Capítulo 10

QUENCHING DE FLUORESCENCIA POR ANIONES

Como se mencionó en el *Capítulo 6* algunas sustancias pueden producir una disminución de la emisión fluorescente, siguiendo una comportamiento de Stern-Volmer. En muchos estudios fotofísicos es frecuente el uso de soluciones reguladoras para controlar el pH de trabajo. Sin embargo, en algunos casos, los aniones presentes en dichas soluciones pueden disminuir la fluorescencia de moléculas emisoras en solución acuosa. En distintos experimentos, encarados durante la realización del presente trabajo de tesis, se detectó que la fluorescencia de las pterinas disminuía si en la solución se hallaban presentes aniones fosfato en concentraciones del orden de 100 mM; es decir, estos experimentos sugerían un fenómeno de *quenching* de fluorescencia. Este hecho es relevante teniendo en cuenta las aplicaciones analíticas que posee la fluorescencia de las pterinas [McCormack y Newman, 1985]. En efecto, tal como se mencionó anteriormente, esta propiedad es empleada en la determinación cuantitativa de pterinas. En particular, estas determinaciones son muy frecuentes en estudios de química biológica y bioquímica clínica. Uno de los métodos más usados con este fin, es el de HPLC con detector de fluorescencia. En esta técnica, las sustancias presentes en la muestra a analizar son separadas en una columna cromatográfica y luego pasan por un detector que mide la fluorescencia. Generalmente, se usan como eluentes (fase móvil) soluciones reguladoras con altos contenidos de aniones, por ejemplo fosfato. Está claro que, si la emisión fluorescente de las pterinas se ve afectada por la presencia de fosfato u otros aniones en la solución, esto puede, a su vez, afectar la sensibilidad de la determinación analítica de las pterinas por el método descripto, o por cualquier otro método que suponga una relación lineal entre la luz emitida y la concentración de un

determinado derivado pterínico. También es importante desde el punto fotofísico y fotoquímico, ya que algunos estudios publicados en estos temas sobre pterinas y otras moléculas orgánicas, han sido realizados en soluciones reguladoras de aniones fosfato.

Debido a estas consideraciones, resultó interesante encarar un estudio sistemático acerca de la influencia que distintos aniones tienen sobre la fluorescencia de las pterinas. Evidentemente, son de particular interés aquellos aniones que pueden ser usados en distintos tipos de experimentos con pterinas; por ejemplo, aquellos presentes frecuentemente en eluentes de técnicas cromatográficas, aquellos usados para fijar la fuerza iónica o el pH, etc. En este capítulo se muestran los resultados de dicho estudio, realizado sobre cinco compuestos pterínicos: pterina, 6-formilpterina, 6-carboxipterina, biopterina y neopterina. El ácido fólico no pudo ser estudiado, debido a su extremadamente débil emisión. En una primer etapa se realizaron estudios de emisión total con el espectrofotómetro Cary 3, y en función de esos resultados preliminares, se llevó a cabo un estudio sistemático con la técnica de *Single Photon Counting*, en el cual se hicieron tanto medidas estacionarias como resueltas en el tiempo.

Estudios de emisión total de fluorescencia.

Como estudios preliminares se realizaron medidas de emisión total de fluorescencia de pterinas en ausencia y presencia de aniones para determinar cuáles aniones producen *quenching* de fluorescencia en estos compuestos. Por otra parte, con este primer estudio, se evaluó si el fenómeno observado es un comportamiento general de toda la familia de las pterinas, o si sólo algunas de ellas lo sufren. Para obtener respuestas generales y fijar condiciones experimentales se plantearon experimentos sencillos, que permitieran un primer análisis del fenómeno, midiendo emisión total fluorescente en un espectrofotómetro Cary 3 de Varian (descripto en el *Capítulo 5*). Se excitaron las pterinas con luz UV-A de 340 nm y se registró toda la emisión fluorescente entre 200 y 700 nm. Se tomaron espectros de absorción antes y después

de las mediciones de fluorescencia para controlar cambios fotoquímicos no deseados durante la irradiación. No se observó, en ningún caso, cambio alguno en los espectros de absorción, lo que implica que no ocurrieron cambios fotoquímicos apreciables en estos experimentos.

Se prepararon soluciones de pterinas de concentración 5 x 10^{-5} M en ausencia de aniones y soluciones de igual concentración de pterina y concentraciones relativamente altas de los aniones investigados (20 a 100 mM). Se comparó la emisión total de las correspondientes soluciones con y sin aniones. En los casos en los que se observó disminución de la fluorescencia en presencia de determinado anión, se realizaron medidas a distintas concentraciones de dicho anión. Las pterinas utilizadas en estos experimentos fueron: *pterina, 6-carboxipterina* y *6-formilpterina*. Los aniones ensayados fueron: *acetato* (20 mM), *sulfato* (50 mM), *cloruro* (50mM), *nitrato* (50 mM) y *fosfato* (50mM). Además, para cada compuesto se realizaron series de experimentos en dos condiciones de pH: una en el rango comprendido entre 6.0 y 6.5 (con predominio de la forma ácida de las pterinas) y otra a pH cercanos a 10.0 (con predominio de la forma alcalina).

Se observó que los aniones fosfato y acetato provocan una importante reducción de la emisión fluorescente de las pterinas en su forma ácida, mientras que los aniones cloruros, sulfatos y nitratos no producen una disminución apreciable de la misma. Por otro lado, a pH cercano a 10 ninguno de los aniones evaluados producen *quenching* de fluorescencia apreciable. Estos primeros resultados se presentan en la Tabla 10.1 donde se informa si se observó o no *quenching* para cada pterina, en su forma ácida, con el correspondiente anión.

Como control se realizaron experimentos a valores de pH mayores que 11, en los cuales se observó una fuerte disminución de la emisión fluorescente en ausencia de aniones, lo cual es coincidente con los resultados hallados con la técnica de *Single Photon Counting* mostrados anteriormente (*Capítulo 9*).

En la Figura 10.1 se muestra el efecto de la concentración de fosfato en la variación de la emisión fluorescente de soluciones, ácidas y alcalinas, de pterina, 6-

carboxipterina y 6-formilpterina. Puede observarse que el *quenching* en soluciones alcalinas es leve o despreciable, pero que es importante en las ácidas. En la Figura 10.2 puede observarse que en todos los casos analizados la dependencia de la emisión de las formas ácidas con la concentración de fosfato corresponde a un comportamiento de Stern-Volmer. Sin embargo, no se calcularon las correspondientes constantes de Stern-Volmer (K_{SV}) por considerarse que el método empleado para cuantificar la emisión presenta un error muy grande.

compuesto	fosfato	acetato	sulfato	cloruro	nitrato
pterina	sí	sí	no	no	no
6-carboxipterina	sí	sí	no	no	no
6-formilpterina	sí	sí	no	no	no

Tabla 10.1: Presencia de *quenching* de fluorescencia de pterinas con diferente aniones a pH entre 6.0 y 6.5.

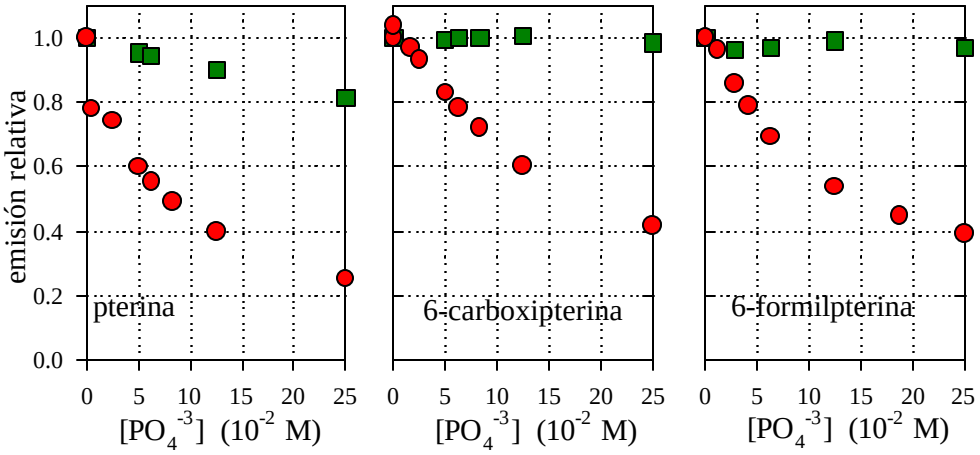


Figura 10.1: Emisión de fluorescencia de soluciones 5 x 10^{-5} M de pterina, 6-carboxipterina y 6-formilpterina a pH 6.3 (●) y pH 10.0 (■) en presencia de aniones fosfato.

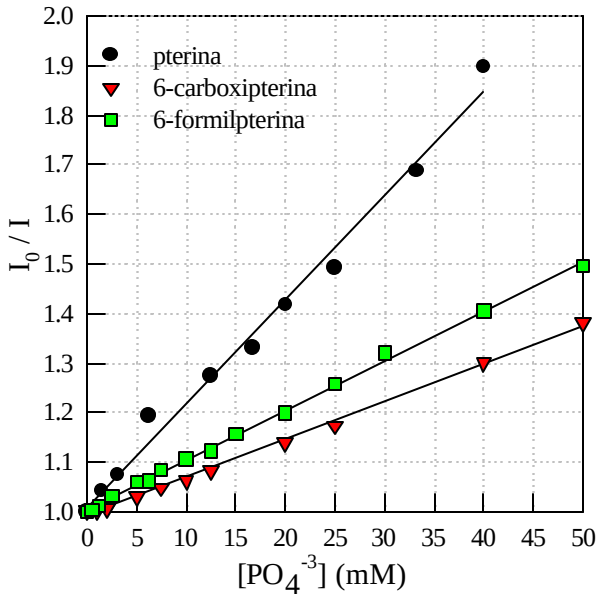


Figura 10.2: Representación de Stern-Volmer para la emisión de fluorescencia de soluciones ácidas de pterinas (5 x 10^{-5} M) en presencia de aniones fosfato.

Análogamente, la Figura 10.3 muestra cómo los aniones acetato producen una disminución de la emisión de fluorescencia de las tres pterinas estudiadas. Se aprecia la misma particularidad que se observó para los aniones fosfato: el *quenching* de fluorescencia es importante en medio ácido, pero no se produce en medio alcalino.

También puede apreciarse en la Figura 10.4 que en todos los casos analizados la dependencia de la emisión de las formas ácidas con la concentración de acetato corresponde a un comportamiento de Stern-Volmer.

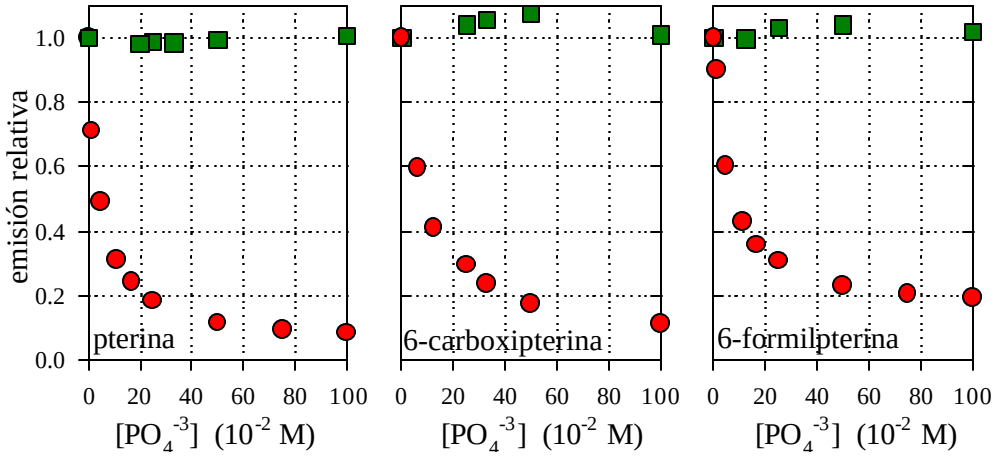


Figura 10.3: Emisión de fluorescencia de soluciones 5 x 10^{-5} M de pterina, 6-carboxipterina y 6-formilpterina a pH 6.3 (●) y pH 10.0 (■) en presencia de aniones acetato.

