

FLUORESCENCIA DE PTERINAS

De acuerdo a lo expuesto en el *Capítulo 2*, se conoce desde hace tiempo que las pterinas son sistemas fotoluminiscentes, es decir, que emiten luz al ser excitados con radiación electromagnética. Presentan en forma característica fluorescencia, dependiente del pH, con un máximo de emisión alrededor de los 450 nm y esta propiedad es utilizada con fines analíticos. Las pterinas no presentan emisión fosforescente detectable a temperatura ambiente, la cual puede, sin embargo, registrarse a muy bajas temperaturas (77 K) [Chahidi *et al.*, 1981].

Como ya se mencionó en el *Capítulo 2*, las pterinas tienen diferentes formas ácido-base. Debido a las diferencias en la estructura química de las diferentes pterinas cada una tiene propiedades ácido-base propias, pero todas ellas comparten un equilibrio ácido-base común, que involucra los mismos grupos funcionales, con un pKa cercano a 8. Dicho equilibrio se muestra en la Figura 9.1, pudiendo observarse que el grupo amida se transforma en fenolato al aumentar el pH. Las estructuras 1 y 2 de la Figura 9.1 se nombrarán como “*forma ácida*” y “*forma alcalina*”, respectivamente. En todas estas moléculas están presentes otros equilibrios ácido-base, que carecen de importancia en el rango de pH utilizado (4 - 13).

Estas formas ácido-base presentan características fotoquímicas diferentes, siendo imprescindible conocer qué forma está presente en las condiciones experimentales. Debido a esto, la mayor parte de los experimentos realizados en el presente trabajo de tesis se llevó a cabo en condiciones de pH donde se encuentre una única forma ácido-base, de forma tal que los datos obtenidos correspondan a una sola especie y no a una mezcla de diferentes formas.

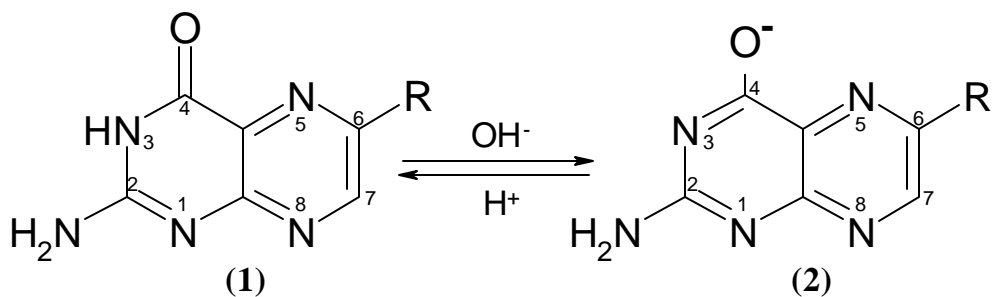


Figura 9.1: Equilibrio ácido-base de las pterinas. (1) forma ácida, (2) forma alcalina.

Espectros de absorción.

Cada estructura ácido-base tiene características espectroscópicas diferentes. Entonces es importante, en primer lugar, analizar en forma detallada los espectros de absorción de los compuestos en estudio. Los espectros de absorción de las dos formas ácido-base fueron obtenidos de dos alícuotas de una misma solución a dos valores diferentes de pH (5.5 y 10.5).

Pterina : En la Figura 9.2 se muestran los espectros de absorción de la forma ácida y de la forma alcalina. Puede observarse que la forma alcalina presenta la banda de absorción, entre 300 - 400 nm, desplazada hacia el visible, y la banda ubicada en la región entre 230 - 290 nm, desplazada hacia el ultravioleta. La forma alcalina presenta mayores coeficientes de absorción en ambas bandas que la correspondiente forma ácida.

6-carboxipterina: En la Figura 9.3 se muestran los espectros de la forma ácida y básica de la 6-carboxipterina. Las diferencias entre los espectros de ambas formas ácido-base son similares a las observadas en la pterina.

Al acidificar soluciones de 6-carboxipterina hasta un pH alrededor de 4 se observan cambios espectrales que indican la presencia de otro equilibrio ácido-base.

Este equilibrio puede ser atribuido al carboxilo de la posición 6, y tiene un pKa de 3.05 [Monópoli *et al.*, 2000]. Por este motivo se evitó realizar experimentos con soluciones de 6-carboxipterina a valores de pH menores a 4.5 previniendo de esta manera la presencia de una nueva forma ácido-base.

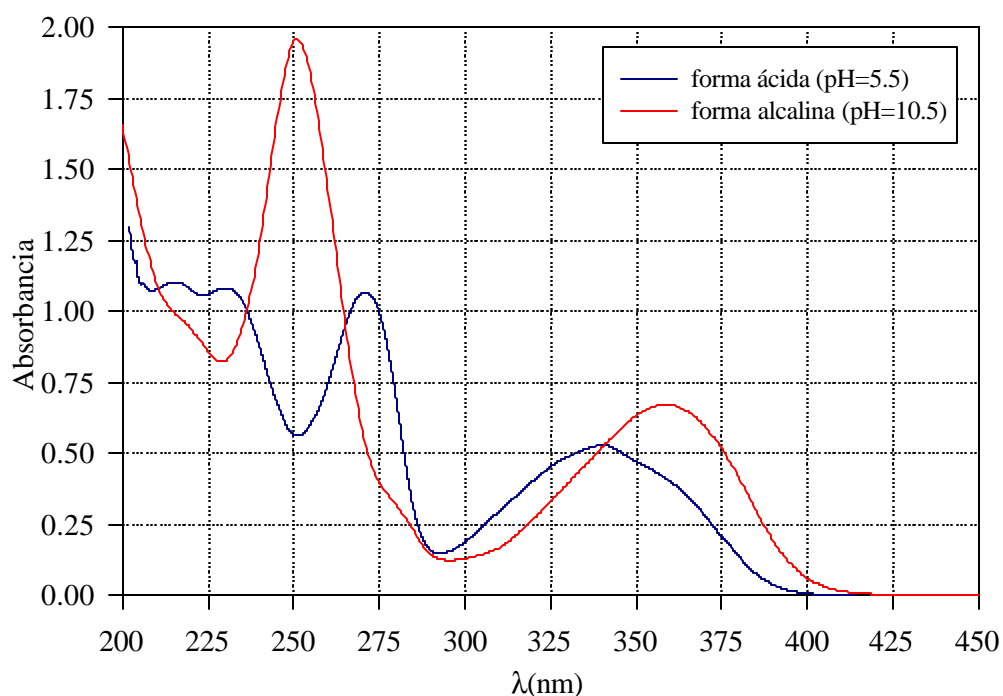


Figura 9.2: Espectros de absorción para una solución 1×10^{-4} M de pterina. Camino óptico de 1 cm.

