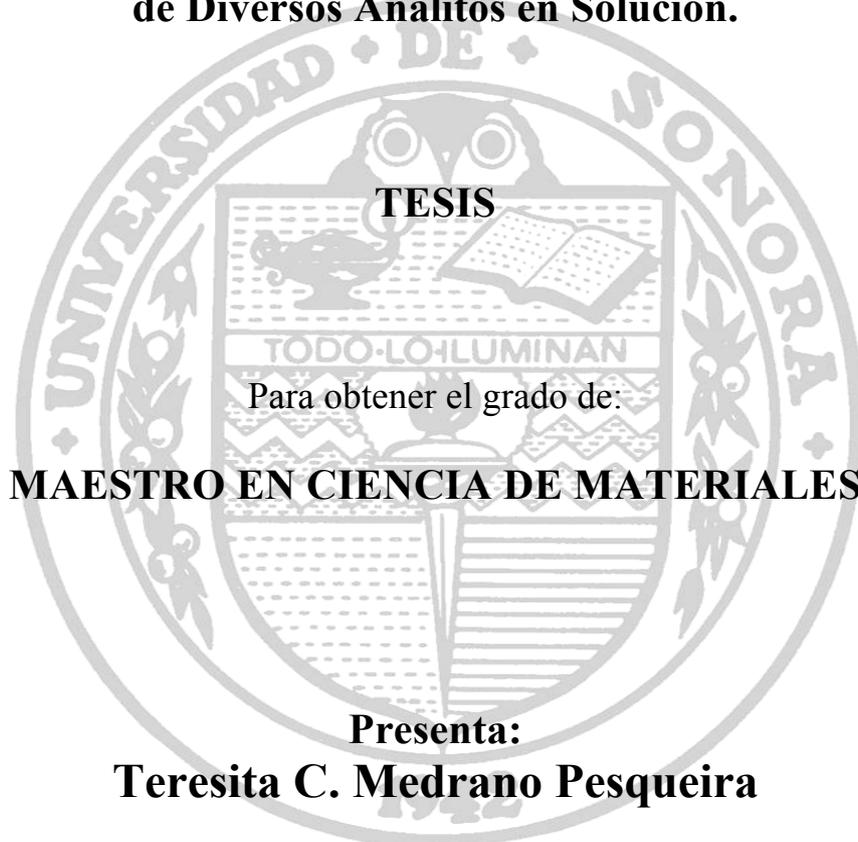


UNIVERSIDAD DE SONORA
DIVISIÓN DE INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN EN
POLÍMEROS Y MATERIALES

**Caracterización Fotofísica de Nuevas Sondas Moleculares
Fluorescentes con Aplicación Potencial en la Determinación
de Diversos Analitos en Solución.**



Hermosillo, Sonora.

Diciembre del 2011

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABLAS.....	v
LISTA DE ANEXOS	vii
RESUMEN	ix
OBJETIVOS	x
Objetivo General.....	x
Objetivos Particulares	x
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES.....	4
2.1. Fluorescencia Molecular.	4
2.1.1. Variables que afectan a la fluorescencia.....	6
2.1.2. Fluorescencia de Estado Estacionario.	12
2.1.3. Tiempo de vida de la fluorescencia.	13
2.1.4. Fluorescencia de Tiempo-Resuelto.	15
2.1.5. Mecanismos de apagamiento de fluorescencia.....	17
2.1.6. Rendimientos Cuánticos.	19
2.2. Generalidades sobre Química Supramolecular.	21
2.2.1. Quimiosensores Fluorescentes para Cationes Metálicos.....	25
2.2.2. Ligantes Bis-Cromofóricos y Formación de Excímeros.	26
2.2.3. El pireno como unidad indicadora en quimiosensores fluorescentes.	31
3. MATERIALES Y MÉTODOS	36
3.1. Diseño Experimental.	36
3.2. Materiales y Equipo Utilizados.	37
3.3. Metodologías.	39
3.3.1. Determinación de la Eficiencia cuántica.	40
3.3.2. Obtención de los Tiempos de Vida Fluorescente.	42
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44

4.1 Determinación de Eficiencia Cuántica.	44
4.2. Determinación de los Tiempos de Vida Fluorescente.....	47
4.3. Determinaciones de tiempos de vida de la fluorescencia y rendimientos cuánticos de complejos de Zn²⁺.	51
5. CONCLUSIONES.	55
6. PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES.....	58
BIBLIOGRAFÍA	59
ANEXOS.....	62
TRABAJOS Y PUBLICACIONES REALIZADAS	75

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de Jablonski que ilustra los procesos probables de excitación y relajación.	4
Figura 2. Diagrama de energía potencial del estado fundamental para un centro de luminiscencia en un cristal iónico huésped.	10
Figura 3. Diagrama de energía potencial para el estado fundamental y el estado excitado para un centro luminiscente.	10
Figura 4. Transferencias de energía no radiativa involucradas en la operación de sensibilización.	12
Figura 5. Principio de reconocimiento por PET (a), PCT (b), formación de excímero (c) y sistemas FRET (d).	18
Figura 6. Representación esquemática de un quimiosensor fluorescente. el mecanismo de la señal de transducción está basado en los cambios conformacionales de su estructura.	26
Figura 7. Diagrama estructural de (i) dímero sandwich de antraceno (R=H) y (ii) fotodímero de antracenos sustituidos (R= CH ₃ , CN, Cl, etc).	31
Figura 8. Formación de excímeros, con su correspondiente bandas de monómero y excímero.	33
Figura 9. Pireno (a), Ácido pirenohexadecanoico (b).	34

Figura 10. Espectros de excitación y emisión de quinina.	41
Figura 11. Diagrama del arreglo experimental.....	42
Figura 12. Imagen del arreglo experimental 1.....	43
Figura 13. Imagen del arreglo experimental 2.....	43

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Rendimientos cuánticos y tiempos de vida de algunos hidrocarburos aromáticos.....	35
Tabla 2. Rendimiento Cuántico (Φ_f) de las moléculas 1-6 en solución acuosa ($1 \times 10^{-6} \text{M}$) a diferente pH ($\lambda_{\text{exc}} = 342 \text{ nm}$).	45
Tabla 3. Tiempos de decaimiento de monómero y excímero de los ligantes 1-6 en solución Acuosa a diferente pH. $[\text{L}] = 1 \times 10^{-6} \text{M}$, $\lambda_{\text{exc}} = 337 \text{ nm}$	50
Tabla 4. Tiempo de decaimiento del Monómero y Excímero en Solución Acuosa en coordinación con el ion metálica Zn^{2+} ($1 \times 10^{-6} \text{M}$) en función del pH ($\lambda_{\text{exc}} = 337 \text{ nm}$), así como el Rendimiento Cuántico utilizando ($\lambda_{\text{exc}} = 342 \text{ nm}$).....	52

LISTA DE ANEXOS

- Figura A 1.** Espectro de emisión del (edta1py) H_2 en solución acuosa en diferentes pH seleccionados. Las intensidades espectrales son normalizadas al pico máximo de la intensidad del espectro. La longitud de onda de excitación $\lambda_{exc}=342\text{nm}$, y la concentración es de $2 \times 10^{-6}\text{M}$. La intensidad de emisión (u.a.) a 490 nm como función del pH. 62
- Figura A 2.** Espectros de emisión de (dtpa1py) H_3 en solución acuosa a diferente pH. $\lambda_{exc}= 342 \text{ nm}$, $[L]= 1 \mu\text{M}$. Recuadro: razón de intensidades I_E/I_M en función del pH.. 63
- Figura A 3.** Espectro de emisión del (ttha1py) H_4 en solución acuosa. Las intensidades espectrales están normalizadas en el pico máximo del espectro más intenso. La longitud de onda de excitación es de $\lambda_{exc} =342 \text{ nm}$, y la concentración de $1 \times 10^{-6}\text{M}$ 63
- Figura A 4.** Espectro de emisión de (edta1mpy) H_2 en solución acuosa a valores de pH seleccionados. Las intensidades espectrales son normalizadas al pico máximo de la intensidad del espectro. La longitud de onda de excitación, $\lambda_{exc}=342 \text{ nm}$, y la concentración es de $1 \times 10^{-6}\text{M}$. La proporción de intensidad de excímero-a-monomero I_E /I_M en función del pH..... 64
- Figura A 5.** Espectro de emisión de (dtpa1mpy) H_3 en solución acuosa a valores de pH seleccionados. Las intensidades espectrales son normalizadas al pico máximo de la intensidad del espectro. La longitud de onda de excitación es, $\lambda_{exc}=342 \text{ nm}$, y la concentración $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ 64
- Figura A 6.** Espectro de emisión de (ttha1mpy) H_4 en solución acuosa a valores de pH seleccionados. Las intensidades espectrales son normalizadas al pico máximo de la intensidad del espectro. La longitud de onda de excitación es, $\lambda_{exc}=342 \text{ nm}$, y la concentración $5 \times 10^{-7} \text{ M}$. La razón de intensidades excímero-monómero I_E/I_M como función del pH. 65

Figura A 7. Espectro de distribución de especies del (dtpalpy)H ₃ en solución acuosa a valores de pH seleccionados, así como la proporción de intensidades.	65
Figura A 8. Espectro de distribución de especies del (tthalpy)H ₄ en solución acuosa a valores de pH seleccionados, así como la proporción de intensidades.	66
Figura A 9. Espectro de distribución de especies del (dpalmpy)H ₃ en solución acuosa a valores de pH seleccionados, así como la proporción de intensidades.	66
Figura A 10. Espectro de distribución de especies del (tthalmpy)H ₄ en solución acuosa a valores de pH seleccionados, así como la proporción de intensidades. La concentración es de 5×10^{-7} M.....	67
Figura A 11. Decaimiento de la intensidad de emisión de (a) excímero ($\lambda=480\text{nm}$) y (b) monómero ($\lambda=395\text{nm}$) de (edtalpy)H ₂ en función del tiempo a diferente pH: 9.0, 8.5, 8.0, 6.0 ; $\lambda_{\text{exc}}=337\text{nm}$, $[L]= 1 \times 10^{-6}\text{M}$. Las líneas sólidas fueron calculadas con la Ecuación 7.	69
Figura A 12. Decaimiento de la intensidad de emisión de (a) excímero ($\lambda=480\text{nm}$) y (b) monómero ($\lambda=395\text{nm}$) de (dtpalpy)H ₃ en función del tiempo a diferente pH: 11.0, 9.0, 8.0, 6.0; $\lambda_{\text{exc}}=337\text{nm}$, $[L]= 1 \times 10^{-6}\text{M}$. Las líneas sólidas fueron calculadas con la Ecuación 7.	70
Figura A 13. Decaimiento de la intensidad de emisión de (a) excímero ($\lambda=480\text{nm}$) y (b) monómero ($\lambda=395\text{nm}$) de (tthalpy)H ₄ en función del tiempo a diferente pH: 11.0, 8.5, 8.0, 6.0; $\lambda_{\text{exc}}=337\text{nm}$, $[L]= 1 \times 10^{-6}$ M. Las líneas sólidas fueron calculadas con la Ecuación 7.	71
Figura A 14. Decaimiento de la intensidad de emisión de (a) excímero, pH 9.0 ($\lambda=480\text{nm}$) y (b) monómero, pH 9.0, 7.0 ($\lambda=395\text{nm}$) de (edtalmpy)H ₂ en función del tiempo. $\lambda_{\text{exc}}=337\text{nm}$, $[L]= 1 \times 10^{-6}\text{M}$. Las líneas sólidas fueron calculadas con la Ecuación 7.	72

Figura A 15. Decaimiento de la intensidad de emisión de (a) excímero ($\lambda=480\text{nm}$) y (b) monómero ($\lambda=395\text{nm}$) de (dtpa1mpy) H_3 en función del tiempo a diferente pH: 11.0 (cuadros abiertos), 9.0 (círculos abiertos), 8.0 (triangulos abiertos), 6.0 (triangulos volteados); $\lambda_{\text{exc}}=337\text{nm}$, $[\text{L}]=1 \times 10^{-6}\text{M}$. Las líneas sólidas fueron calculadas con la Ecuación 7. 73

Figura A 16. Decaimiento de la intensidad de emisión de (a) excímero ($\lambda=480\text{nm}$) y (b) monómero ($\lambda=395\text{nm}$) de (ttha1mpy) H_4 en función del tiempo a diferente pH: 11.0, 8.0, 6.0; $\lambda_{\text{exc}}=337\text{nm}$, $[\text{L}]=1 \times 10^{-6}\text{M}$. Las líneas sólidas fueron calculadas con la Ecuación 7. 74

RESUMEN

En este proyecto de tesis se realizó la caracterización fotofísica de seis ligantes bicromofóricos de cadena abierta, derivados de los ácidos poliamino policarboxílicos edta, dtpa y ttha, funcionalizados con grupos pireno. Los compuestos se designan como (edta1py) H_2 , (dtpa1py) H_2 , (ttha1py) H_2 , (edta1mpy) H_2 , (dtpa1mpy) H_2 y (ttha1mpy) H_2 . La caracterización se realizó en solución acuosa a diferente pH y abarcó mediciones de rendimientos cuánticos y tiempos de vida media de fluorescencia, estas últimas a dos diferentes longitudes de onda, ya que los compuestos muestran un modo dual de fluorescencia de monómero y excímero. Se encontró que en el caso de los derivados de dtpa y ttha, al pH en el cual las moléculas se encuentran totalmente desprotonadas, los rendimientos cuánticos fueron mayores para las que contienen un puente metileno entre el grupo amida y el pireno. Esto indica que el grupo $-CH_2-$ cancela el efecto amortiguador del grupo amida sobre el fluoróforo. La eficiencia cuántica varió siguiendo la misma tendencia que la intensidad de emisión, mostrando valores máximos a los pH donde la intensidad es máxima. En el caso de los derivados de edta, el mayor rendimiento cuántico fue observado para (edta1py) H_2 , lo que se correlacionó con la intensa emisión de excímero que presenta esta molécula en estado desprotonado.

Respecto a las mediciones de tiempos de vida, en todos los sistemas estudiados los tiempos de vida de monómero fueron mayores que los tiempos de vida de excímero. En el caso de los derivados de edta y ttha, los tiempos de vida, tanto de monómero como de excímero, en todas las especies formadas en solución, son mayores para las moléculas que contienen el puente metileno. Esto indica que el puente $-CH_2-$ cancela rutas importantes de desactivación.

Se determinaron también los rendimientos cuánticos y tiempos de vida de fluorescencia de los seis ligantes en presencia de Zn(II) en buffer TRIZMA (tris-(hidroximetil)aminometano) a pH seleccionados. En todos los casos se encontraron incrementos en los rendimientos cuánticos fluorescentes de los ligantes por efecto de la coordinación al metal, lo que revela un incremento en la rigidez de los sistemas y la cancelación de rutas vibratorias de desactivación. Se midieron también los tiempos de vida de los complejos en NaCl 0.01M. Se encontraron tiempos de vida más altos que los observados en buffer, lo que indica que hay una influencia amortiguadora de fluorescencia del TRIZMA sobre la fluorescencia de los complejos.

OBJETIVOS

Objetivo General

Realizar la caracterización fotofísica de una serie de ligantes bis-cromofóricos de cadena abierta, derivados de edta, dtpa y ttha, funcionalizados con pireno, tanto en su forma libre como coordinados a Zn(II).

Objetivos Particulares

1. Determinar los rendimientos cuánticos y tiempos de vida media de fluorescencia de los ligantes en disolución acuosa a diferente pH.
2. Determinar los rendimientos cuánticos y tiempos de vida de los complejos de Zn(II) en disolución acuosa bajo condiciones de pH seleccionadas.
3. Establecer el efecto de la estructura química y estado de protonación de los ligantes en las propiedades fotofísicas evaluadas.
4. Establecer el efecto de la coordinación a Zn(II) en los rendimientos cuánticos y tiempos de vida de los ligantes.

1. INTRODUCCIÓN

La detección de analitos es de gran interés para muchos científicos incluyendo químicos, biólogos y ambientalistas. Existen numerosos métodos analíticos disponibles para la detección de especies químicas, como son la espectrometría de absorción atómica y la cromatografía. Sin embargo, dichas técnicas son caras y a menudo no permiten el seguimiento continuo. Por el contrario, los métodos basados en fluorescencia y absorción electrónica ofrecen distintas ventajas en selectividad, sensibilidad, tiempo de respuesta y costo. Además hay muchas opciones para modular las características fotofísicas de un fluoróforo, como son la introducción de procesos de transferencia de carga o energía, efecto de la presencia de metales pesados y cambios en la densidad electrónica. Esto ofrece la posibilidad para la construcción de quimiosensores eficientes. [MingJian, Y. et al. 2009]

Los quimiosensores son moléculas que son capaces de unirse selectiva y reversiblemente a un analito, lo que resulta en un cambio en las propiedades físicas y químicas del sistema, como el potencial redox, espectros de absorción y fluorescencia, entre otras. Existen dos procesos básicos que ocurren en la detección de un analito: el reconocimiento molecular y la transducción de la señal. Los quimiosensores se componen generalmente de tres unidades: un receptor (para el enlace específico del analito), una unidad señalizadora (las propiedades deben de cambiar una vez que ocurre la complejación) y, eventualmente, un espaciador (que puede cambiar la geometría del sistema y ajusta la interacción electrónica entre las dos mitades). [MingJian, Y. et al. 2009]

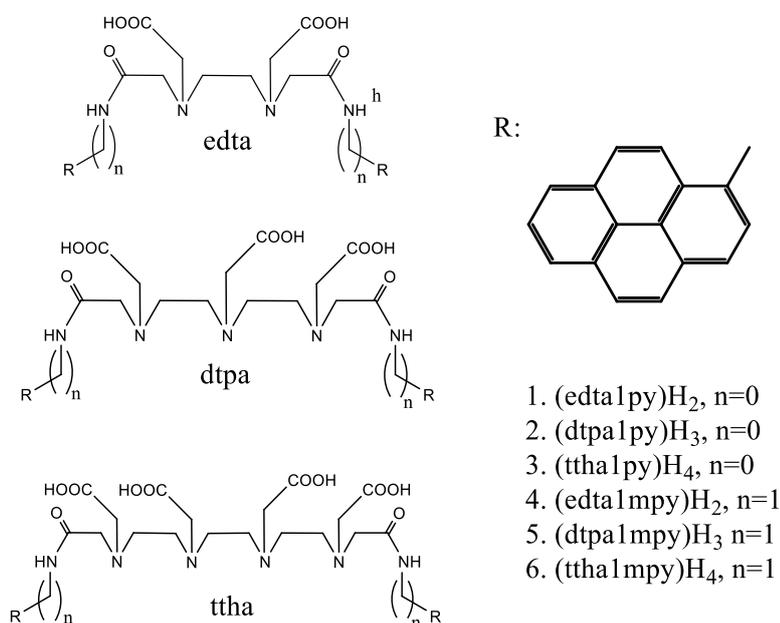
En la actualidad existe un gran interés en el diseño y síntesis de moléculas fluorescentes cuyas propiedades de emisión puedan ser moduladas por factores externos como pH, temperatura, luz, potencial redox e iones metálicos. Sin embargo, la mayoría de los sistemas reportados en la literatura muestran una respuesta simple tipo encendido-apagado (*on-off*) en función de una sencilla emisión de fluorescencia. El desarrollo de interruptores moleculares (*molecular switches*) es de gran interés en la actualidad, ya que permite controlar modos múltiples de la fluorescencia [Shiraishi, Y. et al., 2005].

Existen reportes en la literatura de una diversidad de sistemas moleculares que contienen pireno, los cuales han sido estudiados ampliamente debido a que muestran emisiones distintivas de monómero y excímero. A la fecha se han propuesto varios quimiosensores basados en pireno capaces de mostrar un cambio en las emisiones de monómero y excímero por elementos externos. Algunos de esos sistemas son capaces de mostrar modos duales de fluorescencia en las emisiones del excímero en soluciones acuosas [Shiraishi, Y. et al., 2006].