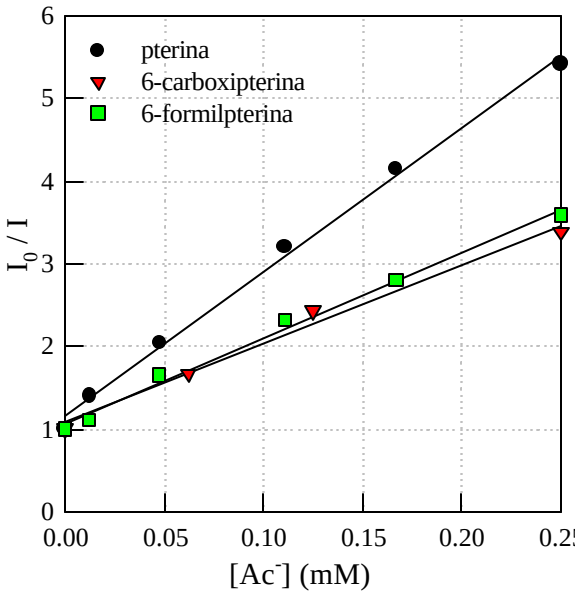


Figura 10.4: Representación de Stern-Volmer para la emisión de fluorescencia de soluciones ácidas de pterinas (5 x 10^{-5} M) en presencia de aniones acetato. Estudio en estado estacionario por *Single Photon Counting*.

Se estudió la variación de los espectros de emisión de las cinco pterinas mencionadas en la introducción, con la concentración de aniones fosfato y acetato. En todos los casos se realizaron los experimentos en, al menos, dos condiciones de pH. Adicionalmente se realizaron experimentos en presencia de iones cloruros. Si bien experimentos previos mostraron que este anión no produce *quenching* de fluorescencia, es importante corroborar el resultado para descartar la existencia de algún efecto de la fuerza iónica sobre la emisión fluorescente. Por consiguiente, se realizaron experimentos de control con concentraciones de cloruros mayores que las empleadas en los experimentos previos.

Aniones fosfato

Para cada par de pterina y anión se tomaron los espectros de emisión a distintas concentraciones del anión, manteniendo constante la concentración de la pterina (2.5 x 10^{-5} M). Puede observarse claramente una disminución en la emisión fluorescente al aumentar la concentración del anión en soluciones ácidas, pero una leve (en al caso de pterina) o nula (para 6-carboxipterina) disminución en soluciones alcalinas (este efecto no se observó en los experimentos de emisión total con el espectrofotómetro Cary 3). A modo de ejemplo, en las Figuras 10.5 y 10.6 se muestran los resultados de estos experimentos para pterina y 6-carboxipterina, tanto en medio ácido como en medio alcalino.

En las Figuras 10.7 a 10.16 se muestran las gráficas de intensidad de fluorescencia (integral del espectro de emisión) en función de la concentración de aniones fosfato y las correspondientes gráficas de Stern-Volmer para pterina, 6-carboxipterina, 6-formilpterina, biopterina y neopterina, tanto para sus formas ácidas, como para las alcalinas. En todos los casos se observó un comportamiento similar. Pueden apreciarse relaciones de Stern-Volmer en todos los experimentos realizados

para las formas ácidas de las pterinas investigadas. Las correspondientes constantes de Stern-Volmer (K_{SV}) se listan en la Tabla 10.2.

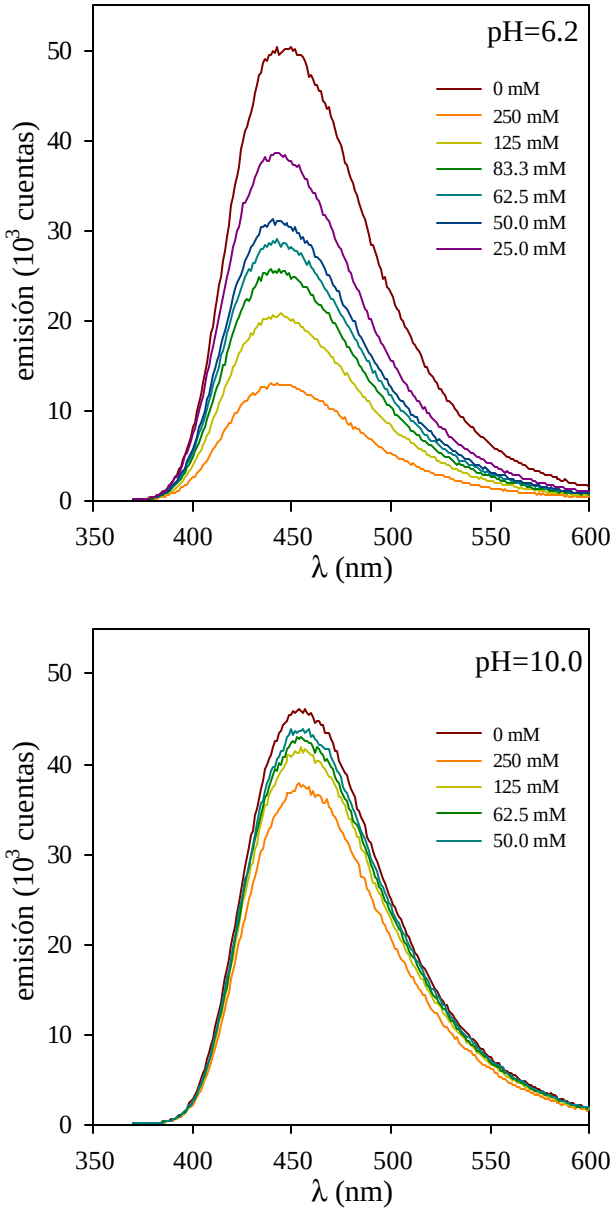
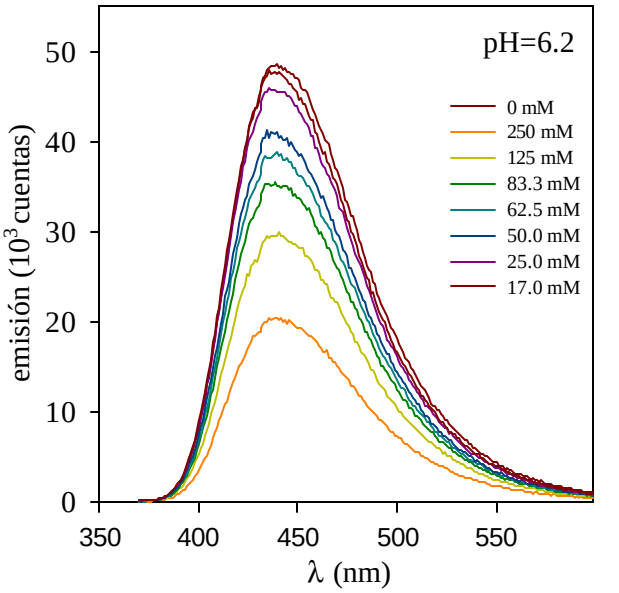


Figura 10.5: Espectros de emisión de fluorescencia de soluciones ácidas y alcalinas de pterina (2.5 x 10^{-5} M) en presencia de aniones fosfato.



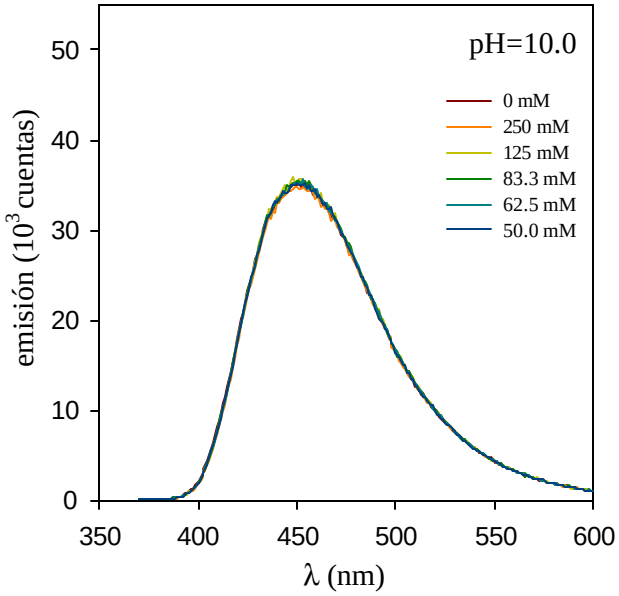


Figura 10.6: Espectros de emisión de fluorescencia de soluciones ácidas y alcalinas de 6-carboxipterina (2.5 x 10^{-5} M) en presencia de aniones fosfato.

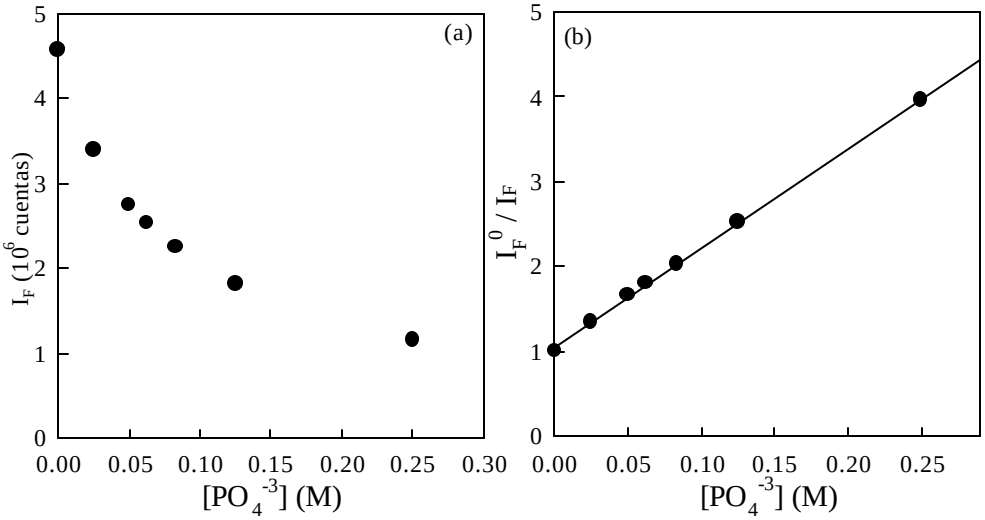


Figura 10.7: (a) Variación de la intensidad de fluorescencia de una solución de pterina (2.5 x 10^{-5} M) de pH 6.2 en función de la concentración de aniones fosfato. (b) Gráfica de Stern-Volmer.