6-formilpterina: En la Figura 9.4 pueden observarse los espectros correspondientes a las formas ácida y alcalina. Puede apreciarse que los espectros de este compuesto muestran significativas diferencias con los correspondientes espectros de pterina y 6-carboxipterina. No se encontró en literatura una explicación para este fenómeno.

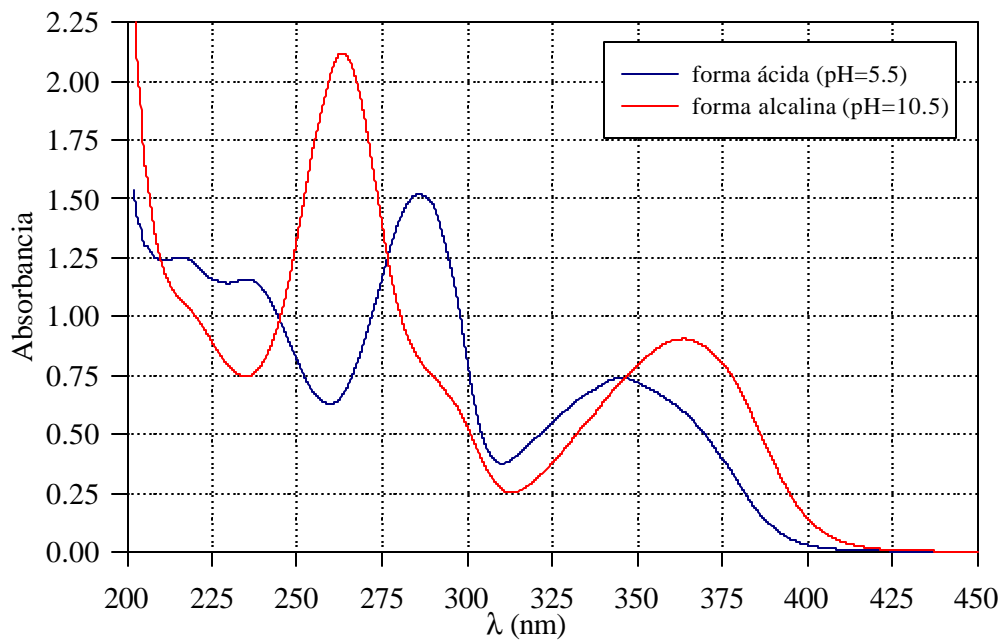


Figura 9.3: Espectros de absorción para una solución 1×10^{-4} M de carboxipterina. Camino óptico de 1 cm. 6-

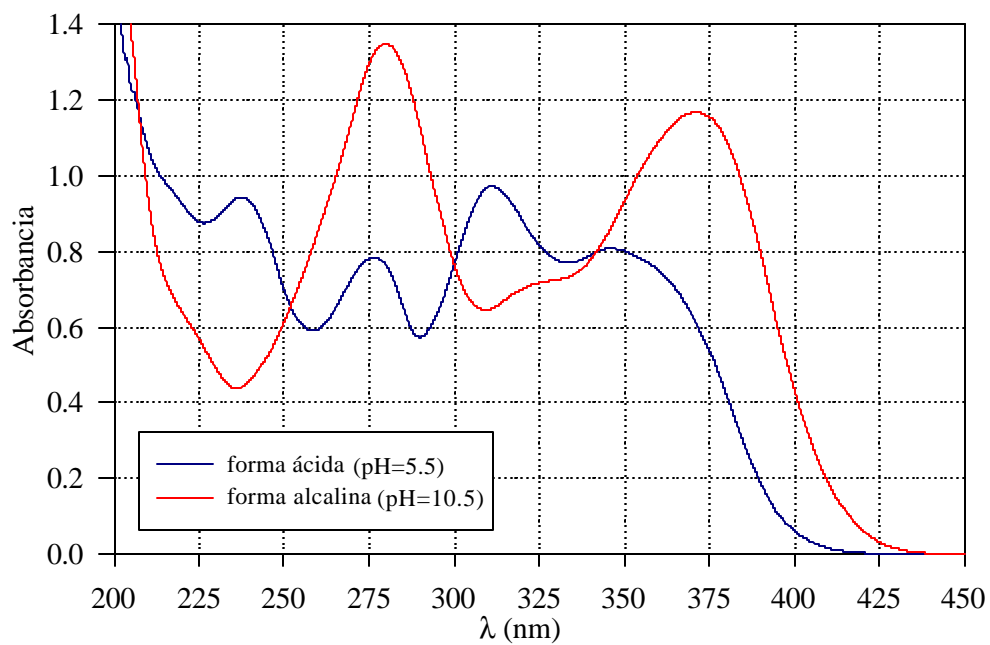


Figura 9.4: Espectros de absorción para una solución 9×10^{-5} M de 6-formilpterina. Camino óptico de 1 cm.

Ácido fólico: Como se mencionó anteriormente, este compuesto es una pterina conjugada, en la cual pueden reconocerse tres porciones: una porción pterínica, otra de ácido glutámico (un aminoácido) y otra de ácido *p*-aminobenzoico (*Capítulo 2*, Figura 2.4). Los espectros de las formas ácida y alcalina del ácido fólico se muestran en la Figura 9.5. La forma ácida del ácido fólico presenta carga neta -2 y la forma alcalina -3. Puede apreciarse que el espectro de la forma alcalina presenta tres bandas de absorción. Esta característica particular puede explicarse teniendo en cuenta al grupo bencénico sustituyente que presenta esta pterina. En efecto, la banda con el máximo en 255 nm es asignada al anillo pterínico, mientras que la banda con máximo en 285 nm puede ser asignada al residuo de ácido *p*-aminobenzoico. En la forma ácida pareciera desaparecer una banda. En realidad, si se asume que la banda de 255 nm sufre un corrimiento similar al observado para otras pterinas al pasar de la forma ácida a la alcalina y que, por el contrario, la banda de 285 nm no se altera, ambas bandas deberían superponerse. El escaso aumento de los coeficientes de absorción de las bandas superpuestas respecto a los correspondientes a ambas bandas presentes en la forma alcalina, puede explicarse considerando que, tal como se observa para otras pterinas, la banda de 255 nm debe sufrir una pérdida de intensidad al pasar a la forma ácida [Thiéry-Cailly, 1968].

La porción pterínica del ácido fólico presenta el mismo grupo ionizable que las pterinas anteriormente descritas. Pero la porción de ácido glutámico posee dos grupos ionizables más (cuyos pKa en el ácido glutámico libre son 2.19 y 4.25 [Lehninger, 1985]), que le confieren altísima solubilidad a pH ligeramente ácidas, neutras o alcalinas. Sin embargo, si se acidifica una solución de ácido fólico a un pH menor que 5.5 la solubilidad disminuye drásticamente, debido a la protonación de los carboxilos. Para todos los experimentos descritos en este Capítulo se eligió un rango de pH tal que estos grupos estén siempre ionizados [Thomas *et al.*, 1996].