En los últimos años diferentes grupos de investigación alrededor del mundo han sintetizado una gran cantidad de moléculas que son capaces de funcionar como sensores. Recientemente, en el Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales (DIPM) de la Universidad de Sonora se sintetizaron una serie de ligantes bis-cromofóricos de cadena abierta que presentan grupos fluorescentes pireno en su estructura (**1-6**, Esquema I) [Machi, L. et al., 2009; Pérez-González, R. et al., 2011]. La preparación de estos materiales se ha realizado mediante un método sencillo y eficiente desarrollado por el propio grupo de investigación del departamento. Los nuevos derivados exhiben bandas de emisión monomérica del pireno y otra banda intensa, sin estructura, característica del excímero de pireno. Los compuestos **1-6** tienen características que sobresalen de la variedad de quimiosensores reportados de este tipo. Entre las características que destacan están la alta solubilidad en agua que presentan y la sensibilidad de la fluorescencia a cambios en el pH del medio. Es por ello que los compuestos **1-6** tienen un gran potencial como sensores de pH. [Machi, L. et al., 2009; Pérez-González, R. et al., 2011].

En el trabajo desarrollado recientemente por nuestro grupo, se estudiaron las respuestas fluorescentes de los ligantes bis-cromofóricos **1-6** en función del pH y los cambios conformacionales que experimentan. La dependencia del pH de la intensidad de emisión se correlacionó bien con la distribución de especies determinadas por potenciometría.

Con base en lo anterior y con el propósito de profundizar en el estudio de las propiedades de los compuestos **1-6**, en este trabajo se realizó un estudio fotofísico de los materiales. Se determinaron los tiempos de vida media de la fluorescencia, así como los rendimientos cuánticos a diferente pH.



Esquema 1.

2. ANTECEDENTES

2.1. Fluorescencia Molecular.

La fluorescencia es el proceso de emisión de luz por moléculas que son excitadas con radiación electromagnética. Las especies excitadas se relajan al estado fundamental, liberando su exceso de energía en forma de fotones. Una de las características más atractivas de los métodos de fluorescencia es su sensibilidad inherente, la cual es, con frecuencia, de uno a tres órdenes de magnitud mayor que la de la espectroscopia de absorción. No obstante, los métodos de fluorescencia se aplican mucho menos que los métodos de absorción debido al número relativamente limitado de sistemas químicos que fluorescen.

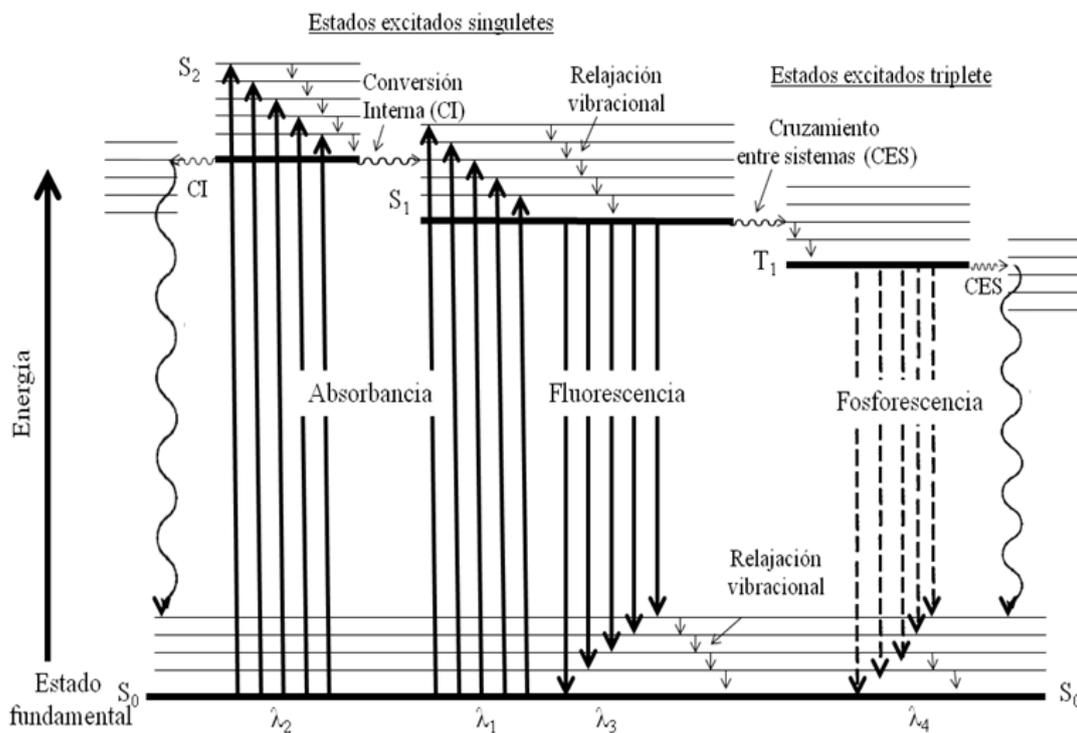


Figura 1. Diagrama de Jablonski que ilustra los procesos probables de excitación y relajación.

Normalmente, el tiempo de vida media de una especie excitada es breve porque hay diversas formas en las cuales un átomo o una molécula excitada liberan su exceso de energía y se relajan a su estado fundamental. Dos de los mecanismos de relajación más importantes son la relajación ó desactivación no radiante (que incluye relajación vibracional y conversión interna) y la relajación fluorescente (fluorescencia). En el diagrama de la Figura 1, conocido como Diagrama de Jablonski, se ilustran los diferentes procesos de desactivación de los estados excitados.

La **relajación vibracional**, señalada por las flechas onduladas cortas entre los niveles de energía vibracionales, tiene lugar durante las colisiones entre moléculas excitadas y las moléculas del disolvente. Durante estas colisiones el exceso de energía vibracional se transfiere a las moléculas del disolvente en una serie de etapas como se indica en la figura. La ganancia de energía vibracional del disolvente se refleja en un ligero incremento de la temperatura del medio. La relajación vibracional es un proceso tan eficiente que el tiempo de vida promedio de un estado vibracional excitado es de 10^{-15} segundos aproximadamente.

Fluorescencia, es un proceso radiativo de relajación que en la figura se ilustra con flechas sólidas. Se puede observar que las bandas de emisión son producidas cuando las moléculas excitadas electrónicamente se relajan a cualquiera de los estados vibracionales del estado electrónico fundamental. De igual forma que las bandas de absorción molecular, las bandas de fluorescencia molecular están formadas por una multitud de líneas espaciadas tan estrechamente que son muy difíciles de resolver.

Conversión interna, es un proceso no radiativo de relajación que ocurre, a través del disolvente, entre niveles excitado y basal. En la Figura se ilustra por las flechas onduladas largas. Este tipo de relajamiento también puede ocurrir entre el nivel vibracional inferior de un estado electrónico excitado y el nivel vibracional superior de otro estado electrónico excitado.

El camino más probable hacia el estado fundamental es aquel que minimiza el tiempo de vida media del estado excitado. Por tanto, si la desactivación por fluorescencia es rápida con respecto a los procesos sin radiación, se observa tal emisión. Por otro lado, si un camino sin radiación tiene una constante de velocidad favorable, la fluorescencia no tiene lugar o es menos intensa.

La fluorescencia, un tipo particular de fotoluminiscencia, está limitada a un número relativamente pequeño de sistemas que incorporan características estructurales que hacen que la velocidad de los procesos de desactivación sin radiación se reduzcan hasta el punto que la reacción de emisión puede competir cinéticamente.

Las bandas de fluorescencia molecular por lo regular se observan a longitudes de onda más largas, y por tanto a energías menores, que la banda de radiación responsable de su excitación. Este desplazamiento hacia longitudes de onda mayores se llama *desplazamiento de Stokes*. En aquellos casos en los que la radiación absorbida sea emitida sin cambio en la longitud de onda (misma energía) se conoce como *radiación de resonancia o resonancia fluorescente*.

Debido a que la diferencia de energía entre los estados vibracionales es aproximadamente la misma, tanto para el estado fundamental como para el excitado, la absorción, o espectro de excitación, y el espectro de emisión o fluorescencia de un compuesto, frecuentemente aparecen como una imagen especular uno de otro con una sobreposición que ocurre en la línea de resonancia.

2.1.1. Variables que afectan a la fluorescencia.

Rendimiento cuántico: El rendimiento cuántico o la eficacia cuántica de la fluorescencia es simplemente la relación entre el número de moléculas que emiten fluorescencia respecto al número total de moléculas excitadas. Las moléculas altamente fluorescentes, por ejemplo, la fluoresceína, tienen eficiencias cuánticas que, en ciertas condiciones, se aproximan a la unidad. Las especies no fluorescentes tienen eficiencias que son prácticamente cero.

Estructura: La fluorescencia más intensa y la más útil es la que presentan los compuestos que contienen grupos funcionales aromáticos. Los compuestos que contienen estructuras alifáticas, alicíclicas o estructuras con dobles enlaces muy conjugados pueden presentar también fluorescencia. La mayoría de los hidrocarburos aromáticos no sustituidos son fluorescentes en disolución, la eficacia cuántica aumenta con el número de anillos y con su grado de conjugación. La sustitución en un anillo aromático causa desplazamientos en la longitud de onda de absorción máxima y los cambios correspondientes en los picos de fluorescencia.

Rigidez estructural: Empíricamente se encuentra que la fluorescencia está particularmente favorecida en moléculas que poseen estructuras rígidas. Por ejemplo, las eficacias cuánticas para el fluoreno y el bifenilo están próximas a 1.0 y 0.2, respectivamente, bajo condiciones similares de medida. La influencia de la rigidez también tiene importancia en el aumento de la fluorescencia de ciertos quelantes orgánicos cuando están formando un complejo con un ion metálico. Por ejemplo, la fluorescencia de la 8-hidroxiquinoleína es mucho menor que la de su complejo con zinc.

Temperatura y disolvente: La eficacia cuántica de la fluorescencia disminuye en muchas moléculas con el aumento de la temperatura, ya que el aumento de la frecuencia de las colisiones a temperatura elevada hace aumentar la probabilidad de desactivación no radiante (conversión externa). Una disminución en la viscosidad del disolvente también aumenta la probabilidad de conversión externa y produce el mismo resultado.

Efecto del pH: La fluorescencia de un compuesto aromático con sustituyentes ácidos o básicos en el anillo depende normalmente del pH. Tanto la longitud de onda como la intensidad de emisión son probablemente diferentes para la forma ionizada y no ionizada del compuesto. Por lo tanto es muy frecuente en los métodos fluorimétricos el control estricto del pH.

Efecto de la concentración: La potencia de la radiación fluorescente F es proporcional a la potencia radiante del haz de excitación que es absorbido por el sistema [Skoog, D.A. et al., 2001].

La fluorescencia es un caso particular de luminiscencia en el que la excitación óptica de un cromóforo y la emisión desde el mismo, tienen lugar a través de estados electrónicos singletes. Algunas sustancias naturales, como las proteínas, muestran fluorescencia intrínseca como resultado de la presencia de grupos aromáticos en su estructura (triptófano, tirosina, fenilalanina, etc.). Sin embargo, en ocasiones es

necesario introducir fluoróforos extrínsecos (fluoresceína) con el fin de adecuar las propiedades espectrales de las sustancias a las necesidades de cada experimento.

La determinación de la intensidad de fluorescencia se puede realizar en estado estacionario, es decir, con excitación y observación constantes. También se pueden realizar determinaciones con resolución temporal, cuando la muestra se excita, por ejemplo por un pulso de luz de muy corta duración y la emisión se detecta por medio de un sistema de alta velocidad. El tiempo de vida media de fluorescencia de un fluoróforo es el tiempo promedio que la molécula permanece en el estado excitado antes de decaer al estado fundamental. Los tiempos de vida media de fluorescencia de los fluoróforos utilizados comúnmente suelen ser del orden de 2-15 ns. Debido a la corta escala de tiempos de la fluorescencia, las medidas de fluorescencia resueltas en el tiempo requieren métodos ópticos y electrónicos muy complejos. A pesar de las dificultades experimentales, los estudios de fluorescencia con resolución temporal son muy útiles debido al gran volumen de información que proporcionan, en comparación con la información (promediada temporalmente) que se obtiene a partir de las medidas de estado estacionario. Los métodos habitualmente utilizados para medir intensidades de fluorescencia en la zona ultravioleta-visible pueden trabajar en el dominio del tiempo o de frecuencias. En el presente trabajo se ha utilizado el primero de los dos métodos, de dominio de tiempo, en el que la muestra se excita con un pulso de luz y se mide la variación temporal de la intensidad de fluorescencia.

El éxito de la espectroscopía de fluorescencia para los estudios dinámicos y estructurales de sistemas biológicos se debe a su gran sensibilidad, a su capacidad de respuesta a cambios en el microentorno de la molécula emisora, debido a la especificidad de las características de la fluorescencia (espectros, rendimiento cuántico, tiempos de vida media...) y a la posibilidad de proporcionar información espacial y temporal [Zorilla-López, S., 2002].

La energía potencial de los estados electrónicos fundamentales y excitados del centro luminiscente es graficada contra una coordenada general, la cual es frecuentemente la distancia internuclear. Esto se muestra esquemáticamente para el estado fundamental en la Figura 2: La curva sólida muestra cualitativamente como la energía potencial varía como una función de la distancia interatómica. Esta pasa por un mínimo en la longitud de enlace de equilibrio, R_e . Dentro de estos estados fundamentales, son posibles diferentes estados vibracionales del ion positivo, como se muestra por las líneas horizontales V_0 , V_1 , etc.

Cada estado electrónico para el centro luminiscente tiene una curva de energía potencial similar a la de la Figura 2. Una curva típica para un estado excitado se muestra en la Figura 3; usando este diagrama es posible explicar muchas de las formas de la luminiscencia.

Primero, el proceso de excitación involucra la migración del centro activo desde su estado fundamental, nivel A, dentro de un mayor nivel vibracional del estado excitado, B. Segundo, parte de esta energía es entonces disipada rápidamente por el ion a un nivel más bajo, C, en el estado excitado. Esta energía perdida por el cristal huésped aparece como calor. Tercero, el centro activo retorna a su estado fundamental, nivel D o A, emitiendo luz. La energía de excitación $A \rightarrow B$ es mayor que la de emisión $C \rightarrow D$, la radiación emitida es de menor longitud de onda que la radiación de excitación. Esta diferencia en la longitud de onda se conoce como cambio Stokes.

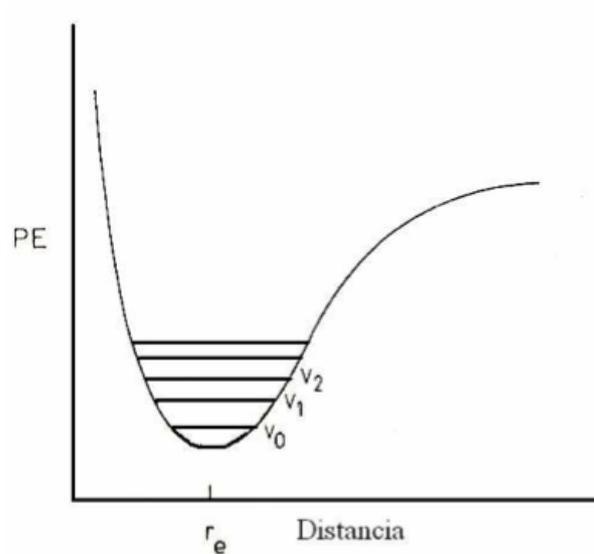


Figura 2. Diagrama de energía potencial del estado fundamental para un centro de luminiscencia en un cristal iónico huésped.

Un efecto conocido como “quenching” térmico, en el cual la eficiencia de la luminiscencia decrece marcadamente cerca de cierta temperatura, puede también ser explicado con la ayuda de la Figura 3. Las curvas de energía potencial de los estados fundamentales y excitados sobrepasan el punto E. En este punto, un ion en el estado excitado puede regresar a su estado fundamental, con la misma energía. Así puede entonces retornar a los niveles de energía más bajos del estado fundamental en una serie

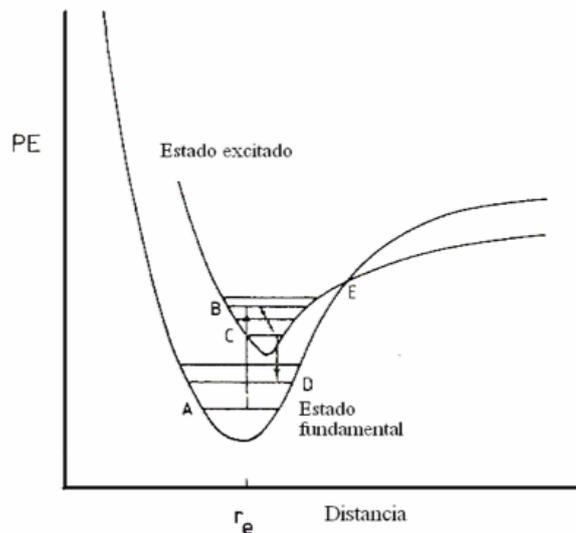


Figura 3. Diagrama de energía potencial para el estado fundamental y el estado excitado para un centro luminiscente.

de transiciones vibracionales. Debido a lo anterior, el punto E representa una especie de punto de derrame. Si un ion en el estado excitado puede adquirir suficiente energía vibracional para alcanzar el punto E, éste puede desbordarse dentro de los niveles vibracionales del estado fundamental. Si esto sucede, toda la energía es liberada como energía vibracional y no ocurre luminiscencia. La energía del punto E es obviamente crítica. En general, este punto también es alcanzado como consecuencia del incremento de la temperatura, puesto que, con la elevación de la temperatura los iones tienen un incremento de la energía térmica y son capaces de moverse progresivamente a niveles de mayor energía vibracional.

El tipo de transición descrita arriba, explica porque el “quenching” térmico es un ejemplo de transición no radiativa. En este proceso el ion excitado se deshace de una parte de su exceso de energía por impartición de energía vibracional en el entorno del cristal huésped. De este modo, el ión excitado es capaz de retornar al nivel de energía menor sin radiación de energía electromagnética, y por ende sin emisión de luz.

Otro tipo de transición no radiativa involucra la fosforescencia sensibilizada. Esta transición, conocida también como transferencia de energía no radiativa, es mostrada esquemáticamente en la Figura 4. Esto depende de:

(a) la existencia de niveles de energía similares en los estados excitados de ambos iones sensibilizadores e iones activadores.

(b) la cercanía relativa de iones sensibilizadores y activadores dentro de la estructura del cristal huésped. En la operación la radiación excitante promueve a los iones sensibilizadores dentro de un estado excitado. Éstos transfieren energía a los iones activadores vecinos, con una pequeña o sin pérdida de energía durante la transferencia, y al mismo tiempo los iones sensibilizadores a sus estados fundamentales. Finalmente, los iones activadores retornan a sus estados fundamentales por la emisión de radiación luminiscente.

La transferencia de energía no radiativa, también se involucra en el efecto Poison de ciertas impurezas. En esto, la energía es transferida desde un sensibilizador o un activador a un sitio Poison en el cual la energía es repartida a la estructura del huésped en forma de energía vibracional. Iones que tienen transiciones no radiativas para el estado fundamental [Acuña-Elgueta, J.F. et al., 2006].

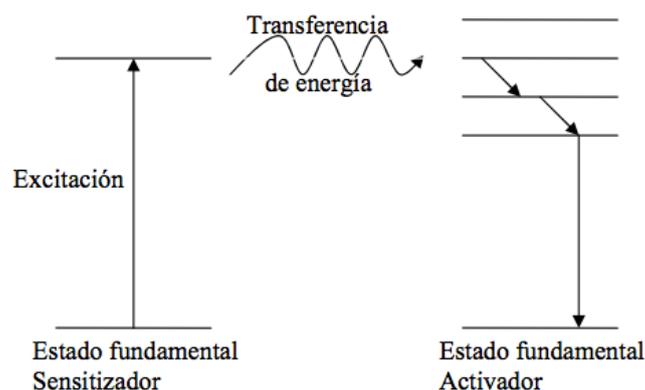
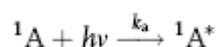


Figura 4. Transferencias de energía no radiativa involucradas en la operación de sensibilización.

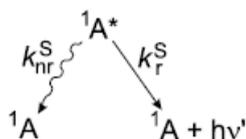
2.1.2. Fluorescencia de Estado Estacionario.

Espetros de emisión y excitación. El espectro de emisión de una sustancia se determina a partir de la variación de la intensidad de fluorescencia con la longitud de onda de emisión a una longitud de onda de excitación fija. Del mismo modo, la variación en la intensidad de fluorescencia en función de la longitud de onda de excitación para una longitud de onda de emisión fija constituye el espectro de excitación [Zorrilla-López, S., 2002].