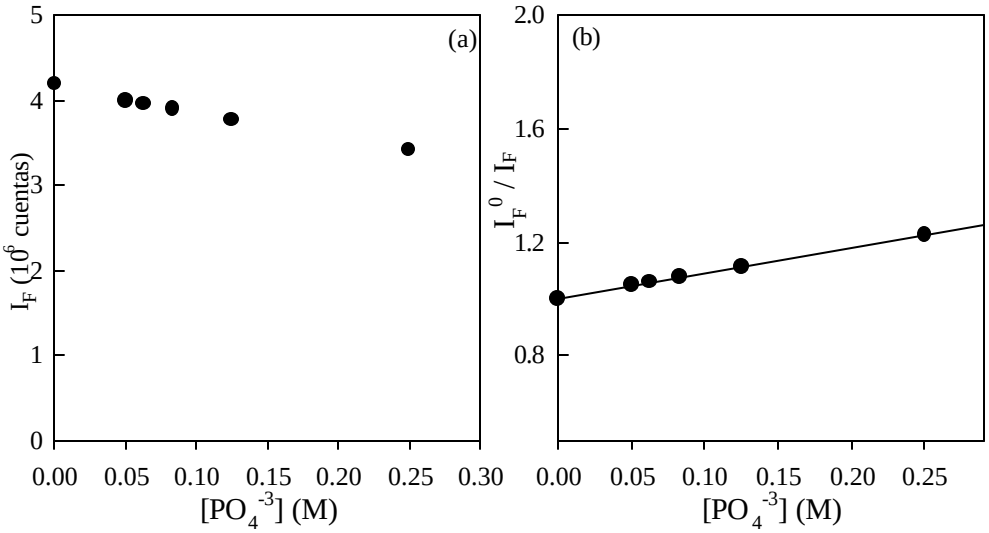


Figura 10.8: (a) Variación de la intensidad de fluorescencia de una solución de pterina (2.5 x 10^{-5} M) de pH 10.0 en función de la concentración de aniones fosfato. (b) Gráfica de Stern-Volmer.

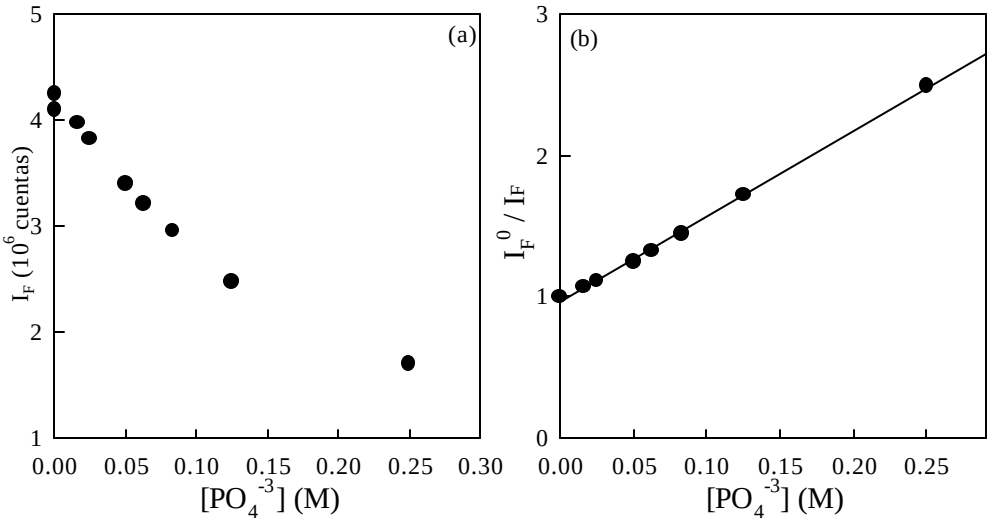


Figura 10.9: (a) Variación de la intensidad de fluorescencia de una solución de 6-carboxipterina (2.5 x 10^{-5} M) de pH 6.2 en función de la concentración de aniones fosfato. (b) Gráfica de Stern-Volmer.

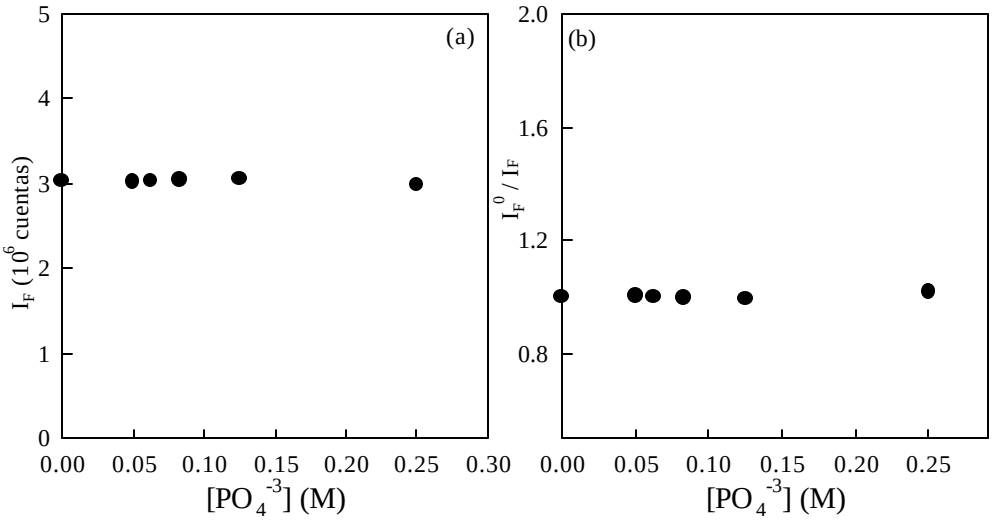


Figura 10.10: (a) Variación de la intensidad de fluorescencia de una solución de 6-carboxipterina (2.5 x 10^{-5} M) de pH 10.0 en función de la concentración de aniones fosfato. (b) Gráfica de Stern-Volmer.

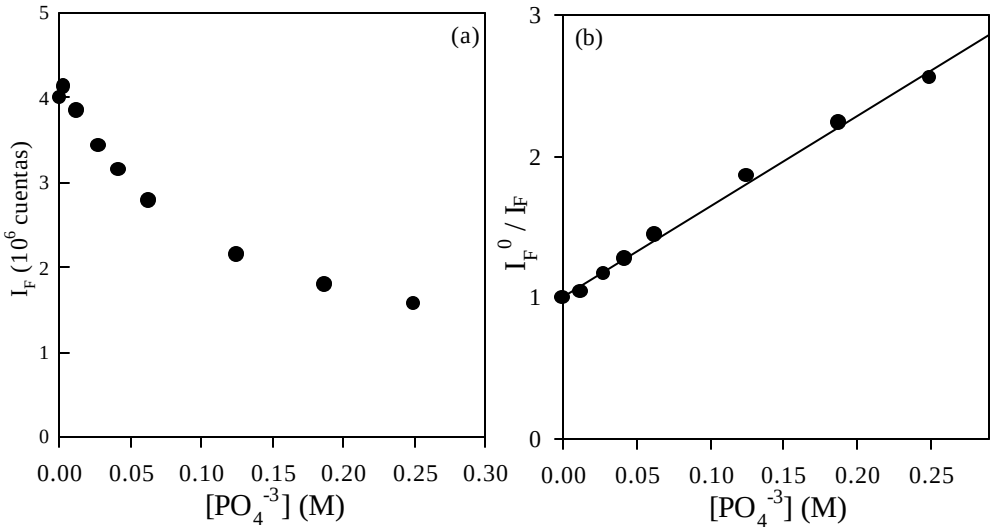


Figura 10.11: (a) Variación de la intensidad de fluorescencia de una solución de 6-formilpterina (2.5 x 10^{-5} M) de pH 6.2 en función de la concentración de aniones fosfato. (b) Gráfica de Stern-Volmer.

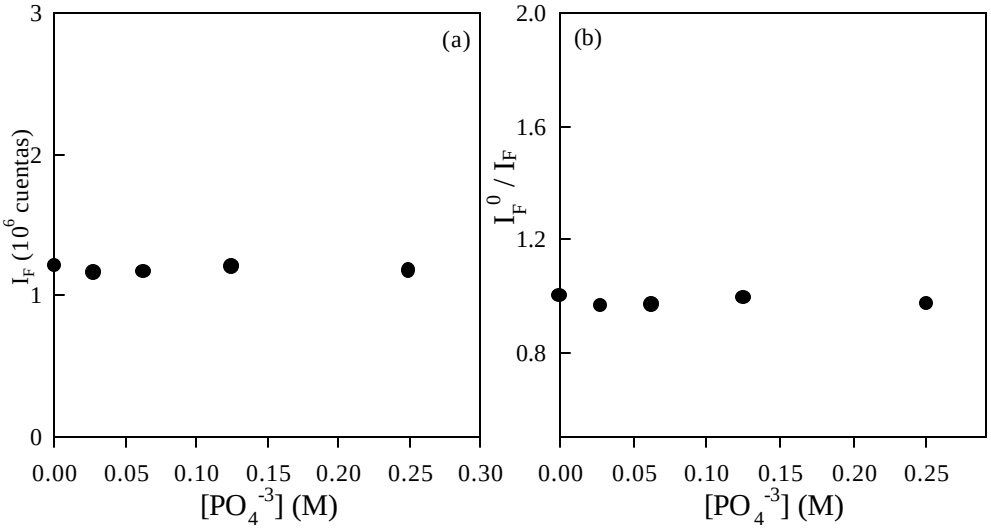


Figura 10.12: (a) Variación de la intensidad de fluorescencia de una solución de 6-formilpterina (2.5 x 10^{-5} M) de pH 10.0 en función de la concentración de aniones fosfato. (b) Gráfica de Stern-Volmer.

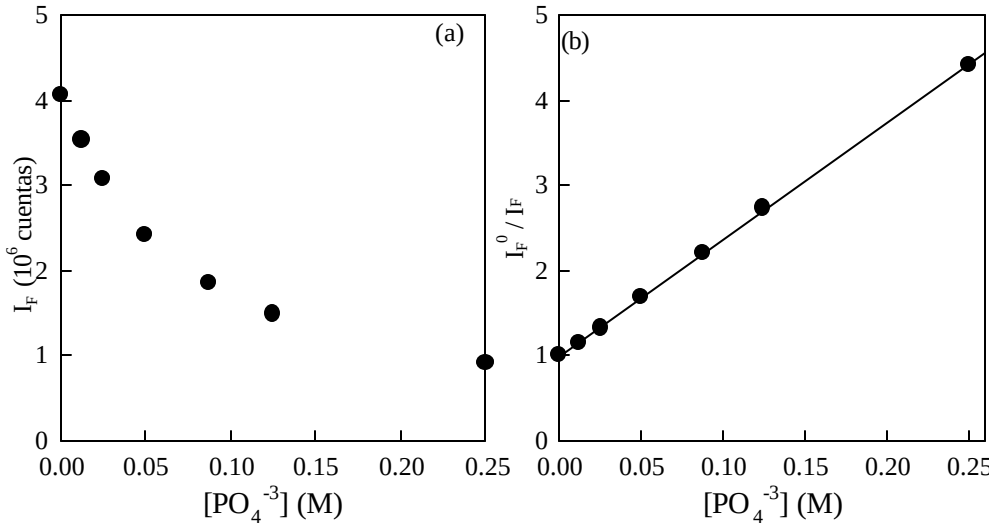


Figura 10.13: (a) Variación de la intensidad de fluorescencia de una solución de biopterina (2.5 x 10^{-5} M) de pH 6.2 en función de la concentración de aniones fosfato. (b) Gráfica de Stern-Volmer.