Biopterina y Neopterina: Estos dos compuestos, muy parecidos estructuralmente, presentan espectros de absorción similares. Además las diferencias espectrales entre las correspondientes formas ácida y alcalina son del mismo tipo a las observadas para pterina (Figuras 9.6 y 9.7).

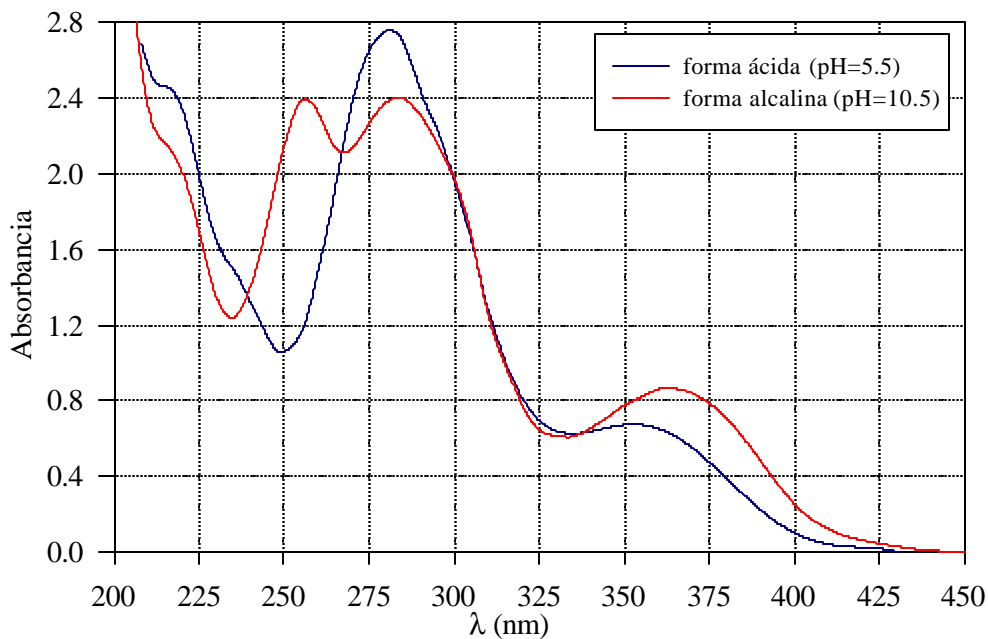


Figura 9.5: Espectros de absorción para una solución 1 x 10⁻⁴ M de ácido fólico. Camino óptico de 1 cm.

El análisis de los espectros de absorción de las seis pterinas permite realizar algunas generalizaciones: todas presentan dos bandas principales de absorción, una banda en el rango de longitudes de onda 220 a 290 nm con coeficientes de extinción molar altos entre 1 x 10⁴ y 2 x 10⁴ M⁻¹ cm⁻¹, y la otra, con un máximo cercano a los 350 nm, con menor coeficiente de extinción molar entre 5 x 10³ y 1 x 10⁴ M⁻¹ cm⁻¹. Estos espectros indican al menos dos estados electrónicos excitados. También podemos observar un corrimiento de la banda de mayor energía a menores longitudes de onda al pasar de la forma ácida a la alcalina, y el efecto contrario, corrimiento hacia

longitudes de onda mayores, de la banda de menor energía. Por último, las formas alcalinas tienen coeficientes de extinción mayores que las formas ácidas para ambas bandas.

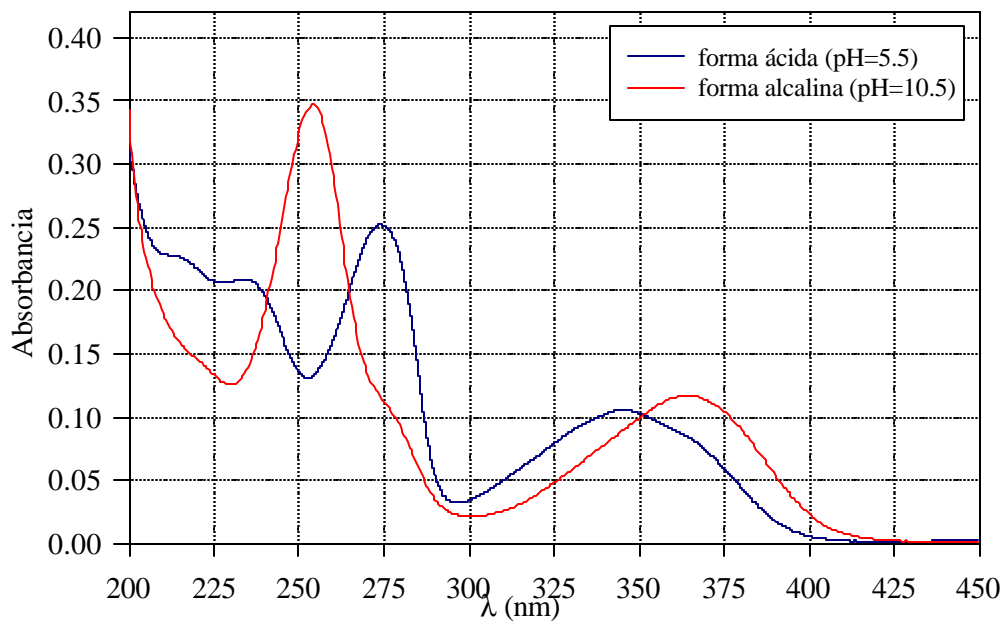


Figura 9.6: Espectros de absorción para una solución 1.7×10^{-5} M de biopterina.

Camino óptico de 1 cm.

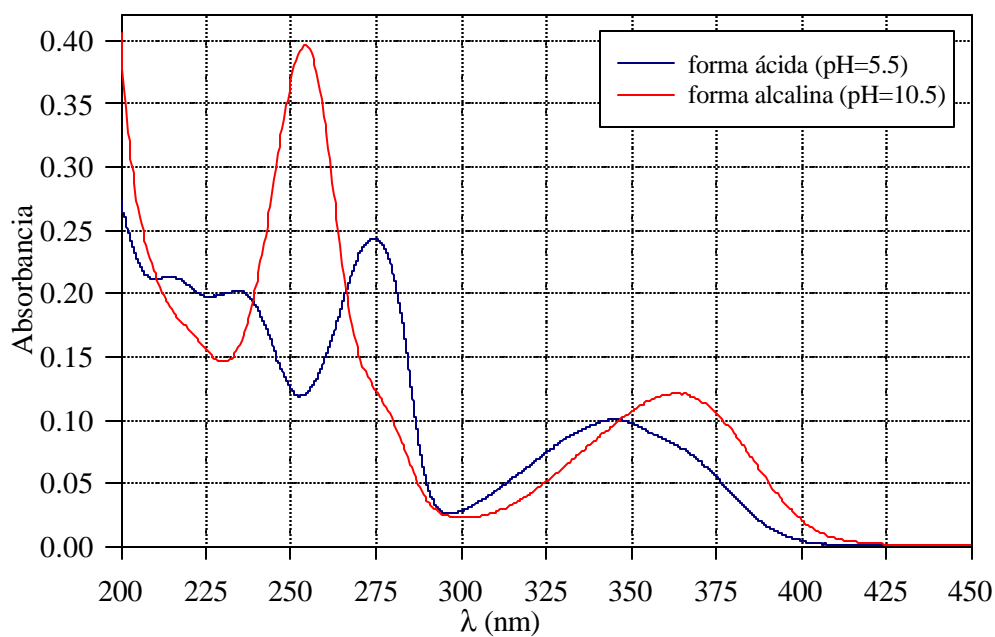


Figura 9.7: Espectros de absorción para una solución 1.7×10^{-5} M de neopterina. Camino óptico de 1 cm.