Los espectros de emisión y excitación son tomados usando un espectrofluorómetro. La fuente de luz es una lámpara que emite un flujo constante de fotones, esto es, una cantidad constante de fotones por unidad de tiempo, sea cual sea su energía. Denotaremos N_0 como la cantidad de fotones incidentes, durante un tiempo dado por unidad de volumen de la muestra, donde la concentración de fluoróforos es $[A]$ (N_0 y $[A]$ están en mol L^{-1}). αN_0 representa la cantidad de fotones absorbidos por unidad de volumen implicado en el siguiente proceso de excitación:



La constante de pseudo primer orden para este proceso es muy grande ($k_a \approx 10^{15} \text{s}^{-1}$). Los pasos subsecuentes de desexcitación ocurren con constantes de mucha menor proporción (k_r^s y $k_{nr}^s \approx 10^7 - 10^{10} \text{s}^{-1}$) de acuerdo con:



Bajo iluminación continua, La concentración $[^1A^*]$ permanece constante, lo que significa que $^1A^*$ se encuentra en un estado estacionario; las medidas bajo estas condiciones son llamadas *mediciones de estado estacionario* [Valeur, B., 2001].

2.1.3. Tiempo de vida de la fluorescencia.

El tiempo de vida media de fluorescencia (τ) es el tiempo promedio que las moléculas permanecen en el estado excitado después de la excitación. El tiempo de vida media de fluorescencia es una de las características más importantes de los fluoróforos, ya que representa la ventana experimental de tiempo para la observación de cualquier proceso dinámico.

La excitación de una muestra que contiene un fluoróforo con un pulso de luz infinitamente estrecho, tiene como consecuencia que un cierto número de moléculas del fluoróforo pasen al estado excitado. Para fluoróforos con un solo tiempo de vida media de fluorescencia, la intensidad de fluorescencia decae exponencialmente.

El tiempo de vida media de fluorescencia (τ) es el tiempo en el que la intensidad de fluorescencia decae en un factor de $1/e$ con respecto a su valor a tiempo cero ($I(0)$). [Zorrilla-López, S., 2002]

Si se considera la excitación de un fluoróforo con un pulso infinitamente corto de luz, resultando un promedio N_0 de fluoróforos en el estado excitado. La razón de decaimiento de la población inicialmente excitada es:

$$\frac{dN(t)}{dt} = -(\gamma + \kappa)N(t) \quad (1)$$

Donde $N(t)$ es el número de moléculas excitadas en el tiempo t después de la excitación, γ es la proporción de decaimientos radiativos, y κ es la proporción de decaimientos no radiativos. Entonces si $N(t) = N_0$ en el tiempo $t = 0$ e integrando la ecuación, tenemos que:

$$N(t) = N_0 e^{-t/\tau} \quad (2)$$

Donde $\tau = (\gamma + \kappa)^{-1}$ es el tiempo de vida en el estado excitado. Por lo tanto, esperamos que la intensidad de la fluorescencia $F(t)$, que es proporcional a la población del estado excitado [$F(t) = \gamma N(t)$], decaiga exponencialmente. El tiempo de vida de la fluorescencia se compara con el tiempo necesario para que la intensidad decaiga a $1/e$ de su valor inicial, el cual es $(\gamma + \kappa)^{-1}$. Otra forma en la que se puede determinar el tiempo de vida es de la pendiente del logaritmo de la función [$\text{Log}F(t)$] contra el tiempo (t).

El tiempo de vida también puede ser considerado como una cantidad promedio del tiempo de vida que un fluoróforo pasa en el estado excitado. Este promedio está dado por

$$\langle t \rangle = \frac{\sum_i t_i N_i(t)}{\sum_i N_i(t)} \quad (3)$$

Para un número grande de fluoróforos y para intervalos de tiempo pequeños la suma se convierte

$$\langle t \rangle = \frac{\int_0^{\infty} t N(t) dt}{\int_0^{\infty} N(t) dt} = \frac{\int_0^{\infty} t e^{-t/\tau} dt}{\int_0^{\infty} e^{-t/\tau} dt} \quad (4)$$

El denominador es igual a τ . Haciendo una integración por partes, encontramos que el numerador es igual a τ^2 . Por ello, para un decaimiento exponencial, el tiempo medio que un fluoróforo permanece en el estado excitado es igual al tiempo de vida.

$$\langle t \rangle = \tau \quad (5)$$

Es importante notar que la ecuación (8) no es válida para leyes de decaimiento más complejas, como los decaimientos multi – o no exponenciales; utilizando la ley de decaimiento observada, el tiempo de vida promedio siempre puede ser calculado utilizando la ecuación (4) [Lacowicz, J.R., 1999].

2.1.4. Fluorescencia de Tiempo-Resuelto.

En la discusión anterior se supone que cada especie fluorescente podría caracterizarse por un tiempo de decaimiento que es independiente de la longitud de onda de emisión. Hay muchas circunstancias en que dicha suposición no es correcta, como es el caso de reacciones de estado excitado, como la pérdida de protones por el fenol y naftol, la formación de complejos de transferencia de carga, como ocurre entre antraceno y aminas; y relajación por solventes dipolares (que resulta en cambios espectrales dependientes del tiempo por numerosos fluoróforos sensibles a los solventes). En todas estas circunstancias ocurre corrimiento de espectros de emisión hacia mayores longitudes de onda con el tiempo, siguiendo a la excitación pulsada; en algunos casos, como la pérdida de protones y la formación de complejos, la emisión del estado excitado inicial desaparece mientras que la del producto incrementa. Para el caso de la relajación del solvente, el espectro puede deslizarse hasta las longitudes de onda más largas con el tiempo después de la excitación. En cualquier evento uno desea observar estos corrimientos dependientes del tiempo para entender el proceso de estado excitado. Uno de los medios para visualizar estos corrimientos es a través del espectro de emisión de tiempo resuelto (TRES, por sus siglas en inglés). Básicamente estos son espectros que son medidos en varias ocasiones siguiendo el pulso de excitación; tales

espectros pueden ser obtenidos usando ya sea el método de muestreo de pulsos o el método de conteo de fotones. La mayoría de los espectros de emisión de tiempo resuelto de muestreo de pulsos son obtenidos por grabación directa donde los resultados de conteo de fotones se obtienen principalmente por procedimientos computacionales [Shiraishi, Y. et al., 2006].

Para un fluoróforo sencillo cuya intensidad de fluorescencia, $F(t)$, que decae exponencialmente se encuentra que:

$$F(t) = \gamma N_0 e^{-\frac{t}{\tau}} = F_0 e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (6)$$

Donde F_0 es la intensidad de la fluorescencia a $t = 0$. Frecuentemente, los decaimientos no son descritos adecuadamente por una exponencial sencilla. En estos casos el decaimiento observado generalmente se ajusta a una suma de exponenciales

$$F(t) = \sum_i \alpha_i e^{-\frac{t}{\tau_i}} \quad (7)$$

Donde α_i es un factor pre exponencial que representa la contribución fraccional al decaimiento de tiempo resuelto del componente con una vida media τ_i . Es importante reconocer que, dependiendo de la muestra a investigar, las cantidades α_i y τ_i pueden tener o no un significado físico. Por ejemplo, el decaimiento de la fluorescencia puede ser no exponencial, esto es que no es descrito propiamente por una suma de términos exponenciales; Los decaimientos no exponenciales se esperan y se observan frecuentemente en fluoróforos que disminuyen su intensidad por transferencia de energía o que experimenta una relajación con el solvente. Siempre es posible ajustar los decaimientos medidos a una ecuación similar a la ecuación (7) y generalmente dos o tres componentes son adecuados para ajustar cualquier decaimiento observado. En estos casos los parámetros ajustados (α_i y τ_i) no están precisamente relacionados a una propiedad espectral de la molécula o de la muestra en estudio. No se debe asumir que los valores de α_i y τ_i representan componentes únicos de la muestra a menos que otras indicaciones estén disponibles para apoyar esta interpretación.

Hay una circunstancia importante donde los valores de α_i y τ_i tienen significado físico, siendo para una mezcla de fluoróforos que no interactúan. La mezcla puede ser el resultado de varios fluoróforos diferentes o un fluoróforo en varios ambientes diferentes, las cuales se denominan mezclas heterogéneas o que presentan heterogeneidad en el estado base. Para muestras heterogéneas, en las cuales cada especie decae exponencialmente el decaimiento pueden ser descrito por la ecuación (7). Los valores de τ_i representan las vidas medias de las especies individuales. La intensidad fraccional (f_i) de cada especie está dada por :

$$f_i = \frac{\alpha_i \tau_i}{\sum_i \alpha_i \tau_i} \quad (8)$$

Por lo tanto, el decaimiento por tiempo resuelto puede ser utilizado para revelar y analizar emisiones heterogéneas. Sin embargo, se hace énfasis de nuevo que al ajustar el decaimiento a la ecuación (7) no prueba la existencia de especies individuales descritas por los parámetros de ajuste. [Lacowicz, J.R., 1999]

2.1.5. Mecanismos de apagamiento de fluorescencia.

El principio de los quimiosensores fluorescentes para analitos específicos puede ser clasificado según la naturaleza del proceso como la transferencia electrónica fotoinducida (PET), la transferencia de carga fotoinducida (PCT), la resonancia fluorescente por transferencia de energía (FRET) y la formación de excímeros (Figura 5).

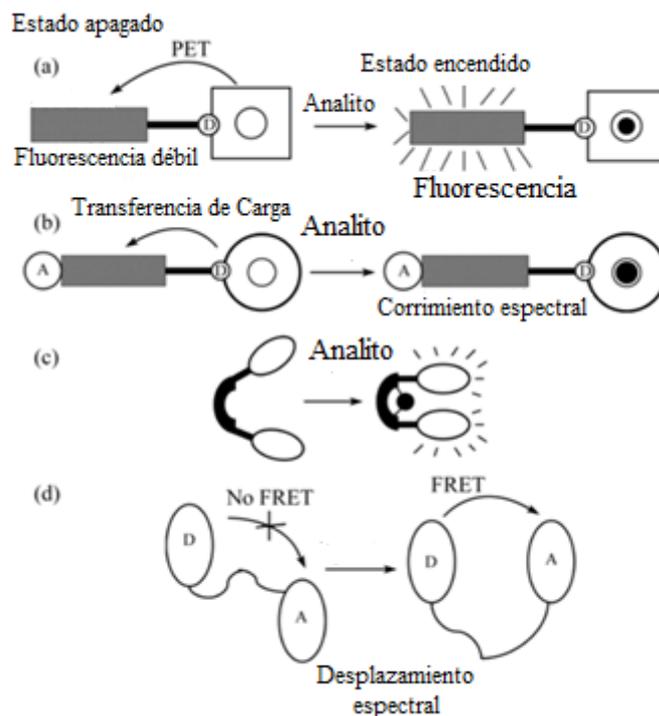


Figura 5. Principio de reconocimiento por PET (a), PCT (b), formación de excímero (c) y sistemas FRET (d).

La transferencia electrónica fotoinducida (PET) han sido ampliamente estudiada en quimiosensores. Al excitar el fluoróforo, un electrón del orbital molecular más alto ocupado (HOMO) se promueve al orbital molecular más bajo desocupado (LUMO), que permite que la PET del HOMO del donante al LUMO del aceptor tome su lugar. Este proceso proporciona un mecanismo para la desactivación no radiativa del estado excitado, causando un efecto de amortiguamiento de la fluorescencia. Una vez enlazado al analito, el potencial redox del donador es incrementado, la PET ya no es posible y el proceso de apagamiento se suprime. En el caso de la unión de iones metálicos, el efecto se llama fluorescencia aumentada por quelación (CHEF).

Los quimiosensores basados en transferencia de carga fotoinducida (PCT) se han diseñado con base en el siguiente mecanismo. Cuando un fluoróforo que contiene un grupo donador de electrones conjugado se une a un grupo aceptor de electrones, ocurre transferencia de carga intramolecular desde el donador hasta el aceptor por excitación con luz. La interacción del analito con el grupo donador afecta la eficiencia del proceso PCT y cambia las propiedades fotofísicas del fluoróforo.

La resonancia fluorescente por transferencia de energía (FRET) surge de la interacción entre un par de fluoróforos distintos, uno de los cuales actúa como un donador de energía de estado excitado hacia el otro (aceptor). Esto regresa al donador a su estado electrónico basal, y la emisión puede ocurrir desde el centro del aceptor. Recientemente, más y más quimiosensores se construyen basados al principio FRET [MingJian, Y. et. al. 2009].

2.1.6. Rendimientos Cuánticos.

Cuando se utiliza la luminiscencia como un método de medición, la variación del rendimiento cuántico Φ por efecto del entorno químico (por ejemplo, la temperatura y la viscosidad de la fase condensada, apagadores de fluorescencia) o instrumental (por ejemplo, tipo de monocromador, el ancho de la ranura y la intensidad de la fuente de excitación), es de gran importancia para el análisis. De hecho, se estima que el valor absoluto del rendimiento cuántico Φ , a menudo permite determinar cuál técnica de luminiscencia específica es suficientemente sensible para el análisis en cuestión. [McCarthy, W.J., Winefordner, J.D., 1967].

La eficiencia cuántica, Φ , es expresada como la proporción de moléculas excitadas que se desactivan por la emisión de fotones de fluorescencia. Es la razón del número de fotones emitidos por el número de fotones absorbidos por unidad de tiempo.

$$\Phi = \frac{\text{Número de fotones emitidos}}{\text{No. de fotones absorbidos}} \quad (9)$$

Por lo tanto se entiende que la eficiencia cuántica de fluorescencia está directamente relacionada con las velocidades de desactivación radiativas (R_r) y las no radiativas (R_{nr}).

$$\Phi_f = \frac{R_r}{R_r + R_{nr}} \quad (10)$$

Las mediciones del rendimiento cuántico absoluto son críticas ya que requieren de un equipo especial. Es necesario conocer con precisión la cantidad de luz recibida es excitada por la muestra. Estas mediciones usualmente son determinadas usando agentes dispersivos, esferas integradoras o actinómetros para calibrar el sistema. Existen otras técnicas para determinar el rendimiento cuántico de la fluorescencia absoluta como calorimetría. Entonces la eficiencia cuántica de la fluorescencia de un compuesto desconocido está entonces relacionada con un estándar por la ecuación:

$$\Phi_f(x) = \left(\frac{A_s}{A_x} \right) \left(\frac{F_x}{F_s} \right) \left(\frac{n_x}{n_s} \right)^2 \Phi_f(s) \quad (11)$$

Dónde:

Φ_f = Eficiencia cuántica de fluorescencia.

F = Área de la banda de emisión.

n = Índice de refracción del solvente utilizado.

A = Absorbancia a la λ de excitación (espectro de UV)

s = Estándar

x = Muestra desconocida

En la ecuación (11), A es la absorbancia por número de cuentas de los fotones absorbidos en una área y F es el número de cuentas de los fotones emitidos.

Se conoce que cuando la luz pasa a través de un medio a otro, parte de esta luz se pierde debido a la reflexión, el cual depende de la diferencia de los índices de refracción de los dos medios. Usualmente los índices de refracción pueden ser tomados de manuales de química. Si es necesario, el índice de refracción se puede determinar usando un refractómetro, a la misma temperatura usada para tomar el espectro de fluorescencia. [Fery-Forgues, S; Lavabre, D., 1999]

2.2. Generalidades sobre Química Supramolecular.

La química supramolecular es un área multidisciplinaria enfocada al estudio y empleo de ensamblajes moleculares unidos a través de interacciones no-covalentes, tales como puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, interacciones catión- π , etcétera. Esta área puede verse como una extensión de la química clásica del enlace covalente, que une átomos para formar moléculas, a una química del enlace no-covalente, que une moléculas, y con frecuencia la etiquetan, siguiendo los conceptos de J. M. Lehn, sencillamente como “química más allá de la molécula”.

En comparación con los enlaces covalentes, las interacciones intermoleculares son débiles y tradicionalmente atraen la atención de los químicos en relación con procesos en los cuales participan grandes cantidades de especies; por ejemplo, solvatación, fenómenos superficiales, comportamiento físico de gases a alta presión, etcétera. Sin embargo, analizando algunos sistemas biológicos, vemos que varios procesos fundamentales como la replicación celular, las interacciones anticuerpo-antígeno, la catálisis enzimática, se realizan con asombrosa eficiencia debido a una acción muy bien organizada de las fuerzas intermoleculares entre sólo dos moléculas. El desarrollo de la química supramolecular está fuertemente ligado a los estudios de sistemas biológicos, que se refleja también en la terminología usada en esta área. El descubrimiento de la importancia de las interacciones no-covalentes para el mantenimiento de estructuras de moléculas biológicas, y para su funcionamiento, estimuló los estudios sobre la naturaleza de estas interacciones. De igual manera, los intentos de reproducir en sistemas químicos algunos procesos biológicos como por ejemplo el transporte iónico a través de membranas celulares o la catálisis enzimática llevaron al desarrollo de nuevos principios de diseño de reactivos analíticos, catalizadores, fármacos, etcétera.

El fenómeno de interacción no-covalente fuerte y específico entre dos o más entidades moleculares se llama reconocimiento molecular. Los componentes de estos sistemas se denominan 1) receptor (el componente que se emplea para reconocer una especie blanco) y 2) ligante o sustrato (especie blanco). Con frecuencia, el receptor es una molécula grande que posee una cavidad o una grieta capaz de incorporar a la molécula más pequeña. En este caso el receptor se llama anfitrión (*host*), el ligante huésped (*guest*) y el producto de asociación entre ellos se llama complejo de inclusión. En fase sólida, el complejo de inclusión se puede formar cuando la red cristalina de una

sustancia contiene túneles o canales suficientemente amplios para atrapar un huésped. Si el huésped atrapado está bloqueado por todos lados, el complejo de inclusión se llama clatrato o compuesto jaula. Algunos anfitriones de volumen suficientemente grande pueden formar clatratos aún en disolución.

A pesar de que algunos complejos de inclusión fueron reportados en los años treinta del siglo pasado, y de que en este mismo periodo ya existieron enfoques importantes al tratamiento teórico de las interacciones no-covalentes, la química supramolecular se formó como un área independiente solamente en el transcurso de los años setenta y ochenta. Históricamente tuvo un gran impacto en esta área la entrega del Premio Nobel en química en 1987 a Donald J. Cram (University of California, Los Ángeles, EUA), Jean-Marie Lehn (Université Louis Pasteur Strasbourg, Collège de France, París, Francia) y Charles J. Pedersen (Du Pont, Wilmington, EUA) “por el desarrollo y empleo de moléculas con interacciones específicas de alta selectividad”. Actualmente, la química supramolecular es un área muy desarrollada que cuenta con revistas especializadas (*Supramolecular Chemistry*, Taylor & Francis; *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, Springer; *Journal of Molecular Recognition*, Wiley; Royal Society, y otras [Yatsimirsky, A.K., 2009]).

La química supramolecular no es únicamente un campo de estudio, sino un enfoque general a la disciplina entera de la química. Su mérito principal es la introducción, en la química clásica, de los conceptos de organización y funcionamiento de los sistemas biológicos y el uso amplio de las interacciones no-covalentes para mejorar la selectividad y la eficiencia de diferentes procesos químicos, el diseño de ensamblajes moleculares funcionales y el control del empaquetamiento de los cristales. Además, su desarrollo estimuló la comprensión teórica profunda de la naturaleza de las interacciones intermoleculares.

La química supramolecular se ocupa de interacciones sutiles y, por lo tanto, el control sobre los procesos implicados requiere de una gran precisión. En particular, los enlaces no covalentes tienen bajas energías y, a menudo, ninguna energía de activación para su formación. Según la ecuación de Arrhenius, a diferencia de la química de formación de enlaces covalentes, la razón de formación de enlaces no covalentes no se ve incrementada a altas temperaturas. De hecho, las ecuaciones de equilibrio químico muestran que las bajas energías de enlace resultan en un desplazamiento hacia el rompimiento de complejos supramoleculares a altas temperaturas.

Sin embargo, las bajas temperaturas también pueden ocasionar problemas en los procesos supramoleculares, ya que éstos pueden requerir la distorsión de moléculas hacia conformaciones termodinámicamente desfavorecidas, además de que, en ocasiones, es necesario incluir cierta química covalente que acompañe el proceso supramolecular. La naturaleza dinámica de la química supramolecular puede ser utilizada en varios sistemas (por ejemplo, mecánica molecular) y, la disminución de la temperatura del sistema puede retardar estos procesos. De esta manera, la termodinámica es una herramienta importante para el diseño, control y estudio de la química supramolecular. Quizá, el ejemplo más impactante son los sistemas biológicos de sangre caliente, los cuales dejan de operar completamente fuera de un rango muy estrecho de temperaturas.