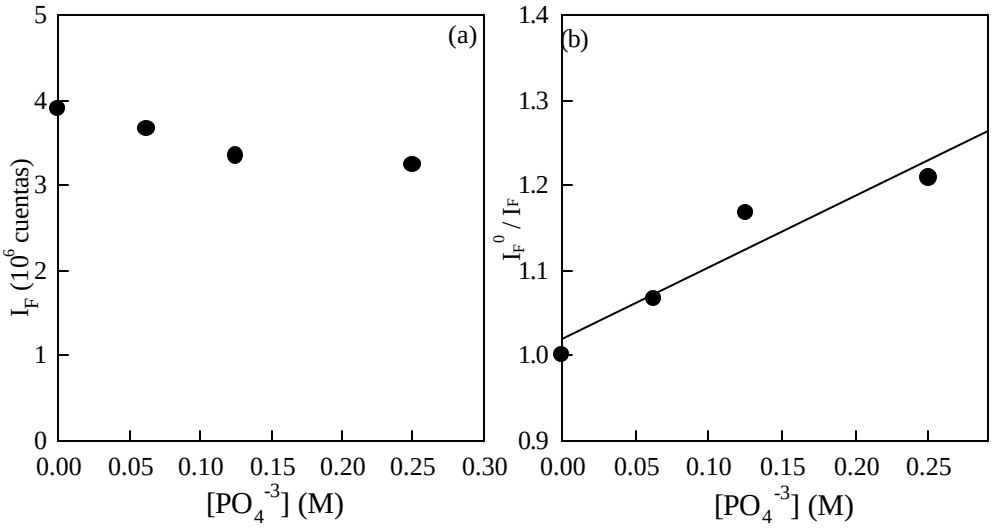


Figura 10.14: (a) Variación de la intensidad de fluorescencia de una solución de biopterina (2.5 x 10^{-5} M) de pH 10.0 en función de la concentración de aniones fosfato. (b) Gráfica de Stern-Volmer.

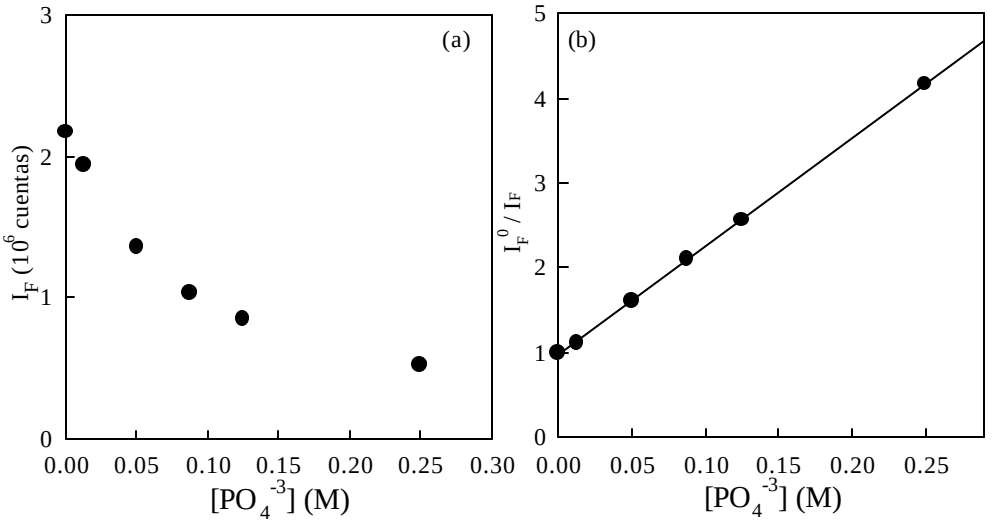


Figura 10.15: (a) Variación de la intensidad de fluorescencia de una solución de neopterina (2.5 x 10^{-5} M) de pH 6.2 en función de la concentración de aniones fosfato. (b) Gráfica de Stern-Volmer.

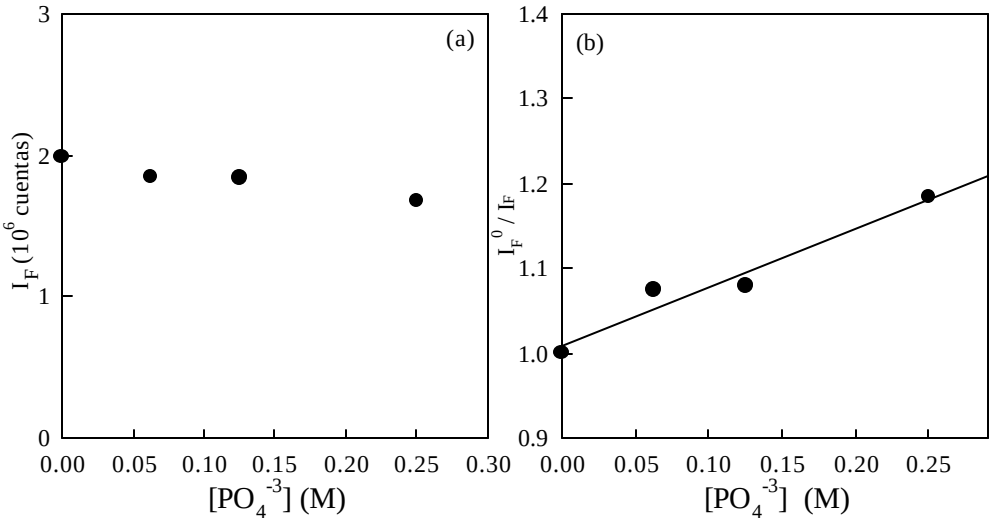


Figura 10.16: (a) Variación de la intensidad de fluorescencia de una solución de neopterina (2.5 x 10^{-5} M) de pH 10.0 en función de la concentración de aniones fosfato. (b) Gráfica de Stern-Volmer.

Compuesto	K_{SV} (M^{-1}) forma ácida	K_{SV} (M^{-1}) forma alcalina
pterina	11.7	0.9
6-carboxipterina	6.1	---
6-formilpterina	6.4	---
biopterina	13.7	0.8
neopterina	12.7	0.7

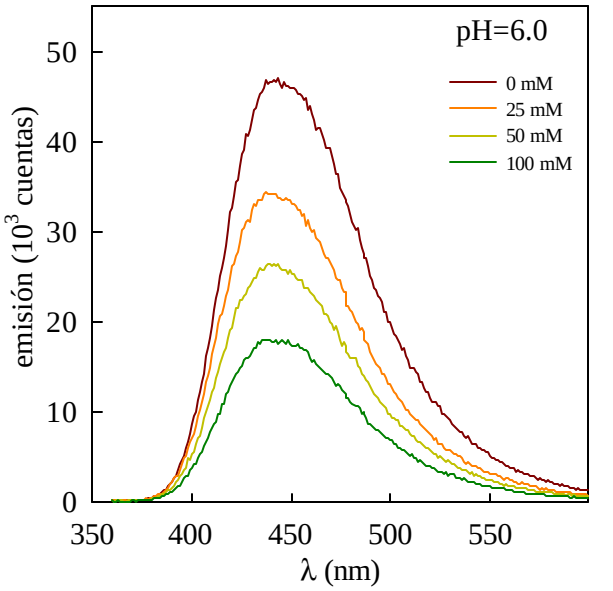
Tabla 10.2: Constantes de Stern-Volmer (K_{SV}) para el proceso de quenching de fluorescencia de pterinas por aniones fosfato, calculadas a partir de medidas estacionarias de emisión.

Aniones acetato

Un conjunto de experimentos similar al que se acaba de presentar se llevó a cabo con aniones acetato. Se tomaron los espectros de emisión de mezclas de las distintas pterinas con aniones acetato a pH 6.2 y 10.0. Análogamente, en soluciones ácidas se observó un fuerte *quenching* de la emisión fluorescente. En soluciones alcalinas este efecto es despreciable. En la Figura 10.17 se observan los espectros de emisión de una solución de pterina (2.5×10^{-5}) M, en sus formas ácida y alcalina, a diferentes concentraciones de aniones acetato. El mismo fenómeno se observa en todas las pterinas estudiadas. Las gráficas de intensidad de fluorescencia en función de la concentración de anión y los correspondientes análisis de Stern-Volmer se muestran en las Figuras 10.18 a 10.27.

En la tabla 10.3 se listan los valores de las constantes de Stern-Volmer (K_{SV}) obtenidas en estos experimentos. Puede apreciarse, en primer lugar, que todos los valores en medio ácido son del orden de los obtenidos en los experimentos con fosfato, pero ligeramente mayores. Otra observación que puede realizarse es que el orden de los valores obtenidos para los diferentes compuestos es el mismo para los dos aniones,

siendo la constante de Stern-Volmer de pterina la mayor, y la de 6-carboxipterina la menor. Por último, debe marcarse que para las formas alcalinas no pudo detectarse efecto de quenching en ninguna de las pterinas analizadas, aún habiéndose realizado medidas en soluciones con concentraciones de acetato cercanas a 1 M.



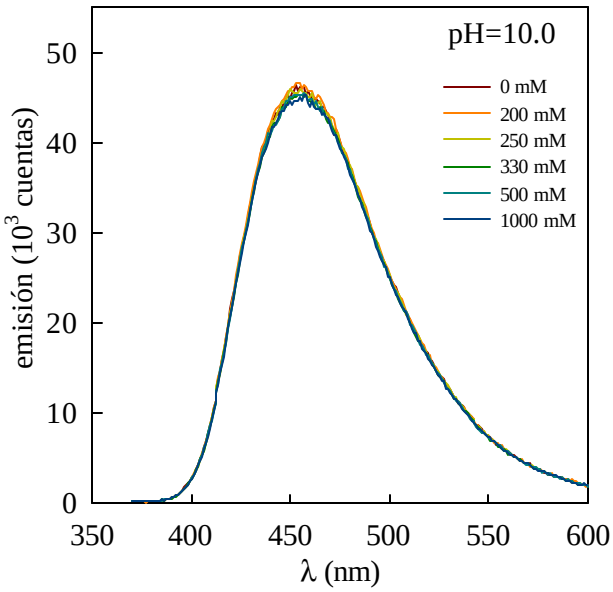


Figura 10.17: Espectros de emisión de fluorescencia de soluciones ácidas y alcalinas de pterina (2.5 x 10^{-5} M) en presencia de aniones acetato.

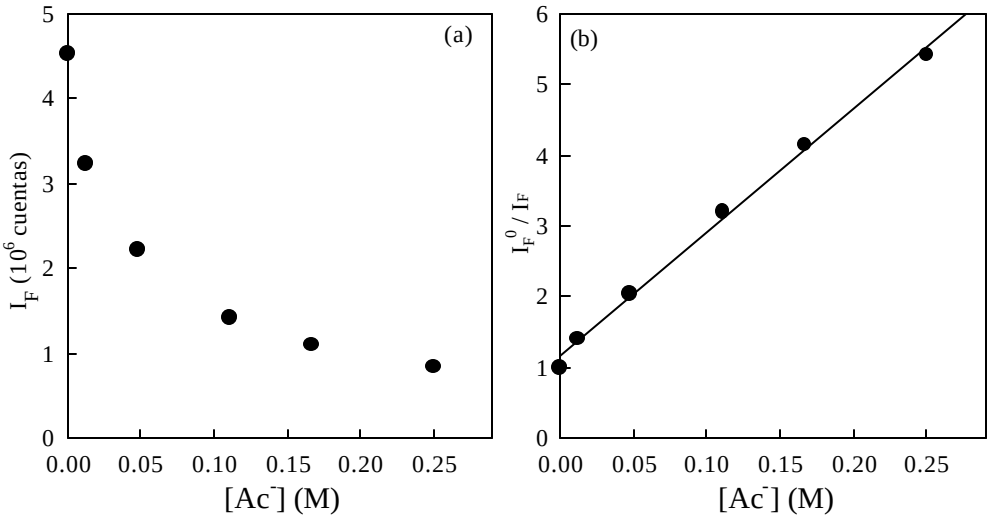


Figura 10.18 (a) Variación de la intensidad de fluorescencia de una solución de pterina (2.5 x 10^{-5} M) de pH 6.2 en función de la concentración de aniones acetato. (b) Gráfica de Stern-Volmer.