Espectros de emisión.

Las diferencias espectrales entre las formas ácido-base de las pterinas descritas anteriormente hacen suponer que la fluorescencia de estos compuestos es dependiente del pH. Debido a ello se tomaron los espectros de emisión de soluciones con formas ácidas y alcalinas de pterina, 6-carboxipterina, 6-formilpterina, ácido fólico, neopterina y biopterina, excitando a 350 nm y a diferentes valores de pH.

En la Figura 9.8 se muestran los espectros de emisión corregidos normalizados de los seis compuestos mencionados, en sus dos formas ácido-base (forma ácida a pH =5.5 y forma alcalina a pH = 10.5). En todos los casos puede observarse una banda con un máximo cercano a 450 nm, que explica la característica emisión de luz azul que se aprecia al irradiar soluciones acuosas de pterinas con luz UV-A. Puede observarse un claro corrimiento batocrómico de las bandas de emisión de las formas alcalinas respecto de las correspondientes a las formas ácidas. En la Tabla 9.1 se listan los valores de longitud de onda para cada máximo. También se observaron diferencias en las intensidades de emisión de las dos formas ácido-base estudiadas para cada compuesto, pero este punto será discutido más adelante, cuando se presenten los rendimientos cuánticos de fluorescencia. No obstante, debe mencionarse que el elevado ruido que se aprecia en los espectros de emisión del ácido fólico tiene su origen en una intensidad extremadamente baja en comparación con los demás compuestos estudiados.

Como se observó anteriormente en este Capítulo los espectros de absorción de las pterinas presentan más de una banda de absorción, dos bandas al menos. Esto indica que el estado basal de las pterinas pasa a más de un estado excitado, por

absorción de luz. Estos estados excitados pueden ser fluorescentes o no. Para investigar este punto se obtuvieron los espectros de emisión excitando a distintas longitudes de onda.

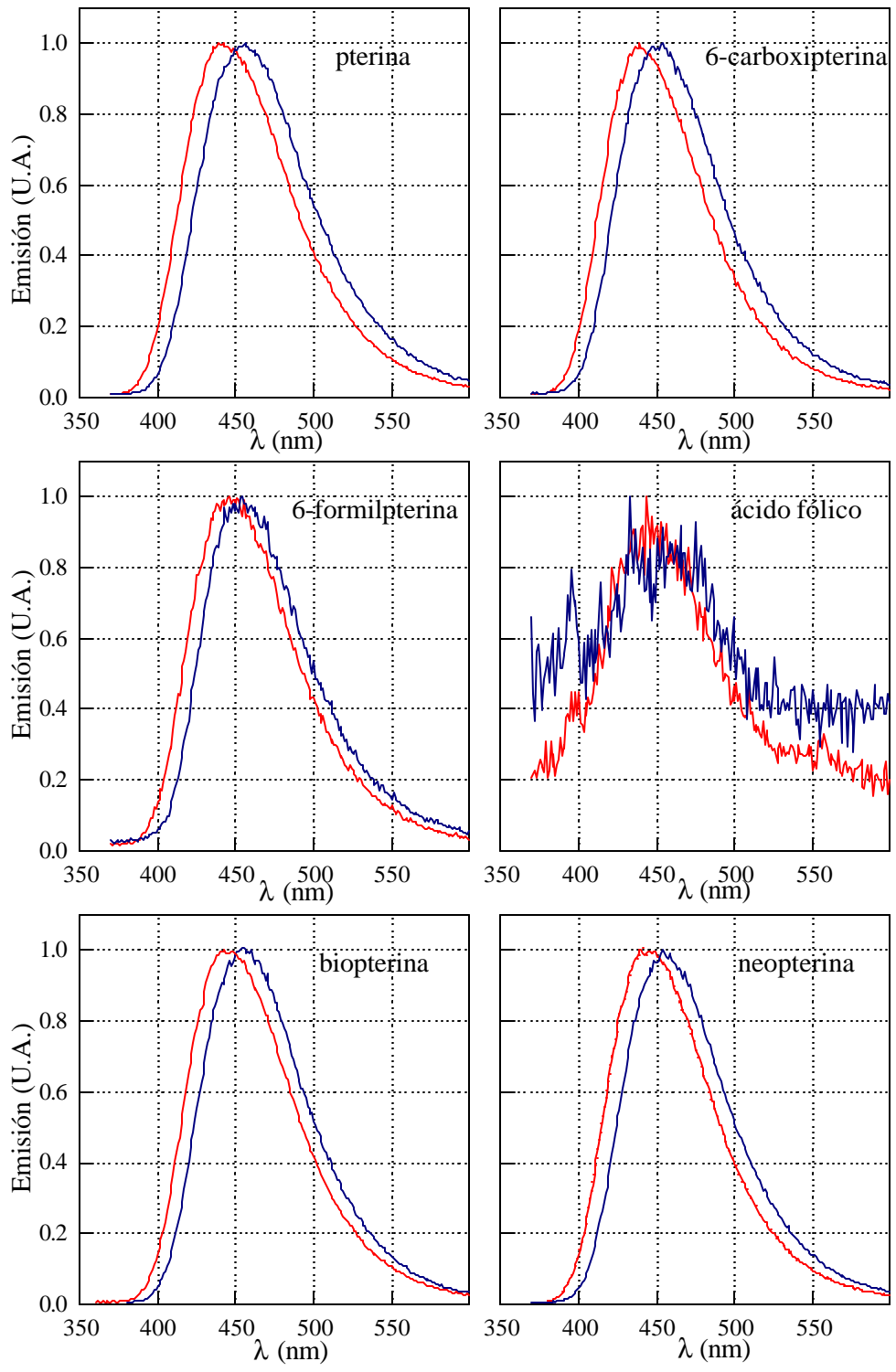


Figura 9.8: Espectros de emisión normalizados de soluciones de pterinas en su forma ácida ($\frac{3}{4}$) y alcalina ($\frac{3}{4}$). Longitud de onda de excitación: 350 nm.

compuesto	forma ácida (pH = 5.5)	forma alcalina (pH = 10.5)
pterina	439	456
6-carboxipterina	439	451
6-formilpterina	446	454
ácido fólico	445	455
neopterina	440	454
biopterina	441	455

Tabla 9.1: Máximos de los espectros de emisión en nm (error ± 3 nm).

