (7), 1800–1811.
- ¹⁴ Xu, Z.; Singh, N. J.; Lim, J.; Pan, J.; Kim, H. N.; Park, S.; Kim, K. S.; Yoon, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (42), 15528–15533.
- ¹⁵ Quiñonero, D.; Prohens, R.; Garau, C.; Frontera, A.; Ballester, P.; Costa, A.; Deyà, P.M. *Chem. Phys. Lett.* **2002**, *351*, 115-120.
- ¹⁶ Martínez, L.; Sampedro, A.; Sanna, E.; Costa, A.; Rotger, C. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10* (9), 1914.
- ¹⁷ Larsson, T.; Wedborg, M.; Turner, D. *Analytica Chimica Acta* **2007**, *583* (2), 357–363.
- ¹⁸ Wu, W.-H.; Dong, J.-J.; Wang, X.; Li, J.; Sui, S.-H.; Chen, G.-Y.; Liu, J.-W.; Zhang, M. *Analyst*, **2012**, *137* (14), 3224.