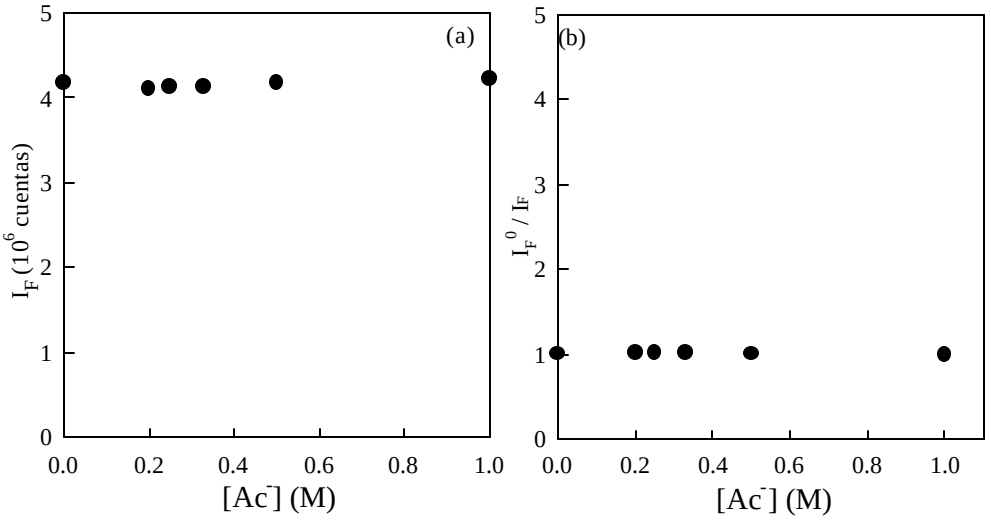


Figura 10.19: (a) Variación de la intensidad de fluorescencia de una solución de pterina (2.5 x 10^{-5} M) de pH 10.0 en función de la concentración de aniones acetato. (b) Gráfica de Stern-Volmer.

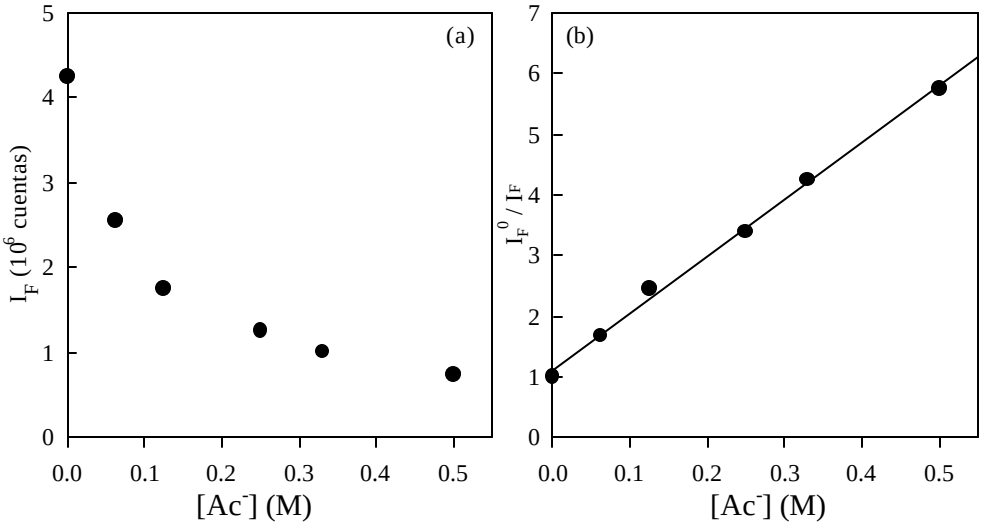


Figura 10.20: (a) Variación de la intensidad de fluorescencia de una solución de 6-carboxipterina (2.5 x 10^{-5} M) de pH 6.2 en función de la concentración de aniones acetato. (b) Gráfica de Stern-Volmer.

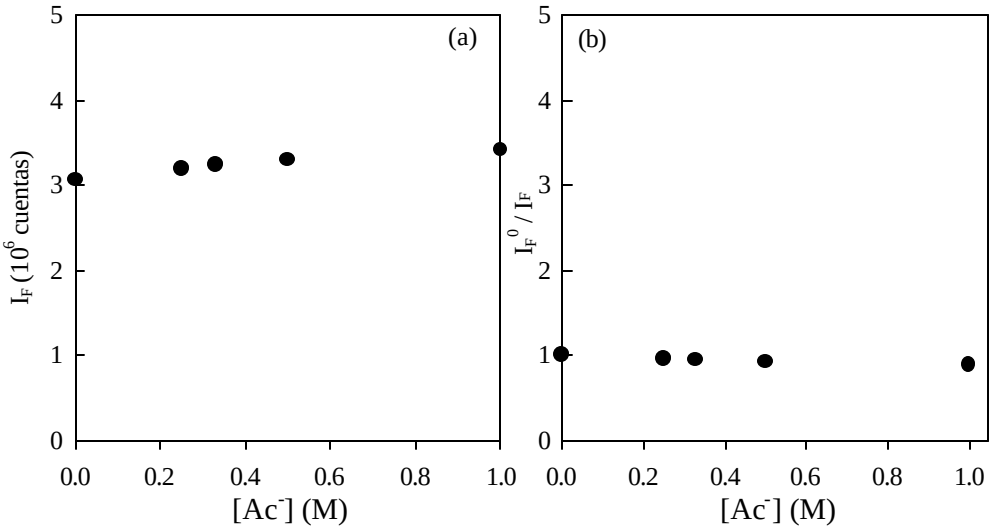


Figura 10.21: (a) Variación de la intensidad de fluorescencia de una solución de 6-carboxipterina (2.5 x 10^{-5} M) de pH 10.0 en función de la concentración de aniones acetato. (b) Gráfica de Stern-Volmer.

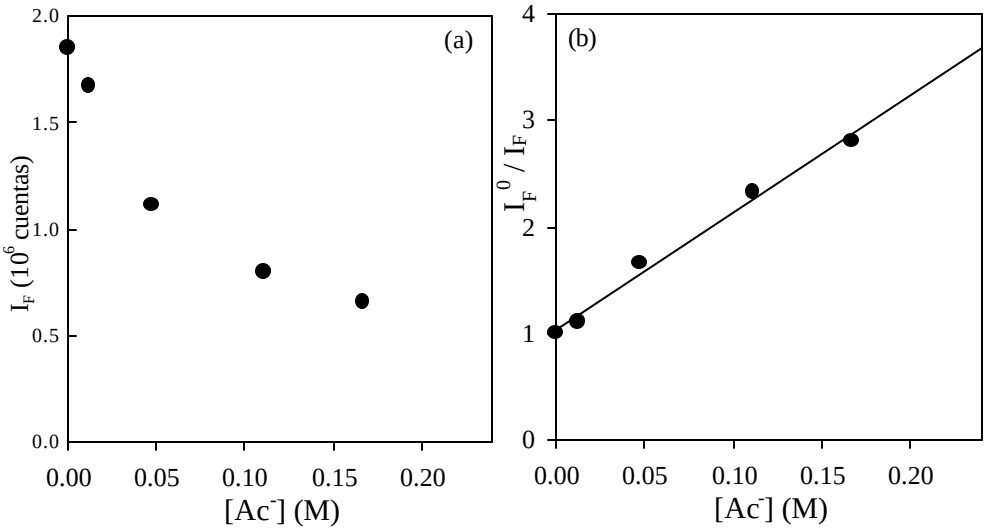


Figura 10.22: (a) Variación de la intensidad de fluorescencia de una solución de 6-formilpterina (2.5 x 10^{-5} M) de pH 6.2 en función de la concentración de aniones acetato. (b) Gráfica de Stern-Volmer.

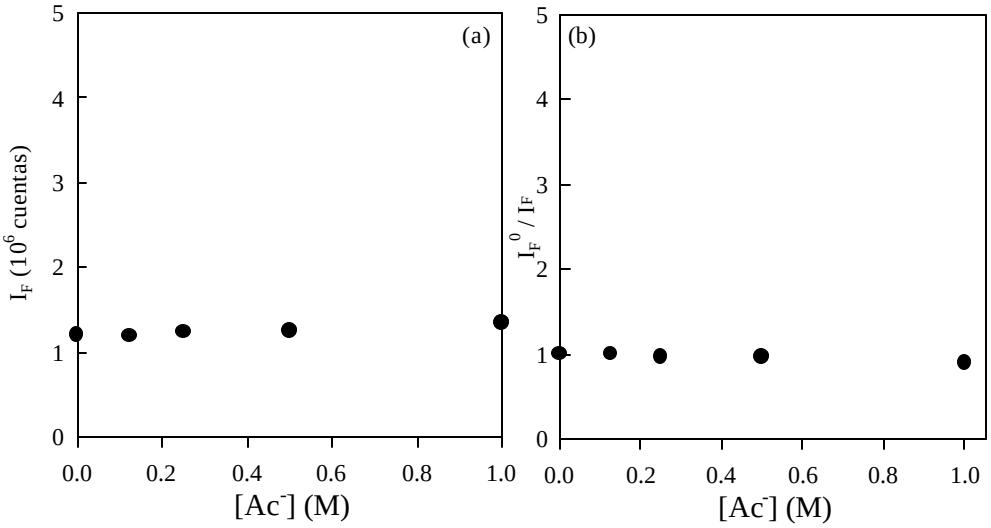


Figura 10.23: (a) Variación de la intensidad de fluorescencia de una solución de 6-formilpterina (2.5 x 10^{-5} M) de pH 10.0 en función de la concentración de aniones acetato. (b) Gráfica de Stern-Volmer.

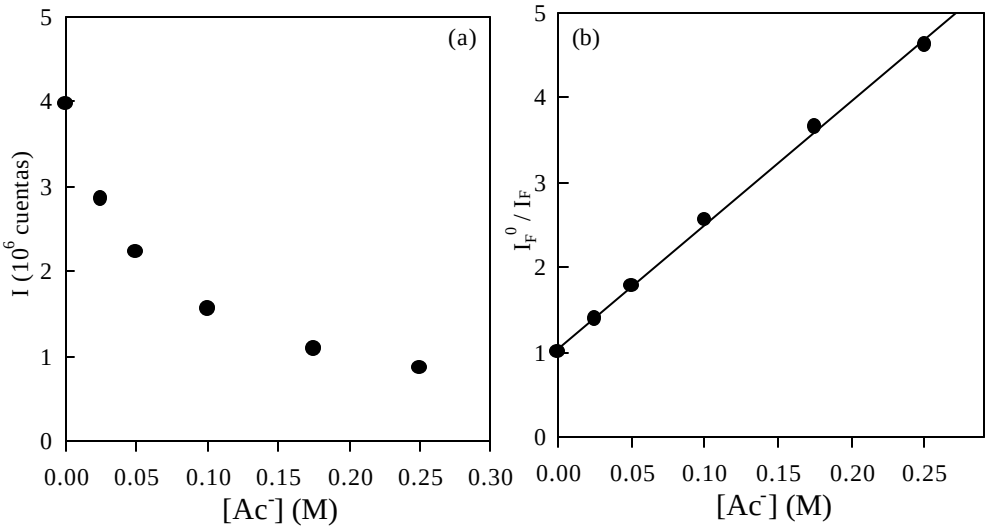


Figura 10.24: (a) Variación de la intensidad de fluorescencia de una solución de biopterina (2.5 x 10^{-5} M) de pH 6.2 en función de la concentración de aniones acetato. (b) Gráfica de Stern-Volmer.