En la Figura 9.9 se muestran los espectros de emisión normalizados obtenidos excitando la forma ácida de los seis compuestos a las longitudes de onda correspondientes a los máximos de absorción. Análogamente, en la Figura 9.10 se presenta la misma información referida a las formas alcalinas.

Se puede observar en todos los casos que los espectros de emisión normalizados coinciden independientemente de la longitud de onda de excitación. Estos resultados sugieren que existe un solo estado excitado emisor para cada pterina, independientemente de la luz de excitación. Es decir, todos los estados excitados decaen a un único estado excitado (el estado excitado de menor energía) y la emisión fluorescente ocurre desde allí.

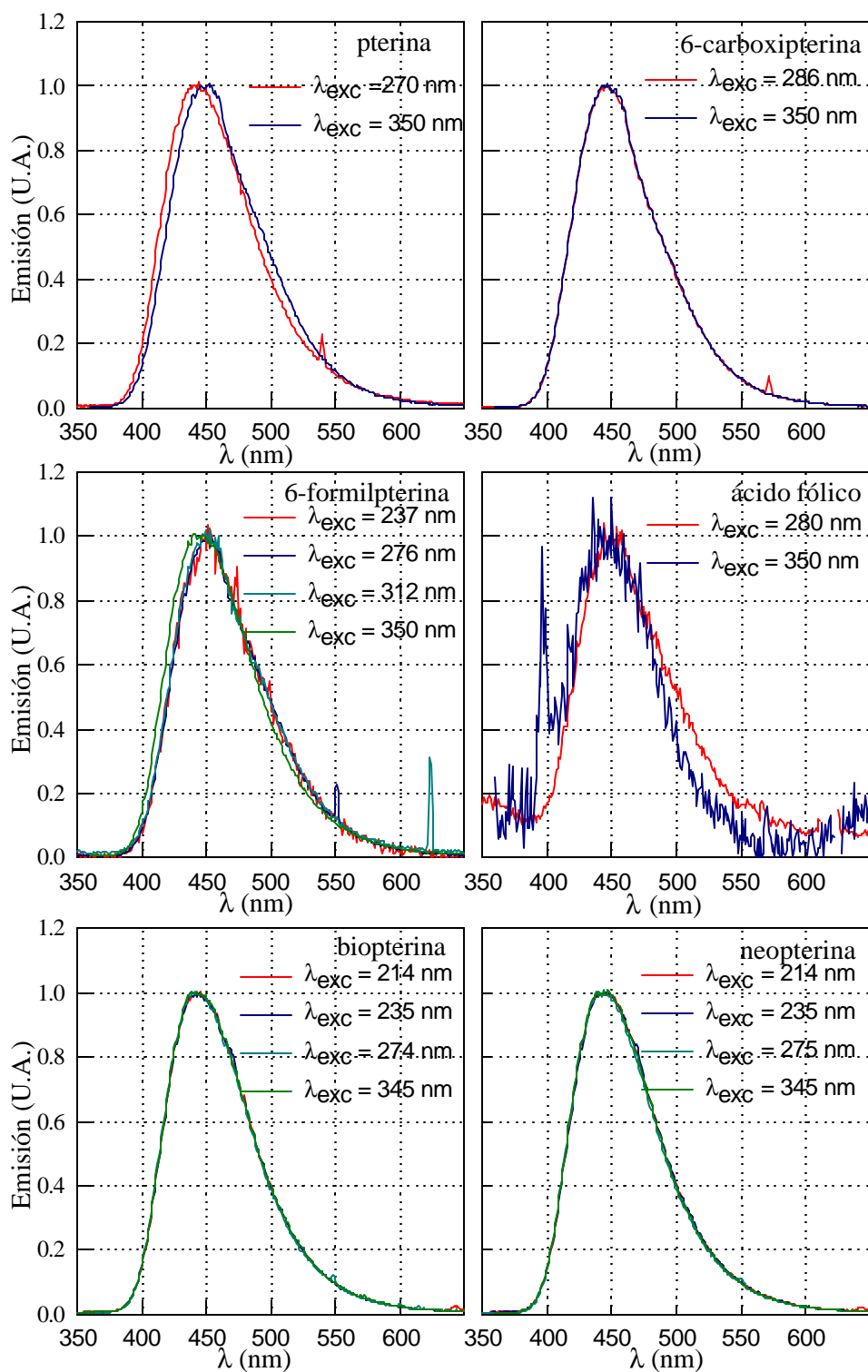


Figura 9.9: Espectros de emisión de soluciones ácidas (pH = 5.5) de pterinas por excitación con luz de diferentes longitudes de onda.