Ambiente. El ambiente molecular alrededor de un sistema supramolecular también es de gran importancia para su operación y estabilidad. Varios solventes tiene fuertes enlaces de hidrógeno, interacciones electrostáticas y capacidades de transferencia de carga y, por lo tanto son capaces de involucrarse de manera compleja con el equilibrio del sistema, incluso rompiendo complejos completamente. Por esta razón, la elección del solvente puede ser crítica.

Autoensamblado molecular. El autoensamblado molecular es la construcción de sistemas sin una guía o manejo de una fuente externa (a excepción de proporcionar un ambiente adecuado). Las moléculas se ordenan para formar ensambles a través de interacciones no covalentes. El autoensamblado molecular puede subdividirse en autoensamblado intermolecular (para formar ensambles supramoleculares) y autoensamblado intramolecular (o plegamiento). El autoensamblado molecular también permite la construcción de grandes estructuras como las micelas, membranas, vesículas, cristales líquidos, además de ser importante para la ingeniería cristalina.

Reconocimiento y complejación molecular. El reconocimiento molecular es la unión de una molécula huésped a una molécula anfitrión complementaria, para formar un complejo anfitrión-huésped. A menudo, la definición de que especie es el “anfitrión” y que especie es el “huésped” es arbitrario. Las moléculas son capaces de identificarse una a la otra por medio de interacciones no covalentes. Las principales aplicaciones en este campo es la construcción de sensores moleculares y en catálisis.

Síntesis dirigida por Plantilla. El reconocimiento y el autoensamblado molecular pueden utilizarse con especies reactivas para pre-organizar un sistema para una reacción química (para formar unos o más enlaces covalentes). Puede ser considerado un caso especial de catálisis supramolecular. Los enlaces no covalentes entre los reactivos y una “plantilla” mantienen juntos los sitios reactivos de los reactantes, facilitando la química deseada. Esta técnica es particularmente útil para las situaciones donde la conformación deseada es termodinámico o cinético improbable, por ejemplo en la preparación de macrociclos grandes. Esta pre-organización también sirve a propósitos tales como reducción al mínimo de las reacciones laterales, disminuir la energía de activación de la reacción, y para producir la estereoquímica deseada. Después de que haya ocurrido la reacción, la plantilla puede permanecer en lugar, se remueva fuertemente, o puede ser desacomplejada “automáticamente” a causa de las diversas características del reconocimiento del producto de la reacción. La plantilla puede ser tan simple como un solo ion del metal o puede ser extremadamente compleja.

Arquitecturas moleculares mecánicamente ensambladas. Las arquitecturas molecular mecánicamente ensambladas consisten en moléculas unidas como consecuencia de su topologías. Pueden existir algunas interacciones no covalentes entre los diversos componentes (a menudo, los que fueron utilizados en la construcción del sistema), pero no hay enlaces covalentes. La química supramolecular, y la síntesis dirigida por plantilla, en particular, es un punto clave en la síntesis eficiente de los compuestos. Algunos ejemplos de estos sistemas son los catenatos, los rotaxanos, nudos moleculares y anillos moleculares de Borromean.

Química covalente dinámica. En la química covalente dinámica los enlaces covalentes se rompen y se forman en una reacción reversible bajo control termodinámico. A pesar de que los enlaces covalentes son la clave para estos procesos, el sistema está dirigido por fuerzas no covalentes que forman las estructuras de menor energía.

Las perspectivas del desarrollo futuro de la química supramolecular incluyen, entre otros aspectos, la extensión de sus métodos y principios a diferentes áreas de la química moderna. Se espera un gran impacto por su fusión con la ciencia de materiales, en particular en el establecimiento de la nanoquímica supramolecular. En el área de

polímeros hay perspectivas en creación de receptores muy eficientes y prácticos basados en dendrímeros y polímeros impresos. También atrae mucho la atención la creación de sistemas de autorreplicación, basados en el reconocimiento molecular entre sustratos y productos de una reacción química, indispensables para el progreso en los estudios sobre el origen de la vida. Finalmente, aprendiendo de la naturaleza, los químicos ya están a punto de desarrollar receptores sintéticos capaces de reconocer moléculas biológicas, proteínas y ácidos nucleicos entre otros, generando nuevos enfoques al diseño de fármacos [Yatsimirsky, A.K., 2009].

2.2.1. Quimiosensores Fluorescentes para Cationes Metálicos.

Un quimiosensor es un dispositivo que transforma información química en una señal analítica. Un quimiosensor fluorescente es aquel que utiliza la fluorescencia como señal de respuesta. El funcionamiento de estos quimiosensores se basa en principios de transferencia electrónica fotoinducida [Bissell, R.A. et al., 1992]. Particularmente es importante en este campo, quimiosensores selectivos para el análisis de iones de metales pesados como Hg^{2+} , Pb^{2+} y Cd^{2+} debido a su extremada toxicidad en nuestro medio ambiente [Kim, J.S. et al., 2007].

Se han reportado diversos sistemas supramoleculares cuyas propiedades de emisión pueden ser moduladas por estímulos externos. Los cationes metálicos se utilizan a menudo como el estímulo externo para promover la mejora de emisión o el apagamiento al ocurrir la coordinación con los grupos ligando. Se han propuesto una gran variedad de sistemas moleculares impulsados por cationes metálicos, que actúan en diferentes medios como el agua, medios orgánicos o la combinación de medios orgánicos con agua. Entre ellos, se han reportado sistemas moleculares que contienen pireno capaces de mostrar el aumento o el apagamiento del excímero inducidas por el metal [Shiraishi, Y. et al., 2007].

Los ligantes de estructura abierta que contienen grupos aromáticos terminales (compuestos bis-cromofóricos) han tenido gran aplicación en el campo de los sensores fluorescentes de metales. La flexibilidad de estas moléculas conduce a cambios estructurales importantes por efecto de la coordinación metálica que podrían ser eficientemente transmitidos hacia las unidades fluoróforas. En este contexto, la

funcionalización de ligantes con grupos fluorescentes naftaleno, antraceno o pireno ha sido reportada por distintos autores. Por su elevada conjugación y alto rendimiento cuántico de emisión de fluorescencia, el pireno es uno de los luminóforos más utilizados. Además la presencia de grupos terminales pireno abre la posibilidad de formación de dímeros intramoleculares de pireno, los cuales presentan una banda de emisión característica que puede ser modificada, tanto en su intensidad como en su posición, por cambios estructurales o electrónicos como los que provoca la coordinación metálica o la variación del pH del medio.

2.2.2. Ligantes Bis-Cromofóricos y Formación de Excímeros.

Ligantes Bis-Cromofóricos

Una nueva tendencia de diseño en el área de quimiosensores fluorescentes es la preparación de ligantes bis-cromofóricos. A diferencia de los quimiosensores de diseño clásico, los ligantes bis-cromofóricos contienen dos fluoróforos idénticos interconectados a través de una cadena con propiedades de coordinación que une al analito (Figura 6).

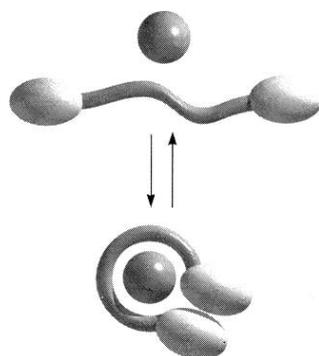


Figura 6. Representación esquemática de un quimiosensor fluorescente. el mecanismo de la señal de transducción está basado en los cambios conformacionales de su estructura.

Una ventaja de los ligantes bis-cromofóricos es que el modo de respuesta puede ser de tipo radiométrico, es decir, variación en la razón de intensidades de excímero/monómero. Esto permite la auto calibración en aplicaciones prácticas. Se han reportado ejemplos de sensores bis-cromofóricos de metales constituidos de poliaminas lineales y poliéteres funcionalizados con naftaleno, antraceno o pireno como unidades cromofóricas en la terminación de su cadena [Lijun, M. et al., 2009].

Formación de Excímeros

Hay ciertas analogías entre las propiedades espectroscópicas de hidrocarburos aromáticos como benceno y naftaleno y las de algunos de los gases nobles. En el modelo de orbitales perimetrales de electrones libres de Platt los hidrocarburos aromáticos cata-condensados (según su estructura los cata-condensados presentan átomos de carbono terciario comunes, como máximo, a dos anillos aromáticos) tienen una capa cerrada f^4 y configuraciones electrónicas π en el estado base las cuales son similares a las del estado basal de los gases nobles. En consecuencia, el estado base electrónico de una molécula de hidrocarburo aromático o un átomo de gas noble es un estado singlete S_0 , y sus estados electrónicos excitados son también estados singletes S_1, S_2, \dots, S_p o estados tripletes T_1, T_2, \dots, T_q .

El espectro atómico de la fluorescencia de un gas noble a bajas presiones consiste de una serie de líneas correspondientes a las transiciones radiativas permitidas entre los diferentes estados electrónicos. Un aumento en la presión ocasiona:

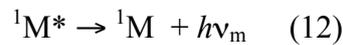
- 1) Una disminución en el rendimiento cuántico de la fluorescencia atómica debido al auto apagamiento.
- 2) La aparición de una o más bandas sin estructura o espectros de fluorescencia continuos a bajas energías que apagan la fluorescencia atómica.

El espectro de fluorescencia molecular de hidrocarburos aromáticos condensados en una solución líquida diluida consiste en una serie de bandas vibracionales correspondientes a las transiciones radiativas del primer singlete electrónico π excitado S_1 de una molécula hacia diferentes niveles vibracionales de su estado singlete basal S_0 . Para hidrocarburos aromáticos más condensados un aumento en la concentración de la solución ocasiona:

- 1) Una disminución en el rendimiento cuántico de la fluorescencia molecular debido al autoapagamiento.
- 2) La aparición de bandas sin estructura en el espectro de fluorescencia a más bajas energías que la fluorescencia molecular normal.

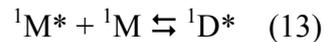
La dependencia de la concentración de la fluorescencia de gases nobles y de hidrocarburos aromáticos podría resumirse de la siguiente forma:

- i) La fluorescencia ($h\nu_m$) de una átomo o molécula excitado de singulete ($^1M^*$)



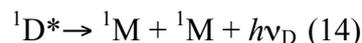
está sujeta a autoapagarse.

- ii) El autoapagamiento se debe a las interacciones colisionales de $^1M^*$ con un átomo o molécula desexcitada 1M



lo que produce un dímero de estado excitado singulete ($^1D^*$)

- iii) Este dímero de estado excitado es disociado en el estado base, así que la emisión ($h\nu_m$) es sin estructura.



Los gases nobles son monoatómicos, así que sus dímeros son claramente disociados en el estado base. Los espectros de absorción de los hidrocarburos aromáticos en solución son independientes de la concentración. Esto demuestra que los dímeros excitados que son responsables de la emisión sin estructura no están presentes en el estado fundamental.

El término excímero fue introducido por Stevens y Hutton $^1D^*$ para describir y distinguir un dímero de estado excitado de uno estable. Un excímero fue definido como un dímero el cual es asociado en un estado electrónico excitado y disociado en el estado electrónico basal. Esta definición es adecuada para excímeros intermoleculares en medio líquido, pero requiere una ligera revisión para excímeros en medios rígidos o para excímeros intramoleculares, cuando existen restricciones ambientales y el movimiento molecular estérico. Estos casos los incluye Birks para redefinir un excímero como dímero y para incluir estos casos Birks ha redefinido un excímero como dímero que se asocia en un estado electrónico excitado y que se disocian en su estado fundamental electrónico.

La definición incluye entidades como el dímero de pireno, el antraceno en forma de sándwich en solución, y todos los eximeros intramoleculares, los cuáles fueron excluidos por la definición original [Birks, J.B., 1975].

Para distinguir experimentalmente entre una clase de excímero dinámico y estático es útil un estudio del tipo *time-resolved* en el cual se observaría el incremento de la emisión de excímero con el tiempo si es de origen dinámico, pero no si se trata de un excímero estático. Éstos últimos pueden ser observados solo llevando a cabo mediciones en el orden de los picosegundos. Una forma alternativa de distinguir entre los excímeros dinámicos y los que provienen de especies preasociadas es analizar los espectros de absorción y excitación. En el caso de especies preasociadas, los pirenos están tan cerca que se observa perturbación de los espectros electrónicos. En los espectros de absorción por ejemplo, un dato claro de preasociación es el ensanchamiento de las bandas de absorción en comparación con sistemas modelo en donde el pireno está disuelto en forma molecular. Con frecuencia se observan también pequeños desplazamientos al rojo de la posición del máximo y una disminución de los coeficientes de extinción. Por otro lado, los espectros de excitación monitoreados en las longitudes de onda de emisión de monómero y de excímero son claramente distintos cuando la preasociación está presente [Muñoz, I. et al., 2001].

Existen parámetros espectroscópicos bien definidos, que se utilizan para detectar preasociación de pireno en el estado basal [Birks, J.B., 1975].

Fotodímeros

En algunas moléculas aromáticas la interacción del excímero es tan fuerte que un fotodímero estable es M_2 que está formado por el excímero ${}^1D^*$. Y lo podemos escribir de la siguiente manera:



donde ${}^1D^*$ es el excímero intermediario. La Fotodimerización, el cual es un caso extremo de la formación de un excímero, ha sido conocida desde el siglo XIX se produjo en las soluciones de antraceno expuestos a la luz solar, y muchos derivados de antraceno se comportan de manera similar. La Fotodimerización también se ha observado en soluciones libres de oxígeno más altas que los polyaceneos , tetracenos y pentacenos .

Dímeros Tipo Sandwich

Los hidrocarburos aromáticos condensados son planos, y su conformación de excímero más estable es generalmente la de un dímero sándwich ($M||M$), correspondientes a un par de moléculas simétricas paralelas (Figura 7).

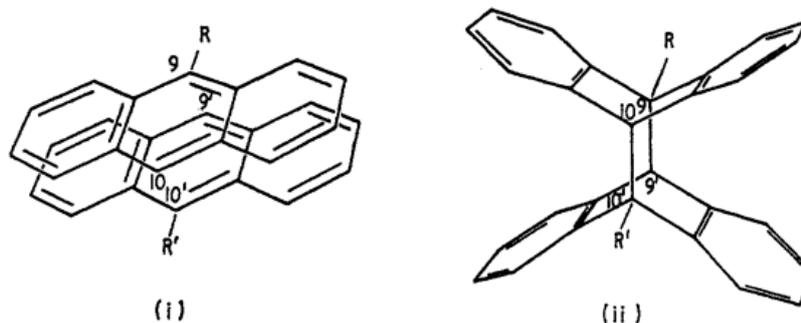


Figura 7. Diagrama estructural de (i) dímero sandwich de antraceno ($R=H$) y (ii) fotodímero de antracenos sustituidos ($R=CH_3, CN, Cl, \text{ etc}$).

El dímero sándwich del antraceno ($M||M$), consiste en un par de moléculas paralelas perteneciente al grupo de simetría D_{2h} .

- i) El fotodímero (M_2) de diantraceno, el cual es formado por un par de enlaces covalente σ uniendo las posiciones meso (9 a 9', 10 a 10') en las dos moléculas.

[Birks, J.B., 1975]

2.2.3. El pireno como unidad indicadora en quimiosensores fluorescentes.

Se han desarrollado un gran número de quimiosensores selectivos para el análisis de metales pesados como el Hg^{2+} , Pb^{2+} y Cd^{2+} , debido a la alta toxicidad e impacto negativo en el medio ambiente de estos cationes.

Para la construcción de quimiosensores ópticamente eficientes, la fluorescencia es particularmente atractiva. Entre los fluoróforos más utilizados se encuentra el pireno, debido a sus conocidas propiedades fotofísicas así como sus características bandas de emisión de monómero y excímero que son sensibles a diferentes medios. La

introducción de dos fracciones pireno, que pueden ser ubicadas lo suficientemente cerca para producir emisiones de excímero, en un sistema de reconocimiento de iones es un enfoque útil para la señalización de complejos por los cambios en las emisiones de monómero y/o excímero. Tras la formación de complejos con un ión específico, la conformación del compuesto resultante puede ser ajustado para obtener las emisiones de monómero y/o excímero según la orientación de las dos mitades pireno.

Una medición radiométrica implica la observación de los cambios en la relación de las intensidades de absorción o emisión en dos longitudes de onda.

Una característica importante de quimiosensores fluorescentes radiométricos es que permiten señalización radiométrica y, por tanto, pueden aumentar el rango donde se observa una respuesta y al mismo tiempo proporciona e incorporan correcciones de los efectos del medio donde se encuentren. [Kim, J.S. et al., 2007].

El pireno tiene una gran capacidad de llevar a cabo el fenómeno de emisión de fluorescencia esto se debe a su alta conjugación, al estar constituido de cuatro anillos aromáticos fusionados (Tabla 1). El pireno posee características interesantes, tales como una emisión de fluorescencia con alto rendimiento cuántico, un tiempo de vida extendido en el estado excitado y la posibilidad de formar dímeros y exciplexes. La formación de un excímero de pireno requiere el encuentro de un pireno electrónicamente excitado con otro pireno en su estado electrónico basal. De acuerdo con esta definición los dos pirenos deben estar lo suficientemente lejos cuando la absorción de luz se lleva a cabo, para que la excitación ocurra en una sola de las especies. Este pireno excitado, llamado con frecuencia “localmente excitado” da lugar a la emisión monomérica de pireno que se caracteriza por un conjunto de bandas entre 375 y 400 nm (como se muestra en la Figura 8). Por efecto de la formación de excímeros los espectros de emisión de fluorescencia muestran un fuerte desplazamiento al rojo, ensanchamiento y menor estructura vibracional en comparación con la emisión monomérica. También es posible observar una emisión como la de excímero a partir de especies en las que los cromóforos aromáticos ya están asociados cuando la luz se absorbe. A estas especies excitadas se les conoce como excímeros estáticos y están presentes por ejemplo en especies bifluoróforas, que son aquellas que consisten de dos fluoróforos idénticos enlazados por una cadena corta y flexible. Los excímeros descritos con anterioridad, en los que las unidades pireno están alejadas antes de la absorción del fotón, y que satisfacen la definición de Bircks, son llamados excímeros dinámicos.

Los derivados del pireno son sondas fotofísicas ubicuas y éstas han sido ampliamente estudiadas ya que muestran emisiones distintivas de monómero y excímero. En varios estudios reportados en la literatura se utiliza pireno como quimiosensor fluorescente [Winnik, F.M., 1993].

El pireno es muy utilizado como sensor en diversos sistemas, sin embargo, los derivados del pireno normalmente tienen una baja solubilidad en agua por su alta hidrofobicidad.

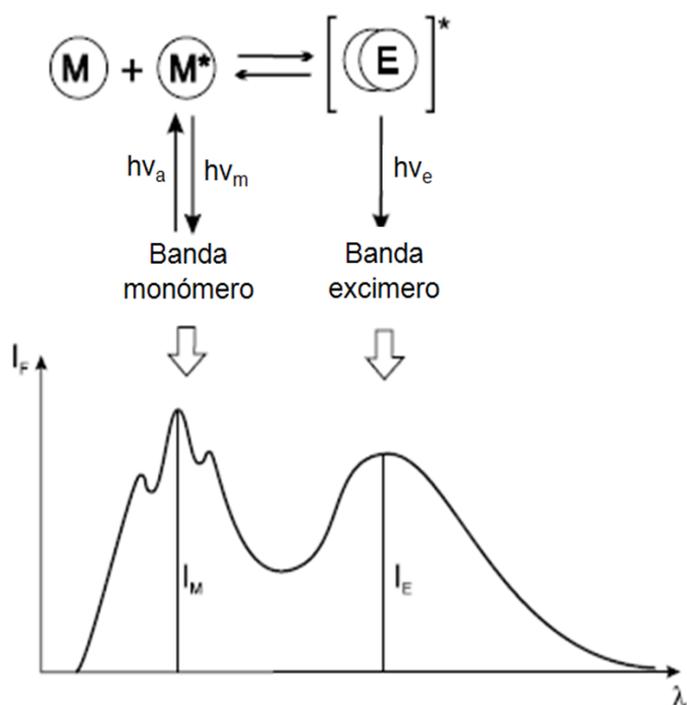


Figura 8. Formación de excímeros, con su correspondiente bandas de monómero y excímero.