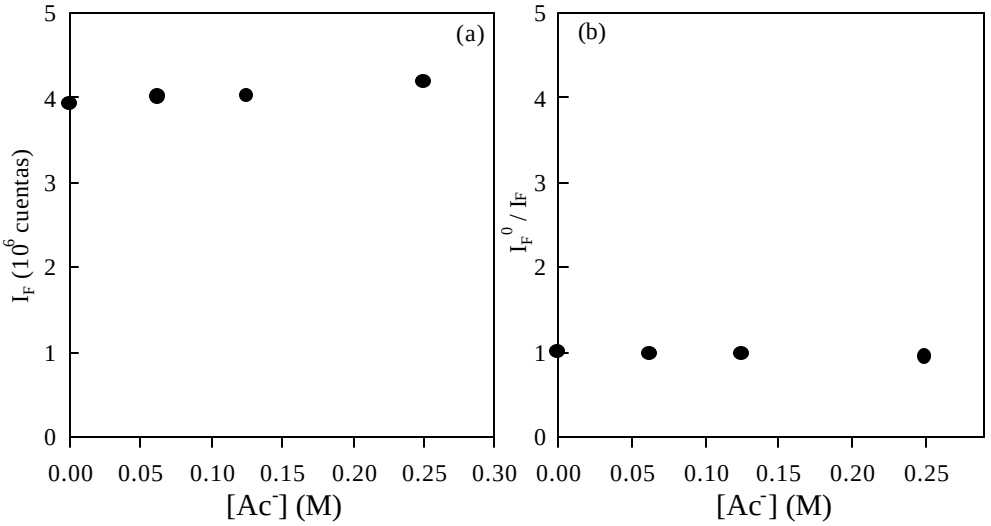


Figura 10.25: (a) Variación de la intensidad de fluorescencia de una solución de biopterina (2.5 x 10^{-5} M) de pH 10.0 en función de la concentración de aniones acetato. (b) Gráfica de Stern-Volmer.

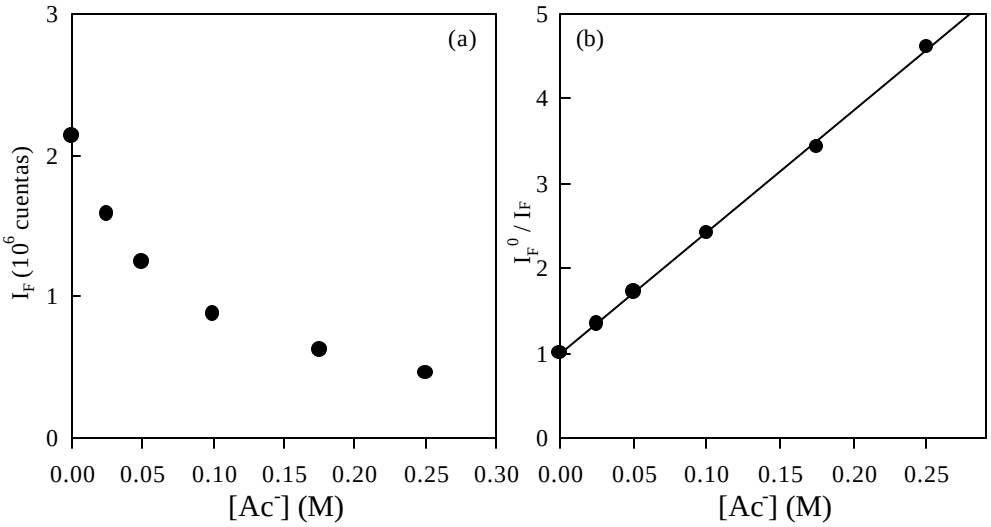


Figura 10.26: (a) Variación de la intensidad de fluorescencia de una solución de neopterina (2.5 x 10^{-5} M) de pH 6.2 en función de la concentración de aniones acetato. (b) Gráfica de Stern-Volmer.

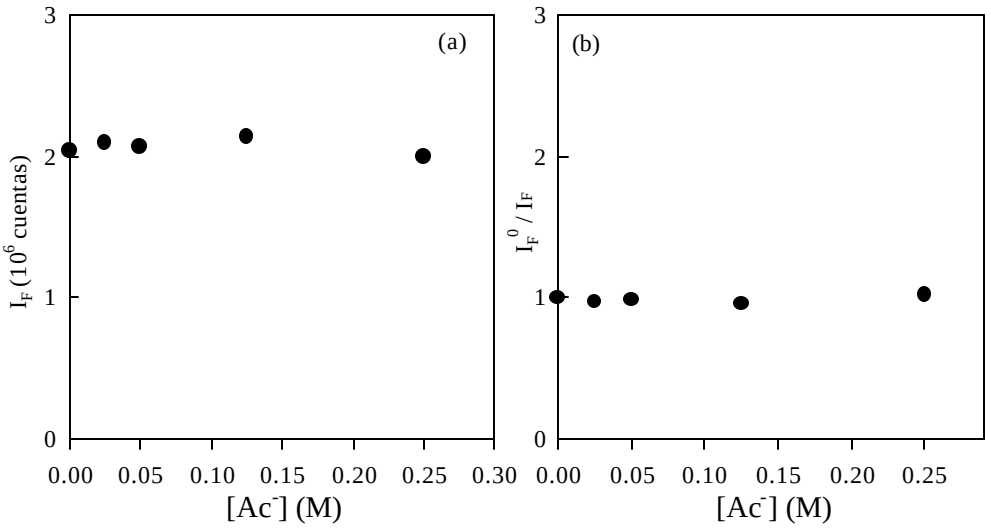


Figura 10.27: (a) Variación de la intensidad de fluorescencia de una solución de neopterina (2.5 x 10^{-5} M) de pH 10.0 en función de la concentración de aniones acetato. (b) Gráfica de Stern-Volmer.

Compuesto	**K_{SV} (M^{-1})** **forma ácida**	**K_{SV} (M^{-1})** **forma alcalina**
pterina	17.5	---
6-carboxipterina	9.4	---
6-formilpterina	11.0	---
biopterina	14.6	---
neopterina	14.3	---

Tabla 10.3: Constantes de Stern-Volmer (K_{SV}) para el proceso de quenching de fluorescencia de pterinas por aniones acetato, calculadas a partir de medidas estacionarias de emisión.

Aniones cloruros

Para evaluar el efecto de la fuerza iónica en la intensidad de fluorescencia de las pterinas se llevaron a cabo estudios similares a los descriptos para aniones acetato y fosfato, sobre soluciones conteniendo cada una de las cinco pterinas (2.5×10^{-5} M) y aniones cloruro. Se eligieron altas concentraciones de cloruros, hasta 500 mM. Para ninguna de las pterinas estudiadas se encontró un descenso apreciable de la emisión fluorescente, descartando de esta forma cualquier efecto de la fuerza iónica sobre la fluorescencia.

Estudio resuelto en el tiempo por *Single Photon Counting*.

Se realizaron experimentos resueltos en el tiempo para analizar la influencia de los aniones en los tiempos de vida de fluorescencia de las formas ácidas de las pterinas. Se prepararon las soluciones acuosas similares a las que se utilizaron en las medidas estacionarias de fluorescencia. Para cada solución se registró el decaimiento de la intensidad fluorescente en función del tiempo.

En todos los casos se observó una significativa disminución de los tiempos de vida de fluorescencia al aumentar la concentración de iones fosfatos. En la Figura 10.28 pueden apreciarse los decaimientos de la emisión fluorescente registrados en soluciones de biopterina (2.5×10^{-5} M) en presencia de aniones fosfato a pH 6.2. En este gráfico se muestran también los ajustes no lineales realizados suponiendo un comportamiento cinético de primer orden. Puede observarse claramente que al aumentar la concentración del anión, el proceso se acelera. En las gráficas 10.29 a 10.33 se puede observar las variaciones de los tiempos de vida con la concentración de fosfato y los correspondientes análisis de Stern-Volmer.

Figura 10.28: Variación de la emisión fluorescente en función del tiempo de una solución de biopterina (2.5 x 10^{-5} M) de pH 6.2. Trazas obtenidas a distintas concentraciones de aniones fosfato. Las líneas rojas representan los ajustes no lineales.

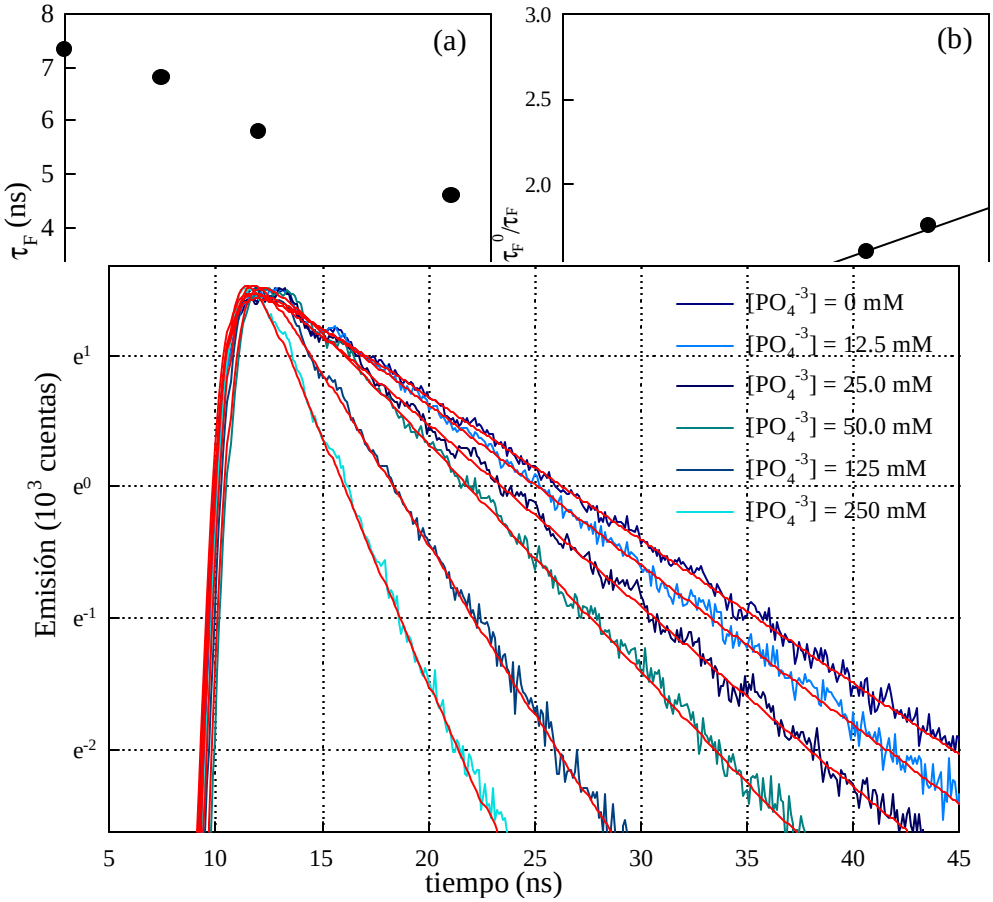


Figura 10.29: (a) Tiempos de vida de fluorescencia de una solución de pterina (2.5 x 10^{-5} M) en función de la concentración de aniones fosfato a pH 6.2. (b) Gráfica de Stern-Volmer.