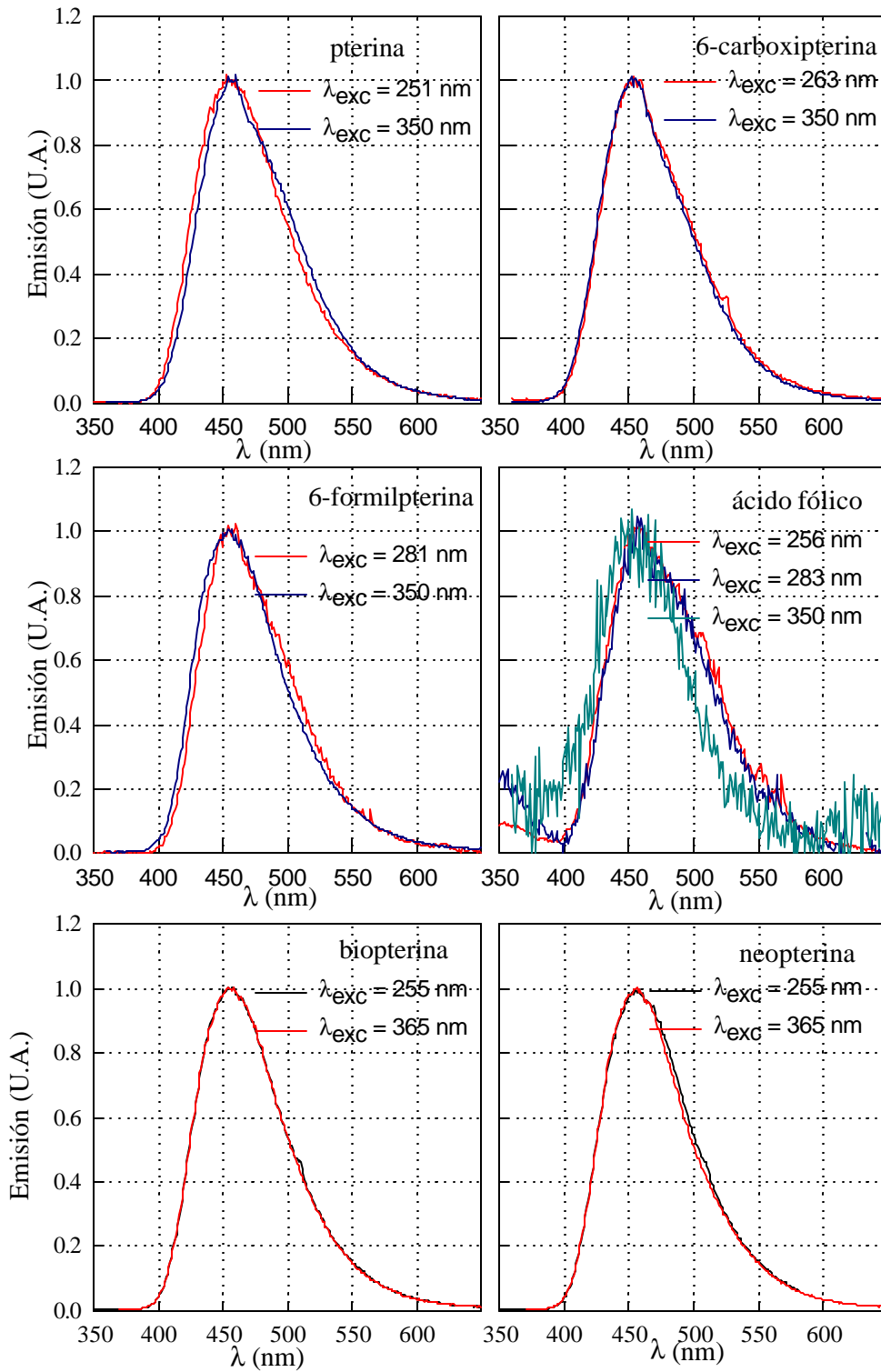


Figura 9.10: Espectros de emisión de soluciones alcalinas (pH = 10.5) de pterinas por excitación con luz de diferentes longitudes de onda.

Rendimientos cuánticos de fluorescencia.

Se determinaron los rendimientos cuánticos de fluorescencia (Φ_F) por excitación a 350 nm, en el rango de pH comprendido entre 4.9–5.5, para las formas ácidas, y en el rango de pH comprendido entre 10.0–10.5, para las alcalinas. Se analizaron soluciones burbujeadas con argón, equilibradas con aire y saturadas con oxígeno. Se midieron los rendimientos cuánticos de pterina, 6-carboxipterina, 6-formilpterina, ácido fólico, neopterina y biopterina, de acuerdo con la técnica detallada en el *Capítulo 5*. Los resultados se muestran en la Tabla 9.2.

compuesto	forma ácido-base	F_F (aire) ± 0.01	F_F (argón) ± 0.01	F_F (O ₂) ± 0.01
pterina	ácida	0.32	0.33	0.31
	alcalina	0.27	0.27	0.27
6-carboxipterina	ácida	0.26	0.28	0.27
	alcalina	0.18	0.18	0.20
6-formilpterina	ácida	0.12	0.12	0.12
	alcalina	0.07	0.07	0.07
ácido fólico	ácida	<0.005	<0.005	<0.005
	alcalina	<0.005	<0.005	<0.005
neopterina	ácida	0.38	----	----
	alcalina	0.31	----	----
biopterina	ácida	0.36	----	----
	alcalina	0.29	----	----

Tabla 9.2: Rendimientos cuánticos de fluorescencia (F_F) de cada forma ácido-base en diferentes atmósferas.

Para todos los compuestos analizados se obtuvieron valores de rendimientos cuánticos de fluorescencia relativamente altos, excepto para el ácido fólico que presenta, tanto en su forma ácida como para su forma alcalina, valores de rendimiento cuántico de fluorescencia mucho menores. Este comportamiento particular del ácido fólico puede ser explicado mediante distintas hipótesis. Podría, por ejemplo, existir un eficiente mecanismo adicional de desactivación no radiativo del estado singlete excitado. Un cruzamiento intersistemas más eficiente que el existente en las otras pterinas podría ser también considerado. Por último, el ácido fólico presenta vías de degradación fotoquímica que compiten con la desactivación por fluorescencia. Sin embargo, los rendimientos cuánticos de fotólisis son muy bajos como para justificar semejante descenso en los valores de rendimientos cuánticos de fluorescencia. En efecto los valores de rendimiento cuántico de fotólisis que se encuentran en literatura son 0.025 [Thomas *et al.*, 2000] para la forma ácida y 0.0051 para la forma alcalina [Thomas *et al.*, 2002].

Por otro lado, los rendimientos cuánticos del resto de las pterinas muestran significativas diferencias entre sí, habiéndose obtenido valores que van desde 0.07 hasta 0.38. Es importante mencionar también que, en todos los casos, excepto para el ácido fólico, los rendimientos cuánticos de fluorescencia de las formas ácidas son mayores que los correspondientes a las formas alcalinas. Del análisis de los valores presentados en la Tabla 9.2, puede concluirse que la emisión fluorescente de las pterinas es apreciablemente afectada tanto por el pH del medio como por el sustituyente presente en la posición 6 de su estructura molecular.

Asimismo, se determinaron valores de rendimientos cuánticos de fluorescencia para pterina, 6-carboxipterina, 6-formilpterina y ácido fólico en soluciones burbujeadas con argón (libres de oxígeno) y en soluciones saturadas con oxígeno. En todos los casos se observa que no existen diferencias significativas entre los tres grupos de valores. Los resultados se muestran en la Tabla 9.2. Este análisis indica que los estados singletes excitados de las pterinas no son desactivados significativamente por el

oxígeno.

Espectros de excitación.

Se obtuvieron los espectros de excitación corregidos de las formas ácidas y alcalinas de pterina, biopterina y neopterina, aplicando el protocolo descrito en el *Capítulo 5*. Estos experimentos se realizaron en condiciones de pH similares a las mencionadas en la Sección anterior y la emisión de las muestras se detectó a 450 nm. En todos los casos se emplearon soluciones aireadas.

En las Figuras 9.11, 9.12 y 9.13 pueden observarse los espectros de excitación corregidos normalizados junto a los espectros de absorción normalizados. Con fines comparativos todos los espectros, de excitación y absorción, se normalizaron a la longitud de onda del máximo de la banda de menor energía. En todos los casos puede observarse que los espectros de excitación y absorción coinciden en los máximos de las distintas bandas; sin embargo, no se superponen entre sí. Esto se debe, fundamentalmente a que la relación de intensidades entre la banda de mayor energía (entre 230 y 290 nm) y la banda de menor energía (entre 310 y 400 nm) en los espectros de excitación es menor que la relación equivalente en los espectros de absorción.