El pireno se ha utilizado para investigar el grado de penetración del agua en las micelas y determinar con precisión la concentración micelar crítica (Kalyanasundaram, 1987). También se han reportado estudios de polaridad de las superficies de sílice o alúmina. En vesículas de lípidos, la medición de la relación $I_I = I_{III}$ proporciona una herramienta sencilla para la determinación de las temperaturas de transición de fase y también el efecto de la adición de colesterol.

Para investigar el grado de penetración del agua en la región hidrocarbonada de bicapas lipídicas, lo más adecuado es utilizar el pireno unido a un grupo carboxílico a través de una cadena parafínica, como en el ácido pirenhexanodioico (Figura 9).

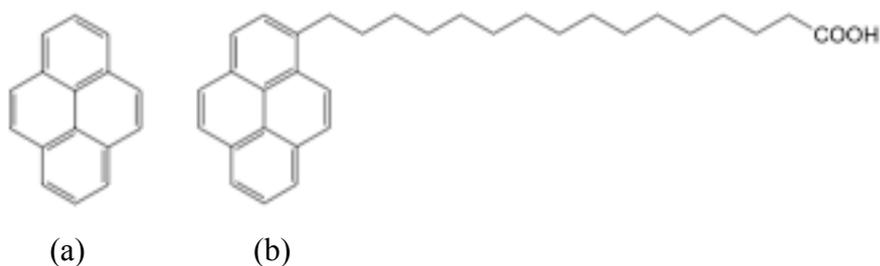
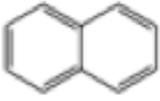
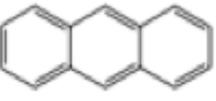
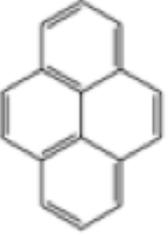
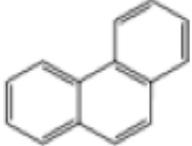


Figura 9. Pireno (a), Ácido pirenhexadecanoico (b).

Tabla 1. Rendimientos cuánticos y tiempos de vida de algunos hidrocarburos aromáticos.

Compuesto	Fórmula	Solvente (temp.)	Φ_F	τ_S (ns)	Φ_{isc}	Φ_P	τ_T (s)
Benceno		Etanol (293K) EPA (77 K)	0.04	31		0.17	7.0
Naftaleno		Etanol (293K)	0.21	2.7	0.79		
		Ciclohexano (293 K) EPA (77 K)	0.19	96		0.06	2.6
Antraceno		Etanol (293K)	0.27	5.1	0.72		
		Ciclohexano (293 K) EPA (77 K)	0.30	5.24			0.09
Perileno		n-Hexano	0.98		0.02		
		Ciclohexano (293 K)	0.78	6			
Pireno		Etanol (293K)	0.65	410	0.35		
		Ciclohexano (293 K)	0.65	450			
Fenantreno		Etanol (293K)	0.13		0.85		
		n-Heptano (293 K)	0.16	0.60			
		EPA (77 K) Película de Polímero	0.12		0.88	0.31	3.3
						0.11	

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Diseño Experimental.

Recientemente, en el Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales (DIPM) de la Universidad de Sonora se sintetizaron una serie de ligantes biscromofóricos de cadena abierta que presentan grupos fluorescentes pireno en su estructura (**1-6**, Esquema I) [Machi, L. et al., 2009; Pérez-González R. et al., 2011]. Los nuevos derivados son solubles en agua y sus espectros de emisión exhiben bandas características de pireno monomérico entre 380-420 nm, además de una banda intensa, sin estructura, centrada en ≈ 480 nm, característica de excímeros de pireno. La fluorescencia de los compuestos **1-6** es altamente sensible a los cambios en el pH del medio (Figuras 1A-6A en Anexos). Esta sensibilidad se correlacionó con la existencia de diferentes especies en solución, las cuales presentan distintos grados de protonación a lo ancho de la ventana de pH.

Para la determinación de los tiempos de vida media de la fluorescencia, tanto de monómero como de excímero, así como para la determinación de los rendimientos cuánticos de fluorescencia de los ligantes **1-6**, se seleccionaron diferentes condiciones de pH. Esta selección se hizo, para los casos en los que se contaba con datos de potenciometría (ligantes **2, 3, 5 y 6**), con base en las curvas de distribución de especies (Figuras 7A-10A en Anexos). En el caso de los ligantes **1 y 4**, cuya solubilidad en agua no fue lo suficientemente alta para ser analizados por dicha técnica, la selección de los pH de trabajo se hizo con base en los perfiles de intensidad de fluorescencia vs pH, como se explica a continuación.

Los ligantes $(\text{edta1py})\text{H}_2$ y $(\text{edta1mpy})\text{H}_2$ (**1 y 4**, Esquema I) presentaron, además de las bandas de emisión de pireno monomérico, una intensa emisión de excímero en medio alcalino. La disminución del pH provocó principalmente reducción en la intensidad de emisión de excímero, con perfiles de I_F vs pH que muestran forma

sigmoidal en la región $6 < \text{pH} < 10$ (ver Figuras 1A y 4A en Anexos). Para cada ligante, en dicha región ocurre la interconversión entre la especie totalmente desprotonada L^{2-} y la especie monoprotonada LH . Por lo tanto, los pH seleccionados para la determinación de los tiempos de vida y rendimientos fueron $\text{pH} = 6.0, 8.0, 8.5$ y 9.0 en el caso de $(\text{edta1py})\text{H}_2$ y $\text{pH} = 6.0, 7.0$ y 9.0 para $(\text{edta1mpy})\text{H}_2$ (ver Tablas 2 y 3 en sección Resultados).

Los ligantes $(\text{dtpa1py})\text{H}_2$ y $(\text{dtpa1mpy})\text{H}_2$ (**2** y **5**, Esquema I) fueron analizados por potenciometría y se determinaron sus constantes de protonación. [Pérez-González, R. et al., 2011]. Con base en dichas constantes se calcularon las curvas de distribución de especies que se muestran con líneas sólidas en las gráficas de las Figuras 7A y 9A en Anexos. Como se puede observar, en este caso utilizamos un rango de pH distinto. Por lo tanto, los pH seleccionados para la determinación de los tiempos de vida y rendimientos fueron $\text{pH} = 6.0, 7.0, 9.0, 11.0$ en el caso de $(\text{dtpa1py})\text{H}_2$ y $\text{pH} = 6.0, 8.0, 9.0, 11.0$ para $(\text{dtpa1mpy})\text{H}_2$ (ver Tablas 2 y 3 en sección Resultados).

Los ligantes $(\text{ttha1py})\text{H}_4$ y $(\text{ttha1mpy})\text{H}_4$ (**3** y **6**, Esquema I) también fueron estudiados por potenciometría. Los perfiles de intensidad de fluorescencia y las curvas de distribución de especies se muestran en las Figuras 8A y 10A. Los pH seleccionados para la determinación de los tiempos de vida y rendimientos fueron: $\text{pH} = 11.0, 8.5, 8.0$ y 6.0 en el caso de $(\text{ttha1py})\text{H}_2$ y $\text{pH} = 11.0, 8.0$ y 6.0 para $(\text{ttha1mpy})\text{H}_2$ (ver Tablas 2 y 3 en sección Resultados).

3.2. Materiales y Equipo Utilizados.

Reactivos:

Los reactivos que fueron utilizados en este trabajo se obtienen comercialmente, con excepción de los ligantes que fueron proporcionados por la Dra. Lorena Machi.

Caracterización:

Cloruro de sodio (NaCl), marca Merck.

Carbonato de sodio (Na_2CO_3), marca Merck.

Sulfato de quinina, marca Sigma Aldrich

Estudios de Coordinación:

Acetato de Zinc, $\text{Zn}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, marca Mallinckrodt.

Efecto del pH:

Buffer TRIZMA tris (hidroximetil)aminometano $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$, marca Aldrich.

Hidróxido de sodio (NaOH), marca J.T. Baker.

Ácido clorhídrico (HCl), marca Merck.

Fosfato de Sodio Monobásico $(\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O})$, marca J.T. Baker.

Fosfato de Sodio Dibásico $(\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O})$, marca J.T. Baker.

Equipos utilizados para tiempo de vida media:

Fuente de excitación: Láser de Nitrógeno modelo GL3000, marca PTI.

Detección de señal: espectrógrafo Marca triax550 equipado con una cámara CCD marca SpectrumTwo Modelo ICCD.

Equipos utilizados para Rendimiento Cuántico:

Ultravioleta-Visible (UV-Vis): espectrofotómetro de ultravioleta-visible marca Perkin-Elmer, modelo Lambda 20.

Fluorescencia: espectrofotómetro de Luminiscencia marca Perkin-Elmer, modelo LS50.

3.3. Metodologías.

Preparación de las soluciones patrón de los ligantes.

Se prepararon soluciones patrón 1mM de cada uno de los ligantes en NaCl 0.01M. Para la disolución de los compuestos se agregó una mínima cantidad de Na₂CO₃. A partir de estas soluciones se obtuvieron las soluciones de trabajo mediante dilución con el buffer apropiado. Para las determinaciones de rendimiento cuántico se prepararon soluciones de trabajo 1×10^{-5} M y 1×10^{-6} M, para UV-Vis y fluorescencia, respectivamente. Para las determinaciones de tiempo de vida las concentraciones utilizadas fueron las siguientes:

(edta1py)H₂ 2×10^{-6} M, (ttha1py)H₄ 8.8×10^{-5} M, (dtpa1py)H₃ 2.3×10^{-6} M, (edta1mpy)H₂ 1.4×10^{-6} M, (ttha1mpy)H₄ 5×10^{-7} M y (dtpa1mpy)H₃ 1.3×10^{-6} M.

Preparación de las soluciones tampón (buffers).

Se prepararon una serie de buffers con diferente pH para la determinación tanto de los rendimientos cuánticos como de los tiempos de vida. Para los estudios a valores de pH entre 7 y 9 se utilizó buffer trizma 0.01M como base. Los ajustes de pH a los valores deseados se hicieron con HCl 0.01M y NaOH 0.01M. Para los estudios a pH= 11 se utilizó buffer de fosfatos, el cual se preparó con 50 mL de solución 0.05M de fosfato de sodio monobásico (NaH₂PO₄) más 11.1 ml. de hidróxido de sodio (NaOH) 0.1M. Para la solución tampón con un valor de pH= 6 se utilizó una mezcla de fosfato de sodio dibásico (Na₂HPO₄) 0.1M (50 mL) y 5.6 ml. de NaOH 0.1M y se ajustó el pH con una solución 0.1M de HCl.

Preparación de las soluciones de los complejos de Zn²⁺

Para estudiar los cambios provocados en los rendimientos cuánticos y tiempos de vida de los ligantes por la complejación con Zn²⁺ se prepararon soluciones, de concentración y pH apropiados, con una relación 1:1 ligante:metal [L:M]. La selección del pH para estos experimentos se hizo con base en los siguientes criterios: 1) Se eligieron condiciones de pH cercanas a la neutralidad para evitar la interferencia de las especies hidroxiladas que se forman a pH alto; 2) Para cada ligante se eligió un pH para el cual se contara con datos fotofísicos del ligante en su forma libre. De manera adicional, se realizaron mediciones en ausencia de buffer, utilizando únicamente solución salina NaCl 0.01M. Esto último con el propósito de conocer si existe un efecto del buffer en los rendimientos cuánticos y tiempos de vida de los complejos.

3.3.1. Determinación de la Eficiencia cuántica.

Para determinar los rendimientos cuánticos de las moléculas se siguió un protocolo para ajustarlo a la ecuación (11). Se utilizó como referencia quinina (C₂₀H₂₄N₂O₂) [Skoog, D.A. et al., 2001], que presenta bandas de absorción y emisión cercanas a los compuestos a analizar (Figuras 10 y 11). El sulfato de quinina, tiene un coeficiente de extinción molar de 5,700 M⁻¹cm⁻¹ a 347.5 nm. La quinina en medio ácido ha sido ampliamente recomendada como un estándar para las determinaciones de rendimientos cuánticos de fluorescencia. El rendimiento cuántico de la quinina es de 0.546 (λ_{exc} =310 nm) [AnaSpec, Inc. 2002-2011]. La quinina es menos aplicable a los estudios de tiempo resuelto, debido a su decaimiento de fluorescencia no es monofásica. El procedimiento que se siguió se describe a continuación.

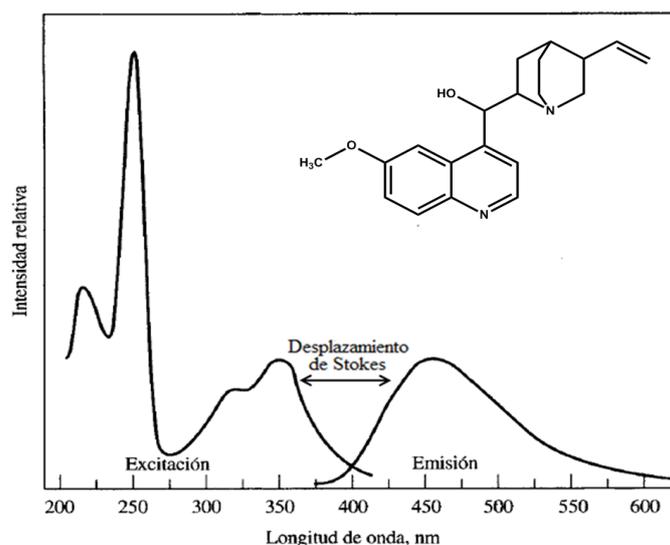


Figura 10. Espectros de excitación y emisión de quinina.

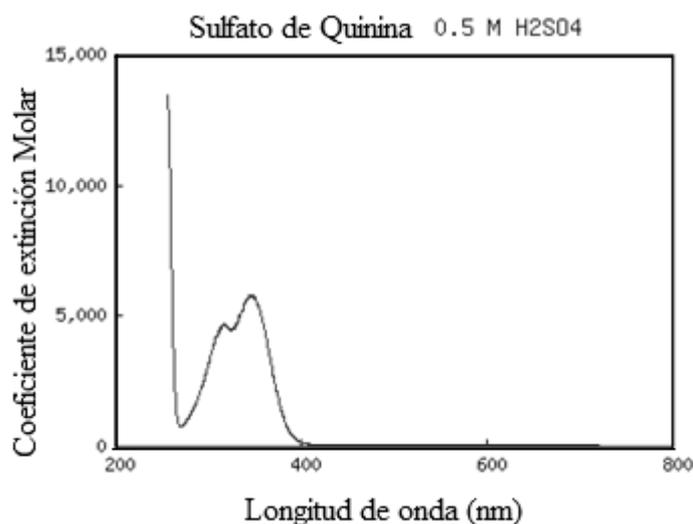


Figura 11. Espectro de absorción del sulfato de quinina.

Se realizó el análisis de UV-Vis para obtener la absorbancia de cada una de las moléculas. Se utilizaron soluciones con una concentración de 1×10^{-5} M, para asegurar que las absorbancias se encontraran en el rango de 0.4 a 0.5. Posteriormente se hizo una dilución 1:10 de cada una de las muestras y se desgasificaron utilizando nitrógeno, con el fin de eliminar el oxígeno presente. Enseguida se realizó el estudio de fluorescencia. Se obtuvieron las áreas bajo la curva de las bandas de emisión de cada una de las muestras analizadas, utilizando el software Labview contenido en el equipo. Por último, todos los datos fueron sustituidos en la ecuación (11) y se obtuvieron las eficiencias cuánticas.

3.3.2. Obtención de los Tiempos de Vida Fluorescente.

La caracterización de los compuestos se llevó a cabo mediante el arreglo experimental que se muestra en las Figuras 12, 13 y 14. Para determinar las mediciones en nanosegundos del decaimiento de la fluorescencia se utilizara una fuente de excitación un láser de Nitrógeno modelo GL3000, marca PTI, el cual proporciona pulsos de luz de 377 nm y con un ancho temporal de 500 ps. La señal es detectada mediante una cámara CCD intensificada, modelo ICCD SpectrumTwo montado en un espectrógrafo triax550, ambos marcas Jobin Ybon.

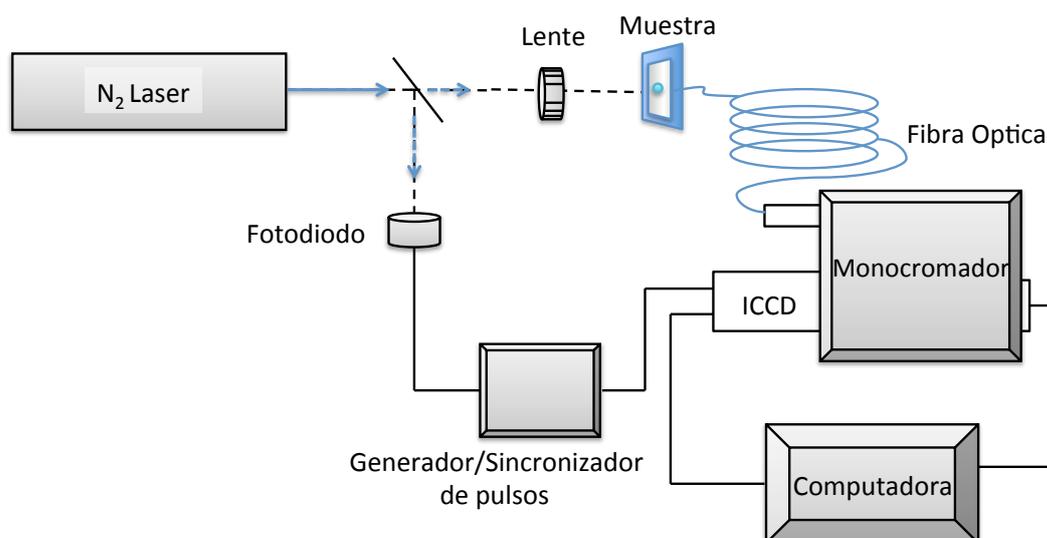


Figura 111. Diagrama del arreglo experimental.

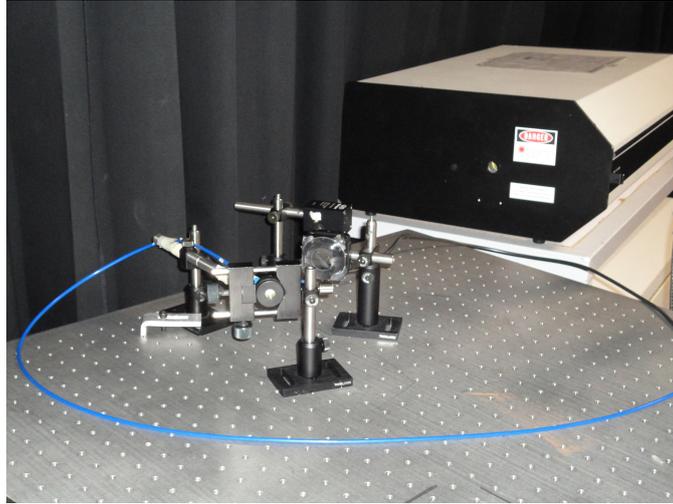


Figura 12. Imagen del arreglo experimental 1.



Figura 13. Imagen del arreglo experimental 2.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Determinación de Eficiencia Cuántica.

Se determinaron los rendimientos cuánticos fluorescentes de las moléculas **1-6** (**Esquema I**) de acuerdo con la metodología descrita en la sección experimental. Se obtuvieron los espectros de absorción y emisión de los compuestos en solución acuosa a pH fijo y a una concentración 0.01mM, con el propósito de obtener los parámetros necesarios para aplicar la Ecuación 11. En las Tablas 1A y 2A en la sección de Anexos, se tabulan los parámetros que fueron determinados. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

A. Mediciones a pH alto ($\text{pH} \geq 9$):

El análisis de los rendimientos cuánticos determinados para los ligantes **1-6** bajo condiciones de pH en las cuales las moléculas se encuentran totalmente desprotonadas revela lo siguiente:

1. En el caso de los derivados de dtpa y ttha, los rendimientos cuánticos son mayores para los ligantes que contienen un puente metileno entre el grupo amida y el fluoróforo (dtpa1py, $\phi=0.055$, dta1mpy=0.120; ttha1py=0.080, ttha1mpy=0.099). Este resultado muestra que el efecto negativo causado por el incremento en la flexibilidad de las cadenas de interconexión es compensado por la cancelación de la influencia directa del grupo amida sobre el fluoróforo.
2. En el caso de los derivados de edta el rendimiento cuántico es mayor para (edta1py) H_2 respecto a (edta1mpy) H_2 (edta1py=0.195, edta1mpy=0.098). Este resultado es consistente con la extraordinaria emisión de excímero que exhibe (edta1py) H_2 bajo estas condiciones de pH. De hecho, el rendimiento cuántico de

Tabla 2. Rendimiento Cuántico (Φ_f) de las moléculas 1-6 en solución acuosa ($1 \times 10^{-6} \text{M}$) a diferente pH ($\lambda_{\text{exc}} = 342 \text{ nm}$).