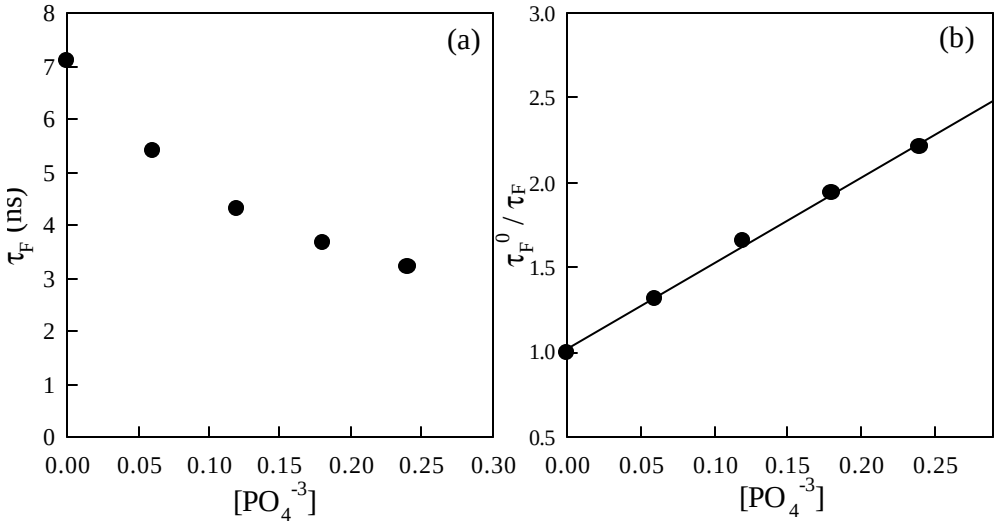


Figura 10.30: (a) Tiempos de vida de fluorescencia de una solución de 6-carboxipterina (2.5 x 10^{-5} M) en función de la concentración de aniones fosfato a pH 6.2. (b) Gráfica de Stern-Volmer.

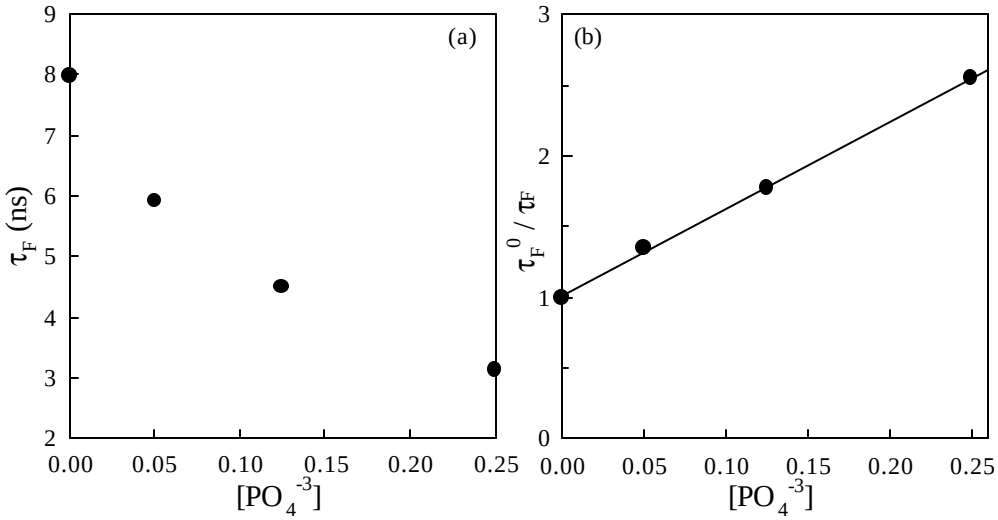


Figura 10.31: (a) Tiempos de vida de fluorescencia de una solución de 6-formilpterina (2.5 x 10^{-5} M) en función de la concentración de aniones fosfato a pH 6.2. (b) Gráfica de Stern-Volmer.

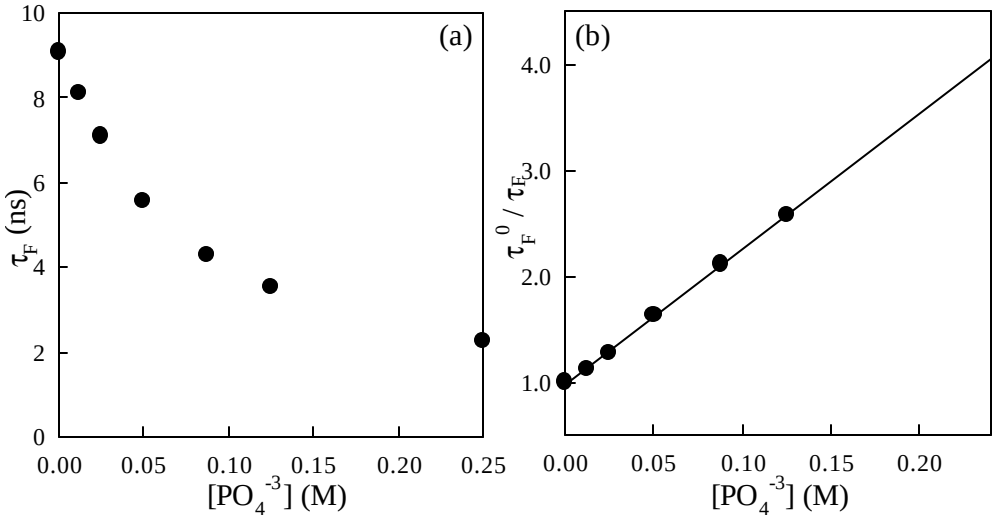


Figura 10.32: (a) Tiempos de vida de fluorescencia de una solución de biopterina (2.5 x 10^{-5} M) en función de la concentración de aniones fosfato a pH 6.2. (b) Gráfica de Stern-Volmer.

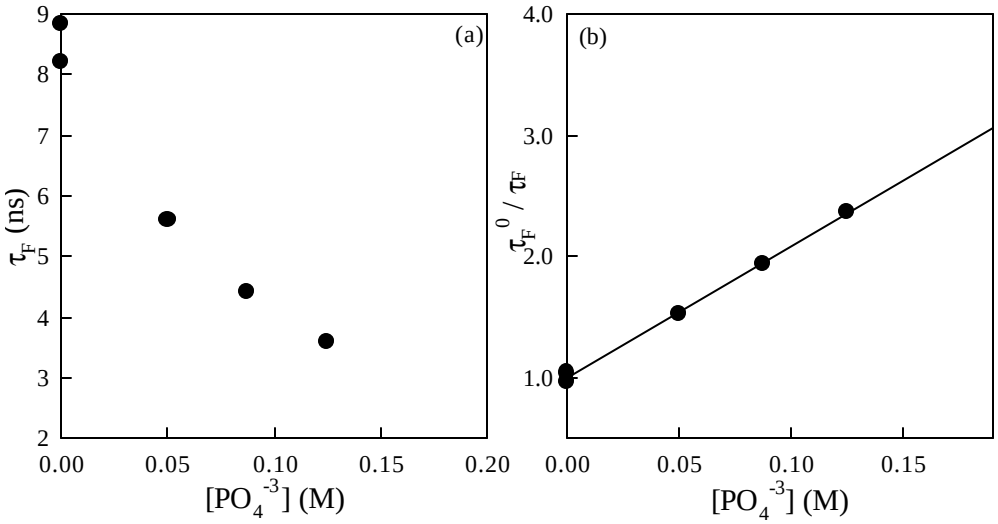


Figura 10.33: (a) Tiempos de vida de fluorescencia de una solución de neopterina (2.5 x 10^{-5} M) en función de la concentración de aniones fosfato a pH 6.2. (b) Gráfica de Stern-Volmer.

El mismo tipo de resultados se obtuvo en los experimentos realizados con acetato. A modo de ejemplo, en la Figura 10.34 se muestran las trazas obtenidas con soluciones de biopterina (2.5 x 10^{-5} M) y los correspondientes ajustes no lineales. Puede apreciarse claramente que los tiempos de vida de fluorescencia disminuyen al aumentar la concentración del ión acetato. En las Figuras 10.35 a 10.39 se muestra la dependencia de los tiempos de vida de fluorescencia de los cinco compuestos estudiados con la concentración del ión y las correspondientes gráficas de Stern-Volmer.

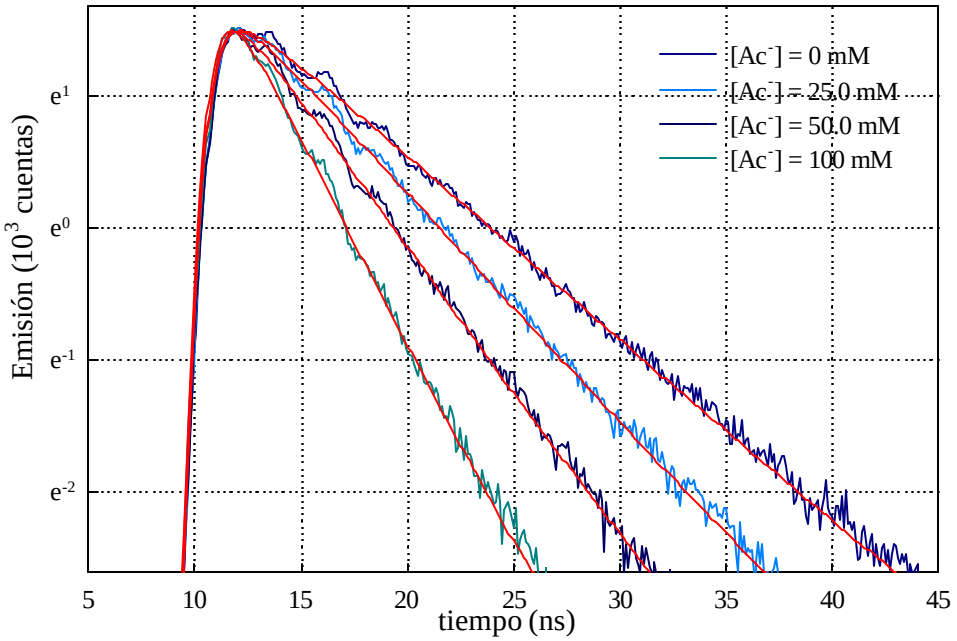


Figura 10.34: : Variación de la emisión fluorescente en función del tiempo de una solución de biopterina (2.5 x 10^{-5} M) de pH 6.2. Trazas obtenidas a distintas concentraciones de aniones acetato. Las líneas rojas representan los ajustes no lineales.

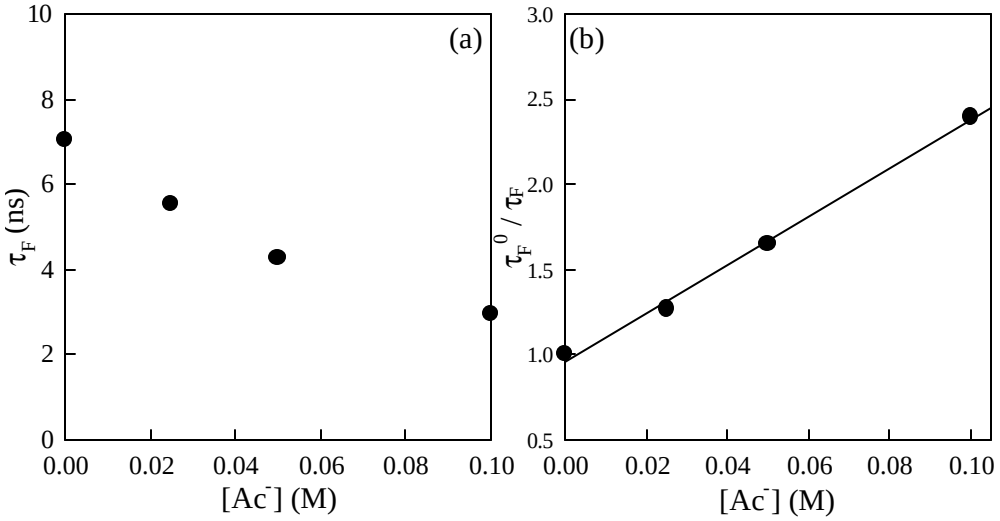


Figura 10.35: (a) Tiempos de vida de fluorescencia de una solución de pterina (2.5 x 10^{-5} M) en función de la concentración de aniones acetato a pH 6.2. (b) Gráfica de Stern-Volmer.