Tal como se detalló anteriormente, del análisis de los espectros de absorción y emisión puede desprenderse que en las pterinas existen, al menos, dos estados excitados singletes, de los cuales sólo el de menor energía (S_1) emite y el de mayor energía (S_2), no emisor, decae a S_1 . De la comparación de los espectros de excitación y absorción mostrados en esta sección puede deducirse que sólo una porción de las moléculas excitadas a S_2 decae a S_1 . Esto implica que el estado excitado S_2 posee otras vías de desactivación que compiten eficientemente con la conversión interna a S_1 . Esto se ve reflejado cuando se calculan los rendimientos cuánticos de fluorescencia a distintas longitudes de onda a partir de los espectros de excitación. En efecto, en la

tabla 9.3 se muestran estos valores, apreciándose que para los tres compuestos analizados los rendimientos cuánticos de fluorescencia cuando se excita a longitudes de onda correspondientes a la banda de mayor energía son menores que a 350 nm (valores listados en la tabla 9.2).

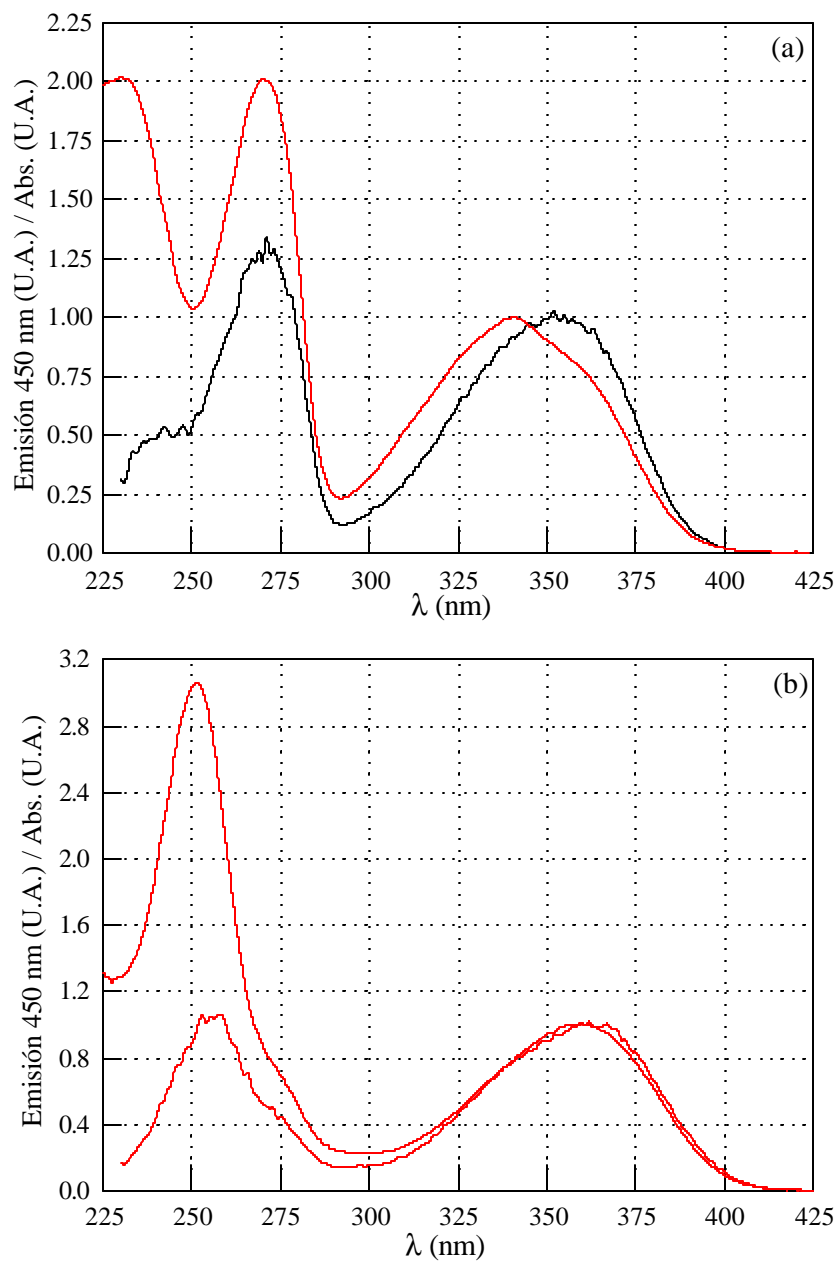


Figura 9.11: Espectros normalizados de excitación (3/4) y absorción (3/4) de (a) forma ácida (pH=5.5) y (b) forma alcalina (pH=10.7) de pterina.