Ligante	pH	Especies ^a	Φ_f
(edta1py)H ₂	9.0	L ²⁻	0.195
	8.5	-	0.687
	8.0	-	0.022
	6.0	LH ⁻	0.038
(dtpa1py)H ₃	11.0	L ³⁻	0.055
	9.0	-	0.060
	8.0	LH ²⁻	0.096
	7.0	LH ²⁻	0.040
	6.0	-	0.028
(ttha1py)H ₄	11.0	L ⁴⁻	0.080
	8.5	LH ³⁻	0.076
	8.0	LH ³⁻	0.112
	6.0	LH ₂ ²⁻	0.070
(edta1mpy)H ₂	9.0	L ²⁻	0.098
	7.0	-	0.078
	6.0	LH ⁻	0.049
(dtpa1mpy)H ₃	11.0	L ³⁻	0.120
	9.0	LH ²⁻	0.032
	8.0	LH ²⁻	0.046
	6.0	-	0.051
(ttha1mpy)H ₄	11.0	L ⁴⁻	0.099
	8.0	LH ³⁻	0.064
	7.5	LH ³⁻	0.056
	6.0	LH ₂ ²⁻	0.037

^a Solo se muestran especies con predominio >70% de acuerdo a datos de potenciometría o ¹H RMN.

(edta1py)H₂ en su estado totalmente desprotonado ($\phi=0.2$) así como la razón $I_E/I_M=5$ son los más altos observados en todo el conjunto de derivados a cualquier pH. Esta propiedad no la presenta (edta1mpy)H₂, con una razón I_E/I_M de tan solo 0.1. Las optimizaciones de geometría de estas dos moléculas realizadas por DFT [Machi, L. et al 2009] revelaron el efecto de la introducción del puente metileno en la pérdida de la conformación apropiada para formar excímero.

B. Influencia de la protonación en la eficiencia cuántica de las especies y su relación con la fluorescencia:

El análisis de los rendimientos cuánticos determinados para los ligantes **1-6** a diferentes condiciones de pH, en las cuales las moléculas muestran incrementos subsecuentes en el grado de protonación, revela lo siguiente:

1. En todos los casos, con excepción de (edta1py)H₂, la eficiencia cuántica varía siguiendo la misma tendencia que la intensidad de emisión, mostrando valores máximos a los pH donde la intensidad es máxima (edta1mpy, pH=9, $\phi=0.098$; dtpa1py, pH=8, $\phi=0.096$; dtpa1mpy, pH=11, $\phi=0.120$; ttha1py, pH=8, $\phi=0.112$; ttha1mpy, pH=11, $\phi=0.099$). Esto confirma la estrecha relación que existe entre las eficiencias cuánticas y las intensidades de emisión.
2. En el caso de (edta1py)H₂ a pH 8.5, la molécula mostró un comportamiento particular: el mayor rendimiento cuántico sobre el resto de los ligantes. Tomando en cuenta el perfil de intensidad vs pH observamos una región de intensificación en emisión de excímero, esto está relacionado con el rendimiento cuántico y podría ser una explicación a dicho resultado.

De manera general se observa que los cambios en el rendimiento cuántico, están asociados a los cambios en la intensidad de fluorescencia. Las variaciones en el estado de protonación de las moléculas provoca cambios en los mecanismos de desexcitación, teniendo así unas especies más eficientes que otras (ver Figuras 7A-10A). En medio básico se favorece la formación de excímero debido a la desprotonación de las

moléculas, las cuales se vuelven más flexibles y permiten el encuentro de una unidad molecular electrónicamente excitada con otra en su estado electrónico basal.

4.2. Determinación de los Tiempos de Vida Fluorescente.

Se determinaron los tiempos de vida de fluorescencia de las moléculas **1-6** (**Esquema I**) de acuerdo con la metodología descrita en la sección experimental. En las Figuras A11-A16, en la sección de anexos, se muestran las gráficas de los decaimientos de la fluorescencia, tanto de monómero como de excímero, tomadas a dos longitudes de onda diferentes, 395 nm y 480 nm, respectivamente. Los datos experimentales obtenidos se ajustaron a la Ecuación 7 usando el software ORIGIN 7.5. En la Tabla 3 se muestran los tiempos de vida obtenidos para cada uno de los ligantes a distintos pH.

A. Efecto del incremento en la longitud de la cadena de interconexión por introducción del puente metileno en los tiempos de vida de los compuestos 1-6:

1. edta1py vs. edta1mpy:

a) Los tiempos de vida tanto de monómero como de excímero, para cualquiera de las dos especies L^{2-} (pH=9.0) y LH (pH=6.0), son mayores para edta1mpy que para edta1py. Este resultado muestra que la introducción del puente metileno entre el grupo amida de la cadena de interconexión y el fluoróforo cancela rutas importantes de desactivación, lo que permite que tanto las unidades monoméricas excitadas M^* , como los excimeros a que éstas dan origen $M-M^*$, tengan vidas más largas.

2. ttha1py vs. ttha1mpy:

a) Los tiempos de vida tanto de monómero como de excímero, para cualquiera de las tres especies L^{4-} (pH=11.0), LH^3- (pH=8.0) y LH_2^{2-} (pH=6.0) son mayores para ttha1mpy que para ttha1py, con excepción de los tiempos de vida de excímero de las especies L^{4-} , que son prácticamente iguales para

los dos ligantes (ttha1py, 55.6 ns; ttha1mpy, 54.5 ns). Al igual que en el grupo anterior de ligantes, este resultado revela la cancelación de rutas de desactivación por efecto de la introducción del puente metileno entre el grupo amida y el fluoróforo, lo que permite que tanto las unidades monoméricas excitadas M^* , como los excimeros $M-M^*$ tengan vidas más largas.

3. dtpa1py vs. dtpa1mpy:

a) Tiempos de vida de monómero: Se observa una tendencia igual a la de los dos grupos anteriores de ligantes solo para las especies L^{3-} (pH=11): (dtpa1py=116.7 ns, dtpa1mpy= 137.1 ns). En el caso de las especies LH^{2-} (pH=8 para dtpa1mpy; pH=7 para dtpa1py), las cuales forman un puente de hidrógeno intramolecular, [Pérez-Gonzalez, R. et al. 2011] el tiempo de vida de monómero es más bajo para dtpa1mpy (dtpa1py= 157.9 ns, dtpa1mpy=137.6 ns).

b) Tiempos de vida de excímero: Se observa una tendencia igual a la de los dos grupos anteriores de ligantes solo para las especies LH^{2-} (dtpa1py=44.7ns, dtpa1mpy= 80.0 ns). En el caso de las especies L^{3-} , dtpa1py tiene tiempo de vida de excímero mayor que dtpa1mpy (dtpa1py=48.4ns, dtpa1mpy= 29.4 ns).

De los resultados anteriores puede concluirse que las especies LH^{2-} de dtpa1py (pH=7) presentan tiempo de vida de monómero muy alto (157.9 ns) y una eficiente formación de excímero, como lo muestra el perfil de emisión, aunque éste es de vida más corta (44.7 ns) que el de dtpa1mpy (80.0 ns).

B. Influencia de la protonación en los tiempos de vida de las especies:

En los casos donde es posible analizar cómo varía el tiempo de vida (de monómero y/o excímero) al cambiar el estado de protonación de las moléculas, se puede observar lo siguiente:

- a) El tiempo de vida de monómero aumenta con la protonación en los siguientes casos. Esta tendencia tiene sentido cuando se analiza desde el punto de vista de la cancelación de efectos PET e incremento en la rigidez (menos caminos de desactivación) en las especies protonadas por formación de puentes de hidrógeno intramoleculares.[Machi, L. et al. 2009]
- i) ttha1py: LH_2^{2-} (111.0 ns), LH^{3-} (109.7 ns), L^{4-} (102.0 ns).
 - ii) ttha1mpy: LH_2^{2-} (131.4.0 ns), LH^{3-} (124.8 ns), L^{4-} (123.1 ns).
 - iii) dtpa1py: LH^2 (137.6 ns), L^3 (137.1 ns).
 - iv) dtpa1py: LH^2 (157.9 ns), L^3 (116.7 ns).
- b) El tiempo de vida de monómero disminuye con la protonación en los siguientes casos. Esta tendencia se puede explicar si se considera que en los ligantes de edta, en sus estados totalmente desprotonados L^{2-} , las unidades pireno altamente hidrofóbicas definen la conformación de las moléculas por efecto de preasociación.[Pérez-Gonzalez,R.; Machi, L. et al. 2009, 2011] Este arreglo cancela rutas vibratorias de desactivación y favorece la existencia de especies excitadas de vida larga.
- i) edta1py: LH (94.0 ns), L^2 (103.8 ns)
 - ii) edta1mpy: LH (128.9.0 ns), L^2 (130.2 ns)
- c) La influencia de la protonación en los tiempos de vida de excímero solo es significativa en los siguientes casos. El resto de los ligantes o bien no presentan excímero en su estado protonado (edta1py y edta1mpy) o bien sus tiempos de vida no presentaron ninguna tendencia (ttha1py y ttha1mpy).
- i) dtpa1py: El tiempo de vida de excímero aumenta con la protonación LH^2 (80.0 ns), L^3 (29.4 ns).
 - ii) dtpa1py: El tiempo de vida de excímero disminuye con la protonación: LH^2 (44.7 ns), L^3 (48.4 ns).

Tabla 3. Tiempos de decaimiento de monómero y excímero de los ligantes 1-6 en solución Acuosa a diferente pH. $[L]=1 \times 10^{-6}M$, $\lambda_{exc}= 337 \text{ nm}$.

Ligante	pH	Especies	τ (M)	τ (E)
(edta1py) H_2	9.0	L^{2-}	103.8	36.6
	8.5	-	102.6	36.0
	8.0	-	102.2	40.1
	6.0	LH^-	94.0	-
(dtpa1py) H_3	11.0	L^{3-}	116.7	48.4
	9.0	-	63.2	51.8
	7.0	LH^{2-}	157.9	44.7
	6.0	-	114.3	63.2
(ttha1py) H_4	11.0	L^{4-}	102.0	55.6
	8.5	LH^{3-}	99.4	61.0
	8.0	LH^{3-}	109.7	45.8
	6.0	LH_2^{2-}	111.0	46.7
(edta1mpy) H_2	9.0	L^{2-}	130.2	59.2
	7.0	-	123.0	44.1
	6.0	LH^-	128.9	-
(dtpa1mpy) H_3	11.0	L^{3-}	137.1	29.4
	9.0	LH^{2-}	130.2	42.6
	8.0	LH^{2-}	137.6	80.0
	6.0	-	146.6	87.3
(ttha1mpy) H_4	11.0	L^{4-}	123.1	54.5
	8.0	LH^{3-}	124.8	51.6
	6.0	LH_2^{2-}	131.4	60.7

4.3. Determinaciones de tiempos de vida de la fluorescencia y rendimientos cuánticos de complejos de Zn^{2+} .

En la Tabla 4 se muestran los rendimientos cuánticos y tiempos de vida media, tanto de monómero como de excímero, determinados para los ligantes **1-6** en presencia de cantidades equimolares de ion Zn^{2+} . Se observaron comportamientos específicos para cada grupo de ligantes. A continuación se discute sobre las tendencias encontradas:

A. Complejos edta1py-Zn (pH=8.0) y edta1mpy-Zn (pH=7.0):

1. Rendimientos Cuánticos:

- A los valores de pH seleccionados para hacer el estudio se observaron incrementos en los rendimientos cuánticos fluorescentes, respecto a los ligantes libres, tanto para edta1py como para edta1mpy.

2. Tiempos de Vida:

- En el caso de edta1mpy, el tiempo de vida de monómero se incrementó y no se observó emisión de excímero. En contraste, el tiempo de vida de monómero de edta1py disminuyó mientras que el de excímero aumentó.
- Cuando se comparan los tiempos de vida de monómero de los complejos se observa que el de edta1mpy-Zn es más largo que el de edta1py-Zn. Esta tendencia es la misma que presentan los ligantes en forma libre (ver sección 4.2).

3. Mediciones de Tiempos de Vida en Soluciones Salinas:

- El análisis de los tiempos de vida de los complejos en soluciones salinas a pH similares (edta1py-Zn, pH 7.0; edta1mpy-Zn, pH 7.1) muestra que los tiempos de vida de los complejos de edta1mpy son más largos. Este mismo efecto se observó en las determinaciones realizadas en buffer (ver arriba).
- Otro aspecto que sobresale de los resultados es que edta1mpy en ausencia del buffer, es decir, en solución salina pH 7.1, sí presenta excímero y el tiempo de

Tabla 4. Tiempo de decaimiento del Monómero y Excímero en Solución Acuosa en coordinación con el ion metálica Zn^{2+} ($1 \times 10^{-6}M$) en función del pH ($\lambda_{exc}= 337$ nm), así como el Rendimiento Cuántico utilizando ($\lambda_{exc}= 342$ nm).

Ligante	pH	Tiempo de vida media τ (ns)		Φ_f
		τ (M)	τ (E)	
(edta1py)H ₂	8.0	95.024 (102.2)*	45.16 (40.1)*	0.0856 (0.022)*
	7.3 ^a	108.78	65.57	
(dtpa1py)H ₃	7.0	110.48 (157.9)*	38.53 (44.7)*	0.0412 (0.040)*
	8.0	107.92 - ^b	46.30 - ^b	0.0761 (0.112)*
	7.2 ^a	118.78	48.09	
(ttha1py)H ₄	8.0	132.91 (109.7)*	32.67 (45.8)*	0.1419 (0.112)*
	7.6 ^a	112.43	41.37	
(edta1mpy)H ₂	7.0	136.25 (123.0)*	- ^c (44.1)*	0.0958 (0.078)*
	8.0	140.80 - ^b	78.55 - ^b	0.0444 - ^b
	7.1 ^a	203.52	91.05	
(dtpa1mpy)H ₃	8.0	134.06 (137.6)*	41.01 (80.0)*	0.0841 (0.046)*
	7.1 ^a	159.80	66.82	0.0811
(ttha1mpy)H ₄	8.0	128.02 (124.8)*	58.56 (51.6)*	0.0761 (0.064)*
	7.1 ^a	148.28	65.35	

^a Solución acuosa en NaCl 0.01M.

^b No determinado.

^c No muestra excímero.

* Ligante en su forma libre.

vida es el más grande determinado (91.05 ns). Adicionalmente puede notarse que el tiempo de vida de monómero es mayor respecto al obtenido en buffer de pH=7.0. Este mismo efecto de mayores tiempos de vida en solución salina se observó en el caso de dtpa1py (ver abajo). Se puede asumir que sí hay un efecto del buffer en los tiempos de vida de las especies.

B. Complejos dtpa1py-Zn (pH=7.0) y dtpa1mpy-Zn (pH=8.0):

1. Rendimientos Cuánticos:

- A los valores de pH seleccionados para hacer el estudio se observó un incremento de casi el doble en el rendimiento cuántico fluorescente de dtpa1mpy, y un incremento pequeño para dtpa1py.

2. Tiempos de Vida:

- Los tiempos de vida tanto de monómero como de excímero disminuyeron en los complejos dtpa1py-Zn y dtpa1mpy-Zn respecto a los ligantes libres.
- Los tiempos de vida tanto de monómero como de excímero del complejo dtpa1mpy-Zn son más largos que los de dtpa1py-Zn. Este mismo efecto se observó para la emisión de monómero en el caso de edta1mpy (ver arriba).

3. Mediciones de Tiempos de Vida en Soluciones Salinas:

- El análisis de los tiempos de vida de los complejos en solución salina a pH similares (dtpa1py-Zn, pH 7.0; dtpa1mpy-Zn, pH 8.0) muestra que los tiempos de vida del complejo dtpa1mpy-Zn son más largos que los de dtpa1py-Zn. Este efecto también fue observado en las determinaciones en buffer (ver arriba).

- Otro aspecto es que dtpa1py-Zn en ausencia del buffer, es decir, en solución salina pH 7.2, presenta tiempos de vida más grandes tanto para monómero como para excímero, respecto a la solución en buffer pH 7.0. Esto mismo ocurrió con el complejo edta1mpy-Zn lo que sugiere que hay un efecto del buffer en los tiempos de vida de las especies, aparentemente reduciéndolos.

C. Complejos ttha1py-Zn (pH=8.0) y ttha1mpy-Zn (pH=8.0):

1. Rendimientos Cuánticos:

- Al pH seleccionado para hacer el estudio se observó en ambos casos un incremento en los rendimientos cuánticos fluorescentes respecto a los ligantes libres.

2. Tiempos de Vida

- Los tiempos de vida, tanto de monómero como de excímero, del complejo ttha1mpy-Zn aumentaron respecto al ligante libre. En el caso del complejo ttha1py-Zn , el tiempo de vida de monómero se incrementó y el de excímero disminuyó respecto al ligante libre.
- El tiempo de vida de excímero del complejo ttha1mpy-Zn es más largo que el de ttha1py-Zn . Esta tendencia es la misma que la de los ligantes en forma libre.
- Cuando se comparan los tiempos de vida de los complejos en solución salina a pH similares (ttha1py-Zn , pH 7.6; ttha1mpy-Zn , pH 7.1) se observa que los tiempos de vida tanto de monómero como de excímero del complejo ttha1mpy son más largos. En buffer a pH=8 esto solo se observa para la emisión de excímero

5. CONCLUSIONES.

A. Se determinaron los rendimientos cuánticos y tiempos de vida de fluorescencia de seis ligantes biscromofóricos de cadena abierta, funcionalizados con pireno, con cadenas de interconexión tipo edta, dtpa y ttha. Las mediciones se realizaron en solución acuosa a diferente pH, con el propósito de establecer el efecto del estado de protonación de las moléculas en las propiedades fotofísicas investigadas. De este estudio se puede concluir lo siguiente:

- a) En el caso de los derivados de dtpa y ttha, se encontró que, bajo las condiciones de pH en las cuales las moléculas se encuentran totalmente desprotonadas, los rendimientos cuánticos son mayores para aquellas que contienen un puente metileno entre el grupo amida y el pireno. Esto indica que el grupo metileno cancela el efecto amortiguador del grupo amida sobre el fluoróforo.
- b) En el caso de los derivados de edta, el mayor rendimiento cuántico fue observado para edta1py. Esto se correlacionó con la intensa emisión de excímero que presenta esta molécula en estado desprotonado.
- c) En todos los casos, con excepción de (edta1py)₂, la eficiencia cuántica varía siguiendo la misma tendencia que la intensidad de emisión, mostrando valores máximos a los pH donde la intensidad es máxima. En general, los rendimientos son mayores a pH intermedios o altos en la ventana de pH, lo cual coincide con las intensidades de emisión.

- d) Respecto a los tiempos de vida de fluorescencia, se corroboró la tendencia ya reportada en la literatura: En todos los casos los tiempos de vida media de monómero fueron mayores que los tiempos de vida de excímero.
- e) En el caso de los derivados de edta y ttha, los tiempos de vida tanto de monómero como de excímero, en todas las especies formadas en solución, son mayores para las moléculas que contienen un puente metileno entre el grupo amida y el pireno. Esto indica que el puente $-\text{CH}_2-$ cancela rutas importantes de desactivación, lo que permite que tanto las unidades monoméricas excitadas, como los excimeros a que éstas dan origen tengan vidas más largas.
- f) En el caso de los derivados de dtpa, los tiempos de vida no siguen una tendencia específica en relación con la estructura molecular o el estado de protonación. En general se observó que el derivado dtpa1mpy solo muestra tiempos de vida más largos que los de su análogo dtpa1py en las siguientes circunstancias: 1) Emisión de monómero a $\text{pH}=11$ (especie L^{3-}) y 2) Emisión de excímero a $\text{pH}=8$ (especies LH^{2-}).