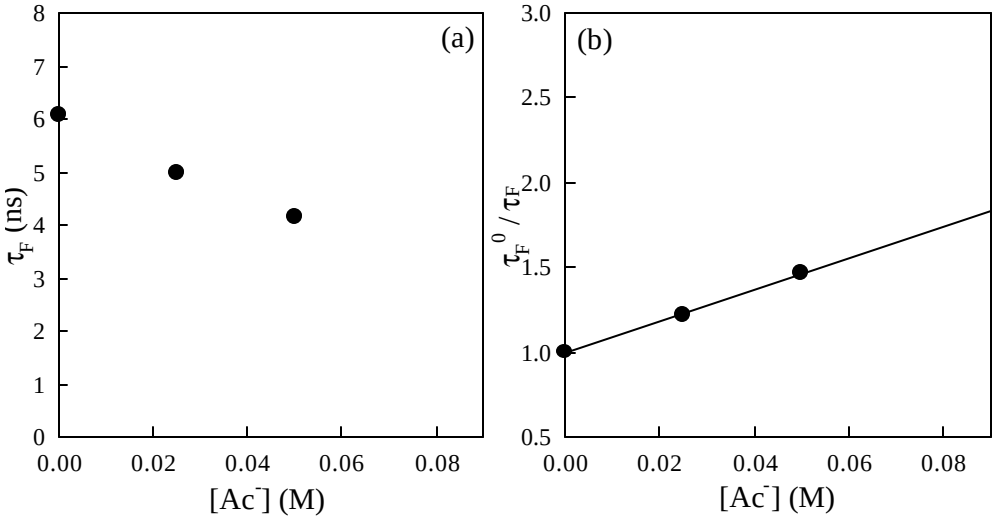


Figura 10.36: (a) Tiempos de vida de fluorescencia de una solución de 6-carboxipterina (2.5 x 10^{-5} M) en función de la concentración de aniones acetato a pH 6.2. (b) Gráfica de Stern-Volmer.

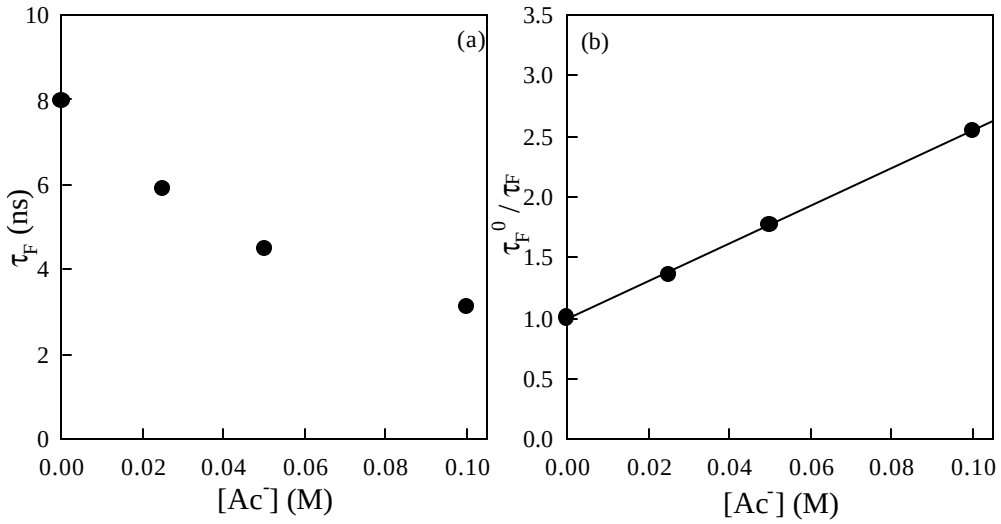


Figura 10.37: (a) Tiempos de vida de fluorescencia de una solución de 6-formilpterina (2.5 x 10^{-5} M) en función de la concentración de aniones acetato a pH 6.2. (b) Gráfica de Stern-Volmer.

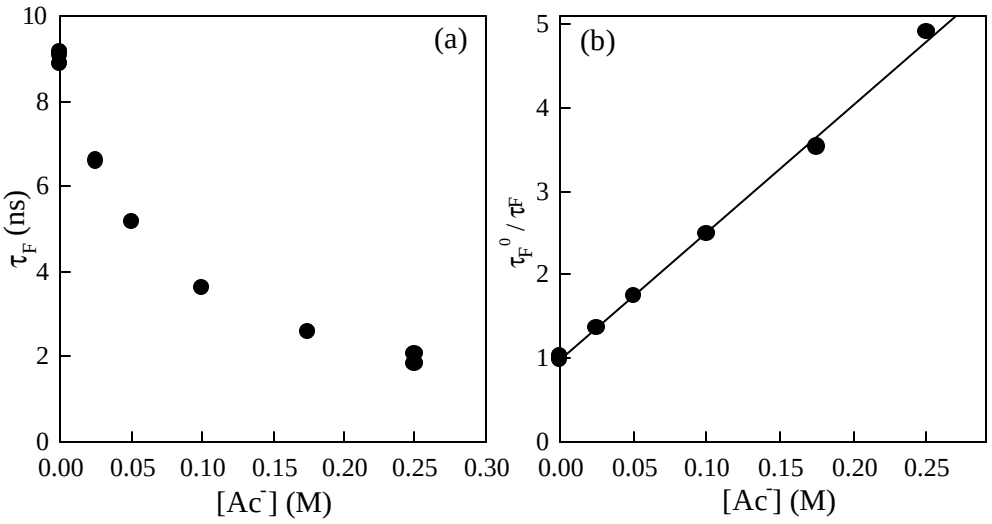


Figura 10.38: (a) Tiempos de vida de fluorescencia de una solución de biopterina (2.5 x 10^{-5} M) en función de la concentración de aniones acetato a pH 6.2. (b) Gráfica de Stern-Volmer.

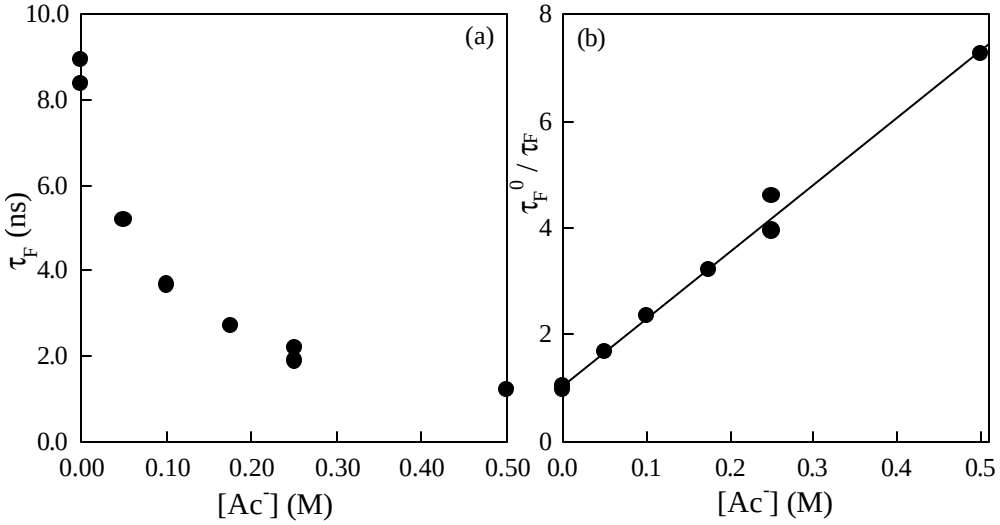


Figura 10.39: (a) Tiempos de vida de fluorescencia de una solución de neopterina (2.5 x 10^{-5} M) en función de la concentración de aniones acetato a pH 6.2. (b) Gráfica de Stern-Volmer.

Los valores de las constantes de Stern-Volmer (K_{SV}) obtenidas en los experimentos resueltos en el tiempo, tanto como para fosfato como para acetato, se listan en la Tabla 10.4. Puede apreciarse que estos valores son similares a los obtenidos en las medidas estacionarias (Tabla 10.2 y 10.3). Este hecho permite inferir, teniendo en cuenta las consideraciones teóricas expuestas en el *Capítulo 6*, que el proceso de quenching es de tipo dinámico.

Compuesto	**K_{SV} (M^{-1})** **Iones fosfato**	**K_{SV} (M^{-1})** **Iones acetato**
pterina	12.7	14.2
6-carboxipterina	5.1	9.3
6-formilpterina	6.1	12.8
biopterina	12.8	15.3

neopterina	10.9	12.5

Tabla 10.4: Constantes de Stern-Volmer (K_{SV}) para el proceso de quenching de fluorescencia de pterinas por aniones fosfato y acetato, calculadas a partir de medidas de emisión resueltas en el tiempo.

Cálculo de las constantes bimolecular de *quenching* de fluorescencia.

Como se expuso en el *Capítulo 6*, la constante de Stern-Volmer se relaciona con la constante bimolecular de *quenching* de fluorescencia de la siguiente forma:

$$K_{SV} = \tau_F^{0}\, k_q$$

Así el cálculo de la constante bimolecular de quenching de fluorescencia a partir de K_{SV} es posible si se conoce el tiempo de vida de fluorescencia del compuesto estudiado en ausencia del *quencher* (τ_F^{0}). Los tiempos de vida de fluorescencia de cada pterina fueron presentados en el *Capítulo 9*. En la Tabla 10.5 se listan las constantes bimolecular de *quenching* de fluorescencia calculadas para las formas ácidas de las cinco pterinas estudiadas, con aniones acetato y fosfato. Los valores de K_{SV} empleados para calcular estas constantes se obtuvieron promediando los valores obtenidos en los dos grupos de experimentos (medidas estacionarias y resueltas en el tiempo).

Compuesto	**anión**	k_q **(10^9 $M^{-1}s^{-1}$)**
pterina	fosfato	1.61
	acetato	2.09
6-carboxipterina	fosfato	1.93

	acetato	1.61
6-formilpterina	fosfato	0.79
	acetato	1.51
biopterina	fosfato	1.46
	acetato	1.64
neopterina	fosfato	1.33
	acetato	1.51

Tabla 10.5: Constantes bimolecular de *quenching* de fluorescencia de pterinas con aniones acetato y fosfato a pH 6.2.

De lo expuesto en el presente Capítulo se puede concluir que la fluorescencia exhibida por las formas ácidas de pterinas es fuertemente disminuida por aniones fosfato y acetato. Este *quenching* de fluorescencia observado es selectivo de algunos iones, ya que otros aniones, como sulfato, nitrato o cloruro, no lo producen.

El proceso de quenching estudiado tiene importancia analítica, ya que muchas técnicas utilizan la fluorescencia de las pterinas para su detección y cuantificación. Los solventes utilizados en dichas técnicas son, frecuentemente, *buffers* de fosfato. De acuerdo al pH elegido puede obtenerse mayor o menor sensibilidad en el método. Así, los iones fosfato y acetato en medio alcalino podrán usarse sin restricciones para detectar y cuantificar pterinas. Mientras que en medio ácido deberían tener en cuenta el proceso de quenching y realizarse las modificaciones necesarias para evitarlo.