B. Se determinaron los rendimientos cuánticos y tiempos de vida de fluorescencia de los seis ligantes en presencia de cantidades equimolares de ion Zn(II) en buffer TRIZMA a pH seleccionados. Se midieron también los tiempos de vida de los complejos en soluciones salinas (NaCl 0.01M) con el propósito de conocer la influencia del buffer en la propiedad investigada. De estos estudios se puede concluir lo siguiente:

- a) En todos los casos estudiados se encontró un incremento en los rendimientos cuánticos fluorescentes de los ligantes por efecto del ion Zn(II). Esto indica que la coordinación al metal incrementa la rigidez de los sistemas y cancela rutas vibratorias de desactivación.
- b) Los tiempos de vida de los complejos no mostraron tendencias específicas que puedan correlacionarse con las estructuras de los ligantes. Solo en el caso del complejo ttha1mpy-Zn se observó un incremento en los tiempos de vida tanto de monómero como de excímero respecto al ligante libre. Por ser ttha1mpy el ligante de cadena de interconexión más larga, y en consecuencia el más flexible, la organización alrededor del ion metálico es muy ventajosa en términos de incremento en la rigidez del sistema.
- c) Al igual que en los ligantes libres, los tiempos de vida media de monómero de los complejos fueron mayores que los tiempos de vida de excímero. Esto se cumplió tanto en buffer como en soluciones salinas.
- d) Se encontraron tiempos de vida media más largos para los complejos formados con los ligantes que contienen un puente metileno (edta1mpy, dtpa1mpy y ttha1mpy) respecto a aquellos formados por los ligantes edta1py, dtpa1py y ttha1py, respectivamente. Esta tendencia es igual a la observada en los ligantes libres y se cumplió tanto en buffer como en soluciones salinas.
- e) En todos los casos se encontró que el uso de buffer reduce los tiempos de vida de los complejos respecto a lo observado en soluciones salinas. Esto indica que hay una influencia amortiguadora de fluorescencia del tris-(hidroximetil)aminometano (TRIZMA) sobre la fluorescencia de los complejos.

6. PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES

Con base en los resultados de este trabajo de tesis se sugiere lo siguiente:

- 1) Continuar este estudio enfocándolo a otros metales bioactivos como Ca(II) y Mg(II). Esto con el propósito de avanzar en el diseño de quimiosensores fluorescentes de metales basados en tiempos de vida, con aplicación en determinaciones intracelulares.
- 2) Obtener los tiempos de vida media con equipo de mayor resolución para poder determinar si los excímeros son dinámicos o estáticos. Una posible aplicación de esta información sería el diseño de interruptores (switches) temporales.
- 3) Sintetizar moléculas análogas a las estudiadas en este trabajo, con otros sitios de unión del fluoróforo a la cadena de interconexión. Esto podría mejorar las propiedades fotofísicas de los ligantes y complejos.

BIBLIOGRAFÍA

Acuña-Elgueta, J.F., Williams-Pinto, S., Salas, L.S. “*Luminiscencia*”. Universidad de Concepción, **2006**, 1-9

AnaSpec, Inc. <http://www.anaspec.com/products/product.asp?id=28763>, **2002-2011**

Birks, J.B., “Excimers”. *Rep. Prog. Phys.* **1975**, 38, 903-974.

Bissell, R.A., Prasanna de Silva, Mark-Lynch, P.L., Glenn, E., Maguire, M., Samankumara, S. “Molecular fluorescent signalling with ‘fluor–spacer–receptor’ systems: approaches to sensing and switching devices *via* supramolecular photophysics”. *Chemical Society Review*, **1992**, 21, 187-195

Fery-Forgues, S., Lavabre, D. “Are Fluorescence Quantum Yields So Tricky to Measure? A Demonstration Using Familiar Stationery Products”. *J. Chem. Edu.* **1999**, 76, 1260-1264.

Kim, J.S., Myung, G.C., Cheol, S., Kyoung, T., Sangdoo, A., Suk-Kyu C., “Ratiometric Determination of Hg^{2+} Ions Based on Simple Molecular Motif of Pyrene and Dioxaoctanediamide”. *Organic Letters*, **2007**, 9, 1129-1132.

Klessinger, M., Milch, J.F. *Excited states and photochemistry of organic molecules*; VCH **1995**, 247-250.

Kyu, C. “Ratiometric Determination of Hg^{2+} Ions Based on Simple Molecular Motif of Pyrene and Dioxaoctanediamide”. *Organic Letters*, **2007**, 9, 1129-1132.

Lakowics, J.R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 3ra edición, Springer; **1999**

Lehn, J.M. *Supramolecular chemistry: Concepts and Perspectives*. Wiley-VCH. República Federal de Alemania, **1995**.

Lijun, M., Hongwei, L., Yuqing, W. “A Pyrene-Containing Fluorescent Sensor with high Selectivity for lead(II) ion in water with dual illustration of ground-state dimer”. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **2009**,143, 25-29.

Machi, L., Muñoz, I., Pérez-González, R., Sánchez, M., Inoue, M. “Pyrene-bichromophores composed of polyaminopolycarboxylate interlink: pH response of excimer emission”. *Supramolecular Chemistry*, **2009**, 21, 665-673.

McCarthy, W.J. y Winwfordner, J.D. “The Selection of Optimum Conditions for Spectrochemical Methods”. *Journal of Chemical Education*, **1967**, 44, 136-141.

MingJian, Y., YongJun, L., HuiBiao, L., YuLiang, L. “Chemical sensors based on π -conjugated organic molecules and gold nanoparticles”, *Science China Series B:Chemistry* , **2009**, 52, 715-730

Muñoz, I. “Estudio espectroscópico y de coordinación metálica en solución de ligantes macrocíclicos tipo ciclofano y de nuevos ligantes de cadena abierta derivados de Pireno”. Tesis Doctorado, Universidad de Sonora, **2001**

Pérez-González, R., Machi, L., Inoue, M., Sánchez, M., Medrano, F. “Fluorescence and conformation in water-soluble bis(pyrenyl amide) receptors derived from polyaminopolycarboxylic acids”, *J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry*, **2011**, 219, 90-100.

Prodi, L., Montalti, M., Zaccheroni, N., Dolci, L.S. “Topics in Fluorescence Spectroscopy”. 2^{da} edición. Editorial: Springer US. **2005**, 9, 1-57.

Santacruz H. Tesis Doctorado, “Síntesis y Caracterización Espectroscópica de Agentes Qulantes Fluorescentes y sus Complejos Metálicos”, Universidad de Sonora, Mayo **2007**

Shiraishi, Y., Tokitoh, Y., Nishimura G., Hirai, T. “pH-and H₂O-Driven Triple-Mode Pyrene Fluorescence”, *Organic Letters*, **2006**, 8, 3841-3844.

Shiraishi, Y., Tokitoh, Y., Nishimura, G., Hirai, T. "A molecular Switch with pH-controlled Absolutely Switchable Dual-Mode Fluorescence". *Organic Letters*, **2005**, 7, 2611-2614.

Shiraishi, Y., Ishizumi, K., Nishimura, G., Hirai, T. "Effects of Metal Cation Coordination on Fluorescence Properties of a Diethylenetriamine Bearing Two End Pyrene Fragments," *Chem. B*, **2007**, 111, 8812-8822.

Skoog, D.A., Holler, F.J., Nieman, T. A. *Principios de Análisis Instrumental*. 5^{ta} edición, Editorial: McGraw-Hill, Interamericana de España, S. A. U., **2001**, 353-363, 381-389, 409-418, 481-506, 537.

Valeur, B. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*, 1era edición, Wiley-Vch; **2001**

Winnik, F.M. "Photophysics of Preassociated Pyrenes in Aqueous Polymer Solutions and in Other Organized Media", *Chem. Rev*, **1993**, 93, 587-614.

Yatsimirsky, A.K. Química Supramolecular, *La Enciclopedia de la ciencia y Tecnología en México*, **2009**

Zorrilla-López S. Tesis Doctoral, "Estructura Y Dinámica de Proteínas en Condiciones de Aglomeración Macromolecular: Desarrollo de Métodos Avanzados de Espectroscopía Láser de Fluorescencia con Resolución Temporal De Picosegundos", Universidad Complutense de Madrid, **2002**

ANEXOS

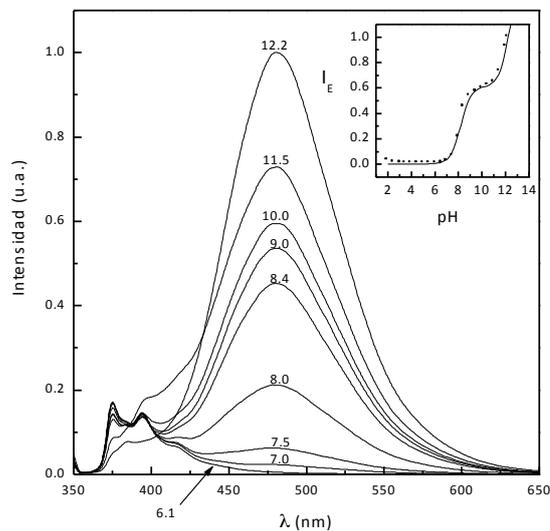


Figura A 1. Espectro de emisión del $(\text{edta1py})\text{H}_2$ en solución acuosa en diferentes pH seleccionados. Las intensidades espectrales son normalizadas al pico máximo de la intensidad del espectro. La longitud de onda de excitación $\lambda_{\text{exc}}=342\text{nm}$, y la concentración es de $2 \times 10^{-6}\text{M}$. La intensidad de emisión (u.a.) a 490 nm como función del pH.

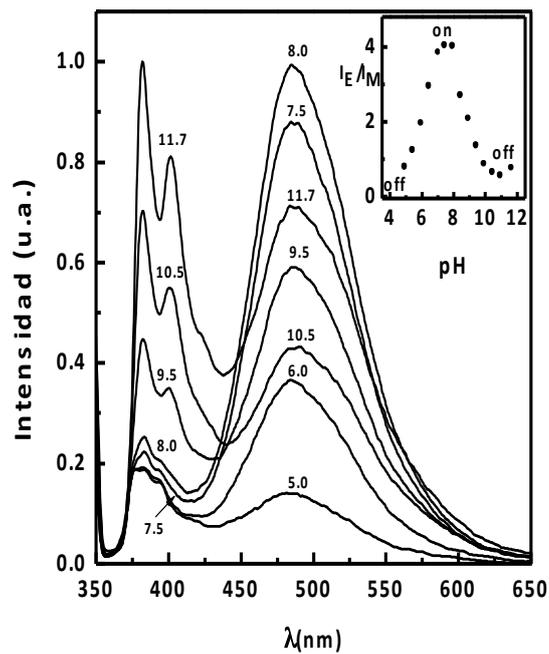


Figura A 2. Espectros de emisión de $(dtpalpy)H_3$ en solución acuosa a diferente pH. $\lambda_{exc} = 342$ nm, $[L] = 1 \mu M$. Recuadro: razón de intensidades I_E/I_M en función del pH.

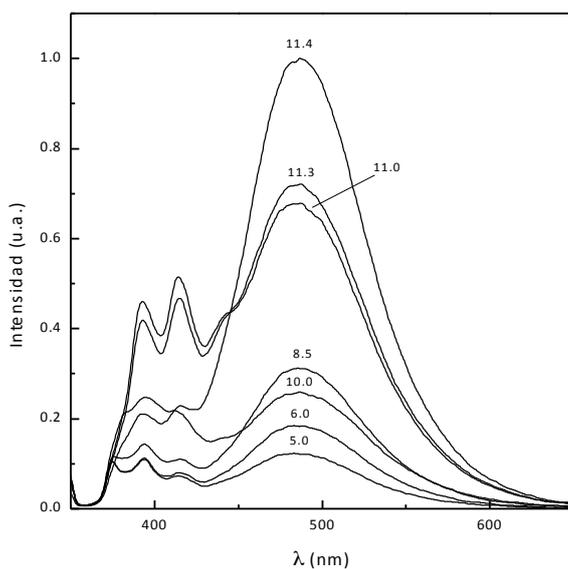


Figura A 3. Espectro de emisión del $(tthalpy)H_4$ en solución acuosa. Las intensidades espectrales están normalizadas en el pico máximo del espectro más intenso. La longitud de onda de excitación es de $\lambda_{exc} = 342$ nm, y la concentración de $1 \times 10^{-6} M$.

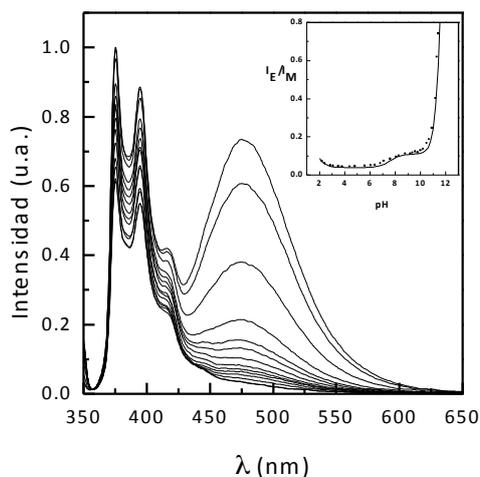


Figura A 4. Espectro de emisión de $(\text{edta1mpy})\text{H}_2$ en solución acuosa a valores de pH seleccionados. Las intensidades espectrales son normalizadas al pico máximo de la intensidad del espectro. La longitud de onda de excitación, $\lambda_{\text{exc}}=342$ nm, y la concentración es de $1 \times 10^{-6}\text{M}$. La proporción de intensidad de excímero-a-monómero I_E/I_M en función del pH.

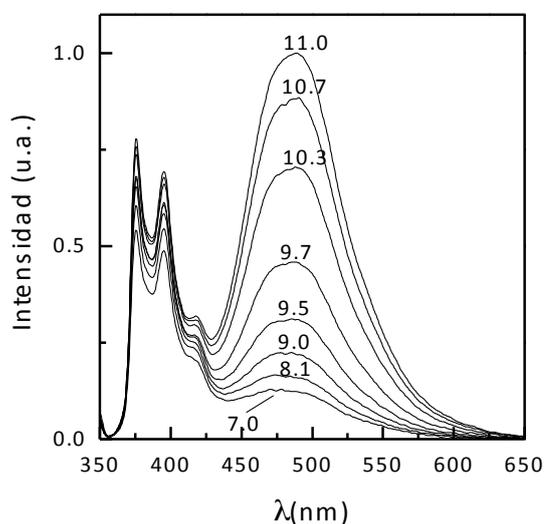


Figura A 5. Espectro de emisión de $(\text{dtpa1mpy})\text{H}_3$ en solución acuosa a valores de pH seleccionados. Las intensidades espectrales son normalizadas al pico máximo de la intensidad del espectro. La longitud de onda de excitación es, $\lambda_{\text{exc}}=342$ nm, y la concentración $1 \times 10^{-6}\text{M}$.

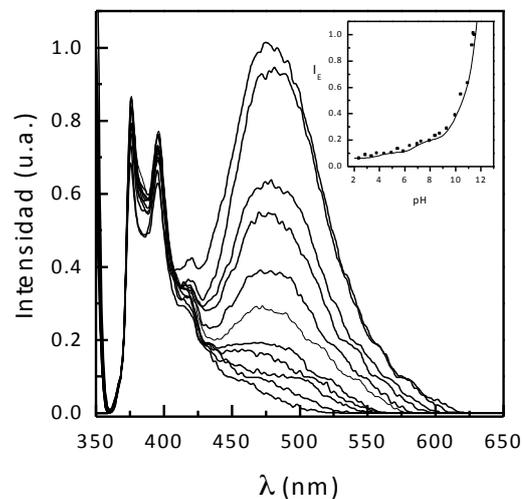


Figura A 6. Espectro de emisión de (ttha1mpy)H₄ en solución acuosa a valores de pH seleccionados. Las intensidades espectrales son normalizadas al pico máximo de la intensidad del espectro. La longitud de onda de excitación es, $\lambda_{exc}=342$ nm, y la concentración 5×10^{-7} M. La razón de intensidades excímero-monómero I_E/I_M como función del pH.

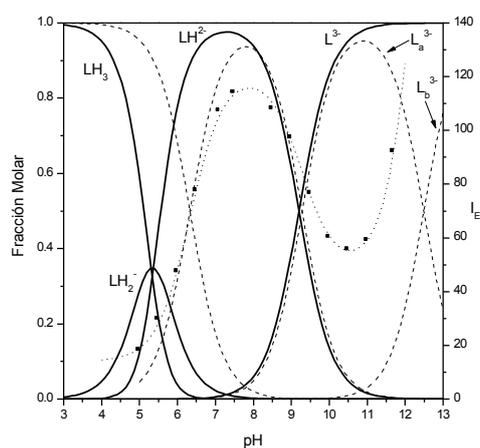


Figura A 7. Espectro de distribución de especies del (dtpa1py)H₃ en solución acuosa a valores de pH seleccionados, así como la proporción de intensidades.

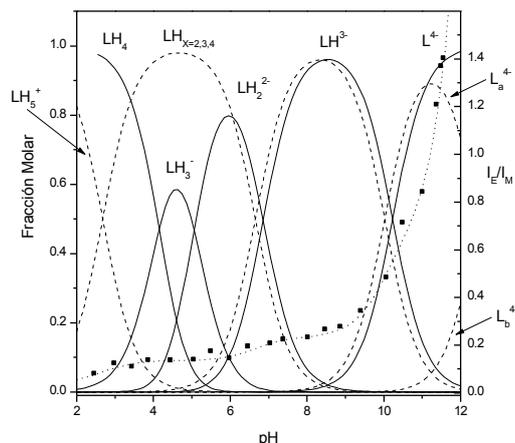


Figura A 10. Espectro de distribución de especies del (ttha1mpy)H₄ en solución acuosa a valores de pH seleccionados, así como la proporción de intensidades. La concentración es de 5×10^{-7} M.

Tabla 1A. Absorbancias (A) a 342 nm de los compuestos 1-6.^a

(edta1py)H ₂	A	(dtpa1py)H ₃	A	(ttha1py)H ₄	A
pH 9	0.414	pH 11	0.564	pH 11	0.389
pH 8.5	0.545	pH 9	0.592	pH 8	0.390
pH 8	0.571	pH 7	0.499	pH 6	0.396
pH 6	0.574	pH 6	0.468		
(edta1mpy)H ₂	A	(dtpa1mpy)H ₃	A	(ttha1mpy)H ₄	A
pH 9	0.459	pH 11	0.475	pH 11	0.433
pH 7	0.352	pH 9	0.561	pH 6	0.580
pH 6	0.296	pH 8	0.472		
		pH 6	0.558		

^a Se muestran solo datos representativos.

Tabla 2A. Áreas bajo la curva [F(x)] de los espectros de fluorescencia de los compuestos 1-6 en su forma libre ($\lambda_{exc} = 342 \text{ nm}$).^a

(edta1py)H₂	F(x)	(dtpa1py)H₃	F(x)	(ttha1py)H₄	F(x)
pH 9	1224093	pH 11	38275903	pH 11	38598233
pH 8.5	45964823	pH 9	44112264	pH 8	15782310
pH 8	15615115	pH 7	24700799	pH 6	34404671
pH 6	27124938	pH 6	16344140		
(edta1mpy)H₂	F(x)	(dtpa1mpy)H₃	F(x)	(ttha1mpy)H₄	F(x)
pH 9	55349391	pH 11	70442561	pH 11	52544499
pH 7	337464623	pH 9	55284679	pH 6	26442809
pH 6	482457800	pH 8	187562		
		pH 6	35510304		

^a Se muestran solo datos representativos.

Tabla 3A. Absorbancias (A) a $\lambda = 342 \text{ nm}$ de las moléculas 1-6 en presencia del ion Zn^{2+} .^a

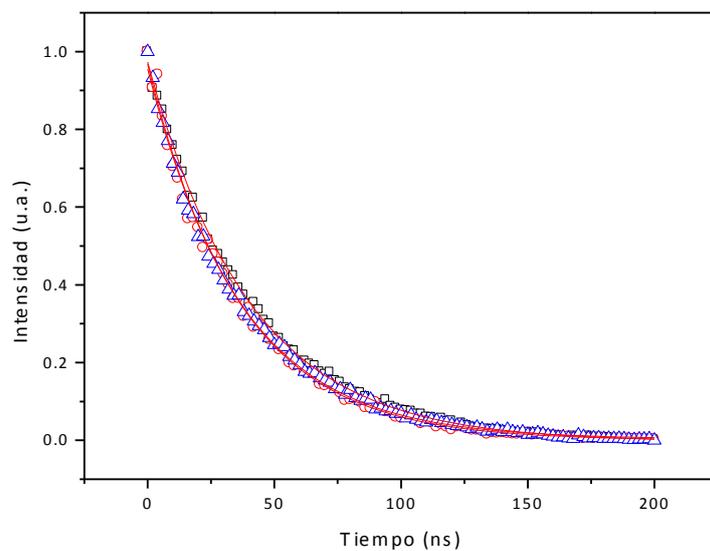
(edta1py)H₂	A	(dtpa1py)H₃	A	(ttha1py)H₄	A
pH 8	0.571	pH 8	0.411	pH 8	0.390
		pH7	0.499		
(edta1mpy)H₂	A	(dtpa1mpy)H₃	A	(ttha1mpy)H₄	A
pH 7	0.352	pH 8	0.558	pH 7	0.557

^a Se muestran solo datos representativos.

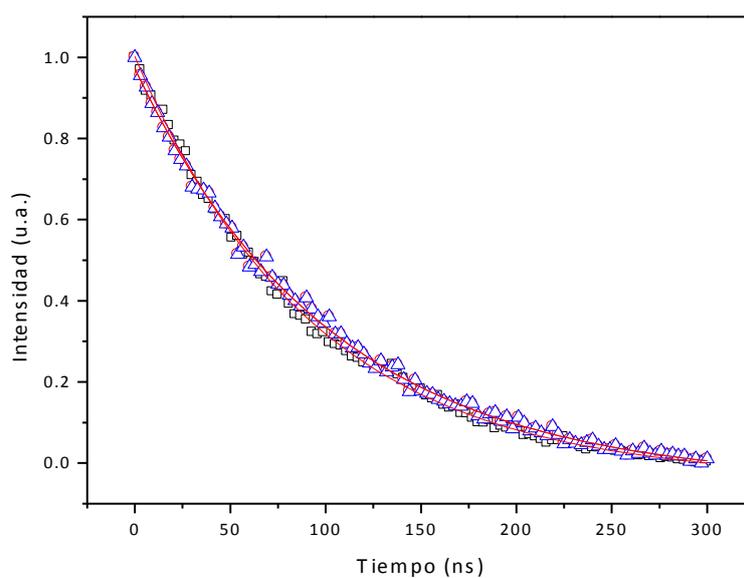
Tabla 4A. Áreas bajo la curva [F(x)] de los espectros de fluorescencia de las moléculas 1-6 en presencia del ion Zn^{2+} ($\lambda_{exc} = 342 \text{ nm}$).^a

(edta1py)H₂	F(x)	(dtpa1py)H₃	F(x)	(ttha1py)H₄	F(x)
pH 8	15615115	pH 8	46643252	pH 8	93900296
		pH7	24700799		
(edta1mpy)H₂	F(x)	(dtpa1mpy)H₃	F(x)	(ttha1mpy)H₄	F(x)
pH 7	337464623	pH 8	38161701	pH 8	44492648

^a Se muestran solo datos representativos.

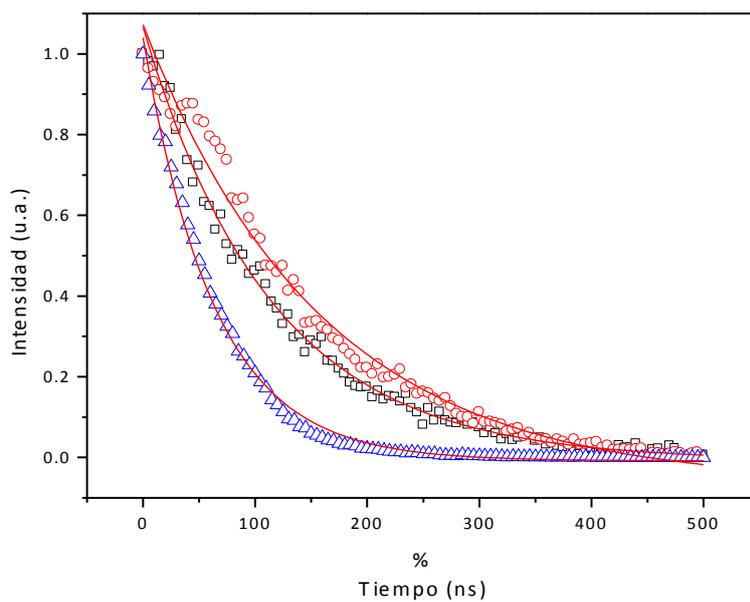


a)

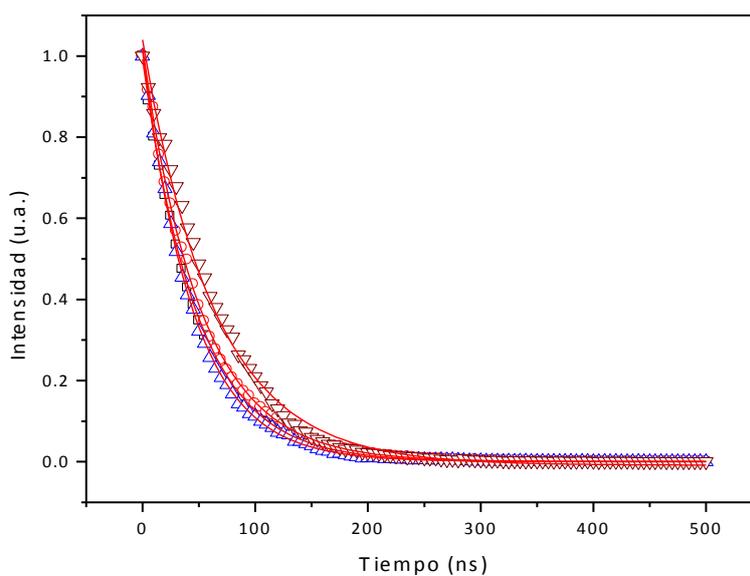


b)

Figura A 11. Decaimiento de la intensidad de emisión de (a) excímero ($\lambda=480\text{nm}$) y (b) monómero ($\lambda=395\text{nm}$) de $(\text{edta1py})\text{H}_2$ en función del tiempo a diferente pH: 9.0, 8.5, 8.0, 6.0 ; $\lambda_{\text{exc}}=337\text{nm}$, $[\text{L}]= 1 \times 10^{-6}\text{M}$. Las líneas sólidas fueron calculadas con la Ecuación 7.

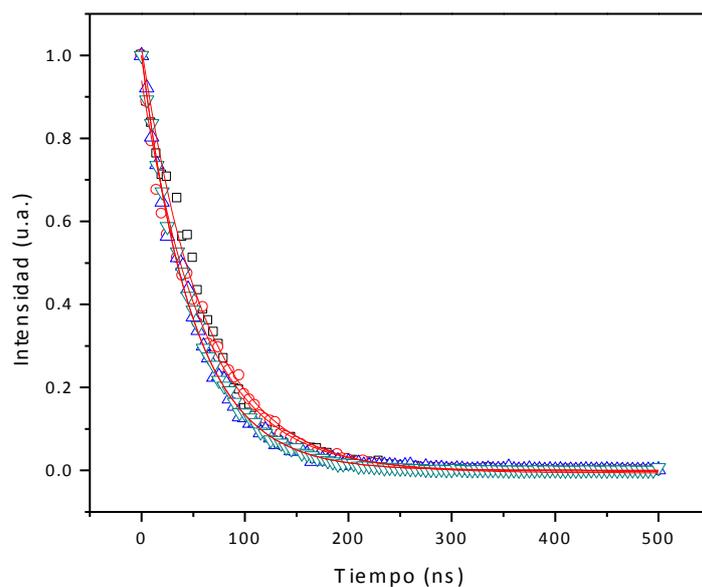


a)

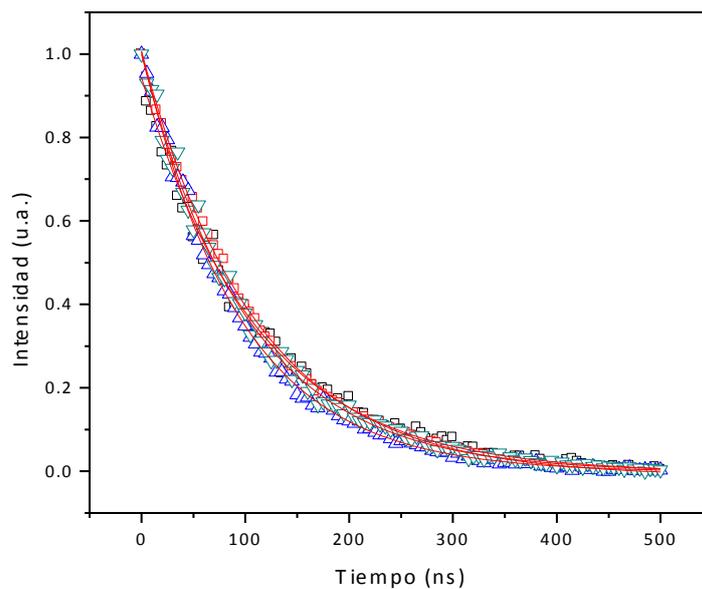


b)

Figura A 12. Decaimiento de la intensidad de emisión de (a) excímero ($\lambda=480\text{nm}$) y (b) monómero ($\lambda=395\text{nm}$) de $(\text{dtpa1py})\text{H}_3$ en función del tiempo a diferente pH: 11.0, 9.0, 8.0, 6.0; $\lambda_{\text{exc}}=337\text{nm}$, $[\text{L}]= 1 \times 10^{-6}\text{M}$. Las líneas sólidas fueron calculadas con la Ecuación 7.

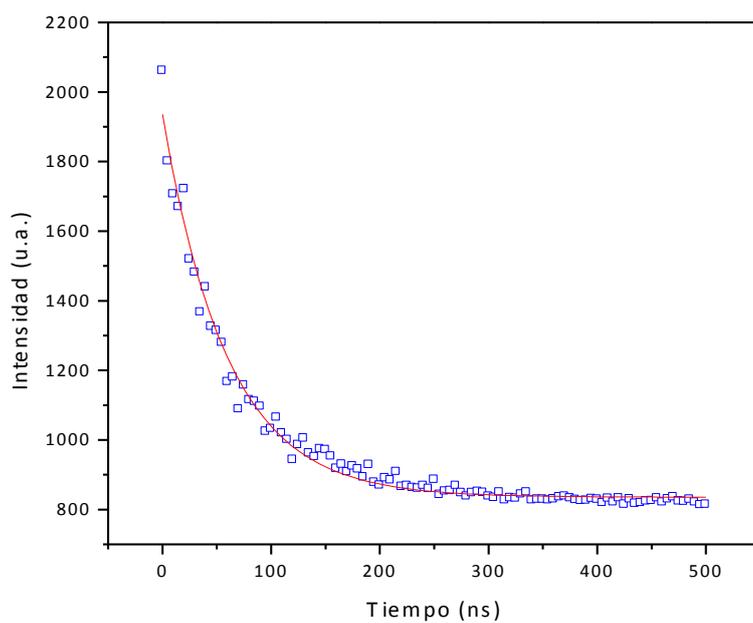


a)

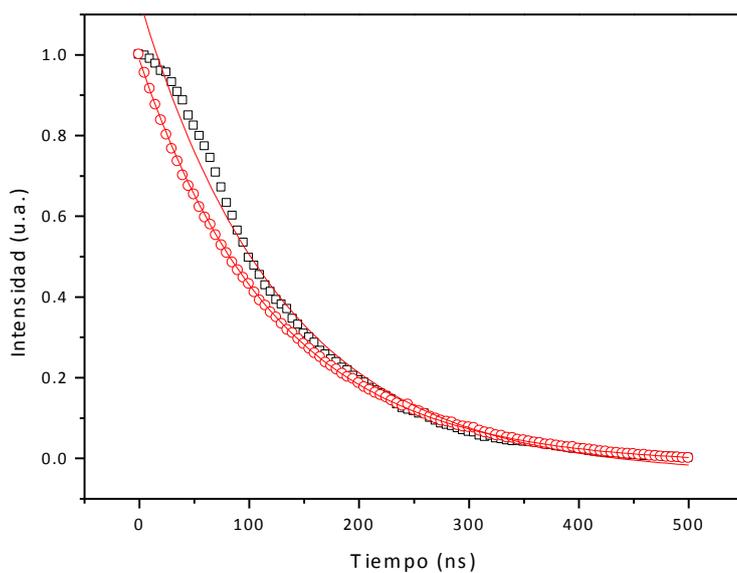


b)

Figura A 13. Decaimiento de la intensidad de emisión de (a) excímero ($\lambda=480\text{nm}$) y (b) monómero ($\lambda=395\text{nm}$) de (tthalpy) H_4 en función del tiempo a diferente pH: 11.0, 8.5, 8.0, 6.0; $\lambda_{\text{exc}}=337\text{nm}$, $[\text{L}]=1 \times 10^{-6}$ M. Las líneas sólidas fueron calculadas con la Ecuación 7.

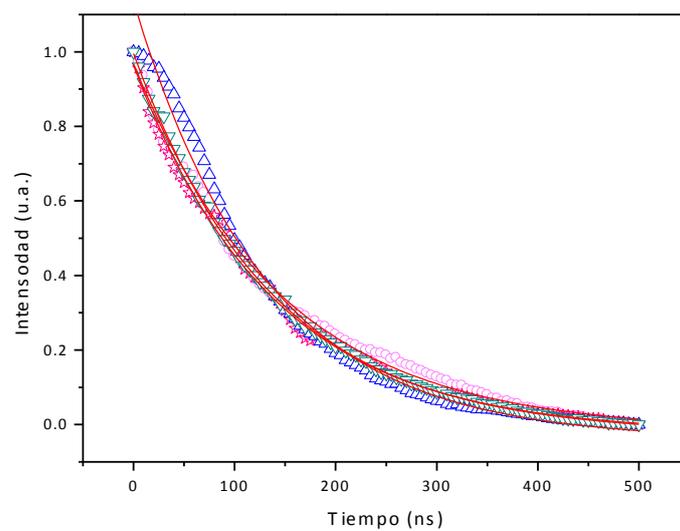


a)

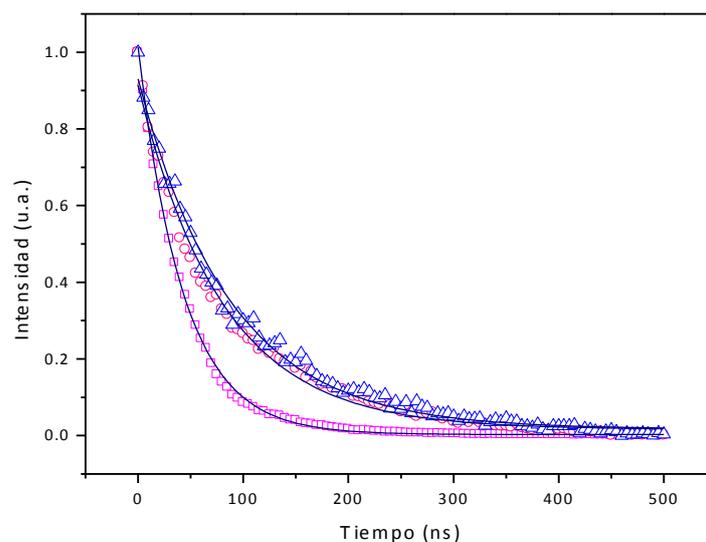


b)

Figura A 14. Decaimiento de la intensidad de emisión de (a) excímero, pH 9.0 ($\lambda=480\text{nm}$) y (b) monómero, pH 9.0, 7.0 ($\lambda=395\text{nm}$) de $(\text{edta1mpy})\text{H}_2$ en función del tiempo. $\lambda_{\text{exc}}=337\text{nm}$, $[\text{L}]=1 \times 10^{-6}\text{M}$. Las líneas sólidas fueron calculadas con la Ecuación 7.

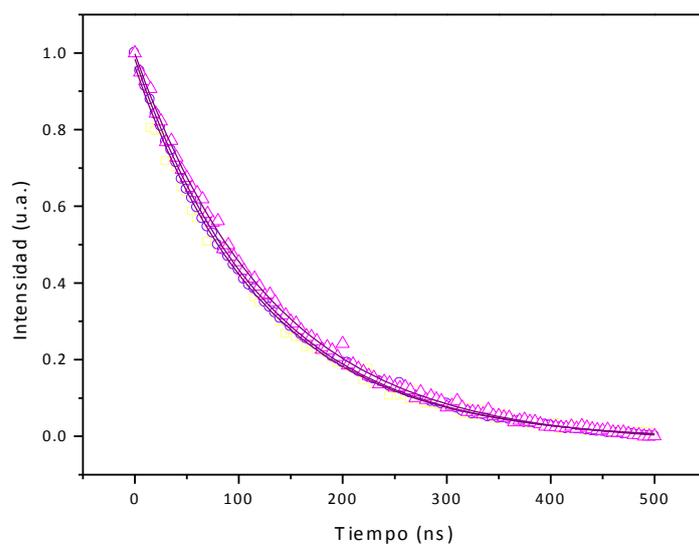


a)

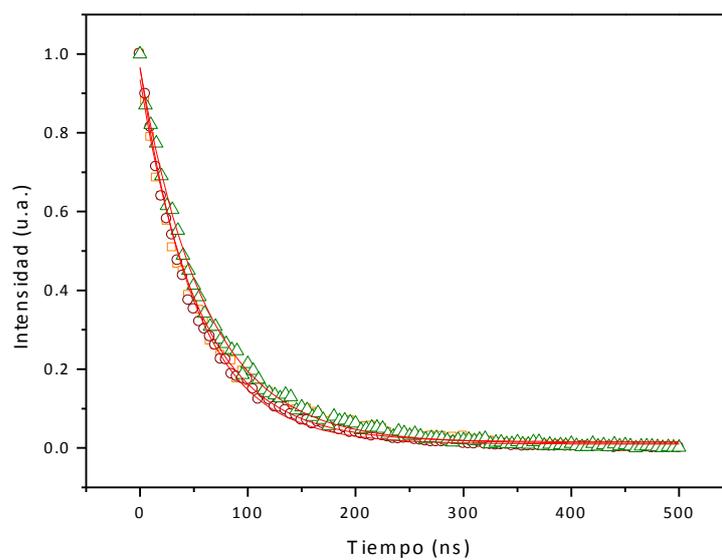


b)

Figura A 15. Decaimiento de la intensidad de emisión de (a) excímero ($\lambda=480\text{nm}$) y (b) monómero ($\lambda=395\text{nm}$) de $(\text{dtpa1mpy})\text{H}_3$ en función del tiempo a diferente pH: 11.0 (cuadros abiertos), 9.0 (círculos abiertos), 8.0 (triángulos abiertos), 6.0 (triángulos volteados); $\lambda_{\text{exc}}=337\text{nm}$, $[\text{L}]=1 \times 10^{-6}\text{M}$. Las líneas sólidas fueron calculadas con la Ecuación 7.



a)



b)

Figura A 16. Decaimiento de la intensidad de emisión de (a) excímero ($\lambda=480\text{nm}$) y (b) monómero ($\lambda=395\text{nm}$) de $(\text{thalmpy})\text{H}_4$ en función del tiempo a diferente pH: 11.0, 8.0, 6.0; $\lambda_{\text{exc}}=337\text{nm}$, $[\text{L}]=1 \times 10^{-6}\text{M}$. Las líneas sólidas fueron calculadas con la Ecuación 7.

TRABAJOS Y PUBLICACIONES REALIZADAS

XV Reunión Universitaria de Investigación en Materiales (RUIM 2010). Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora, México. Los días 8, 9 y 10 de diciembre del 2010.

“Caracterización fotofísica de nuevas sondas moleculares fluorescentes con aplicación potencial en la determinación de diversos analitos en solución”.

I International Conference on New Trends in Luminescence and Phosphor Materials (LUMIPHOM 2010). Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora, México. Los días 4-8 de octubre del 2010.

“Photophysical Characterization of New Fluorescent Molecular Probes with Potential Application for Dissolved Analyte Determination”.

IX Coloquio Bienal en Ciencias de Materiales. Universidad de Sonora, Hermosillo Sonora México. Los días 1 al 4 de marzo de 2011.

“Photophysical Characterization of New Fluorescent Molecular Probes with Potential Application for Dissolved Analyte Determinatio”.

46o CONGRESO MEXICANO DE QUÍMICA, ExpoCentro del Hotel Misión Juriquilla, Querétaro, Qro. Los días 10 al 14 de septiembre de 2011.

“Caracterización Fotofísica de Nuevos Quimiosensores Fluorescentes Acíclicos Tipo Bis-Pirenil”.

XVI Reunión Universitaria de Investigación en Materiales (RUIM 2011). Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora, México. Los días 23 al 25 de Noviembre del 2011.

“Caracterización Fotofísica de Nuevos Quimiosensores Fluorescentes Acíclicos Tipo Bis-Pirenil”.