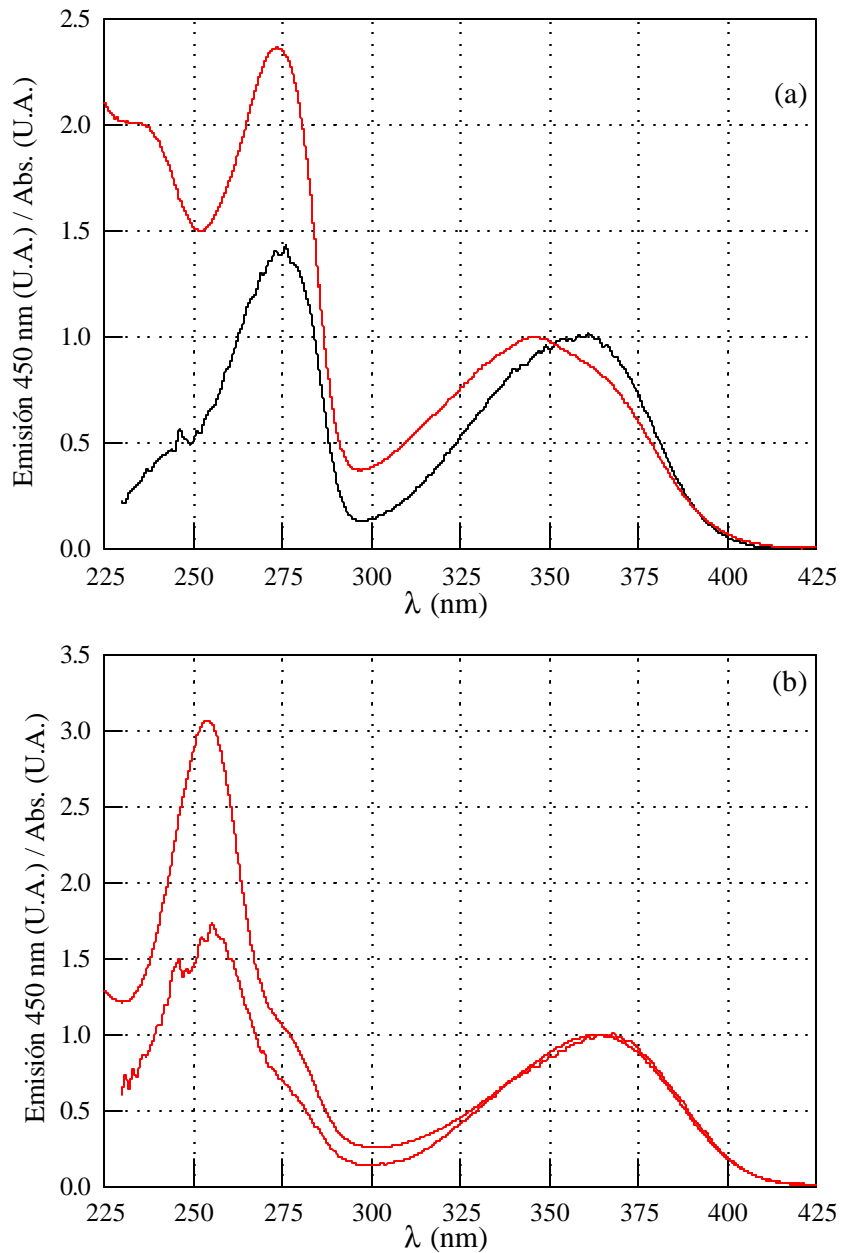


Figura 9.12: Espectros normalizados de excitación (¼) y absorción (¾) de (a) forma ácida (pH=5.5) y (b) forma alcalina (pH=10.7) de biopterina.

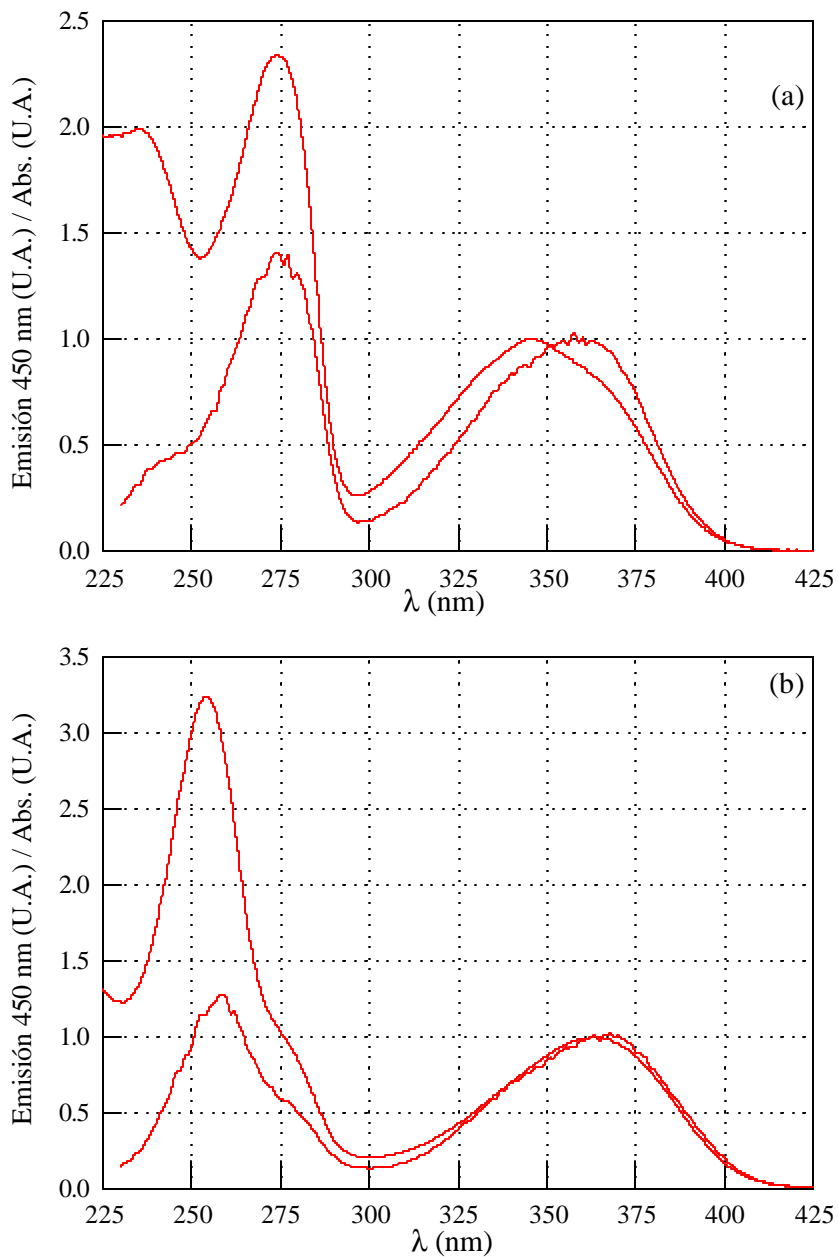


Figura 9.13: Espectros normalizados de excitación (3/4) y absorción (3/4) de (a) forma ácida (pH=5.5) y (b) forma alcalina (pH=10.7) de neopterina.

compuesto	forma ácido-base	l (nm)	F_F^l	F_F^{350}
pterina	ácida	270	0.20	0.32

	alcalina	251	0.11	0.27
biopterina	ácida	273	0.25	0.36
	alcalina	254	0.21	0.29
neopterina	ácida	274	0.26	0.38
	alcalina	254	0.15	0.31

Tabla 9.3: Rendimiento cuántico de fluorescencia en el máximo de la banda de absorción de menor energía (F_F^1) (calculado del espectro de excitación). Con fines comparativos, en la última columna se listan los rendimientos cuánticos de fluorescencia obtenidos a 350 nm (F_F^{350}) (Tabla 9.2).

Tiempos de vida de fluorescencia.

Mediante la técnica de *Single Photon Counting* se analizó la evolución de la intensidad de fluorescencia como una función del tiempo, para las formas ácidas y básicas de los compuestos estudiados, con el fin de determinar los tiempos de vida de fluorescencia (τ_F). Las trazas experimentales fueron analizadas con el programa del equipo mediante ajustes no lineales luego de realizar la deconvolución de la señal de la lámpara. En todos los experimentos se probaron ajustes exponenciales de primer orden, de segundo orden y biexponenciales. Se observó que todos los decaimientos de fluorescencia de las pterinas siguen un comportamiento exponencial de primer de orden. En la Figura 9.14, a modo de ejemplo, se muestra una traza típica registrada para biopterina. Los tiempos de vida de fluorescencia para las formas ácidas se obtuvieron promediando al menos tres valores en el rango de pH comprendido entre 3.0 y 6.2. De la misma manera, se obtuvieron los tiempos de vida de fluorescencia para las formas básicas promediando al menos dos valores en el rango de pH comprendido entre 9.0 y 11.0. Estos resultados se muestran en la Tabla 9.4.

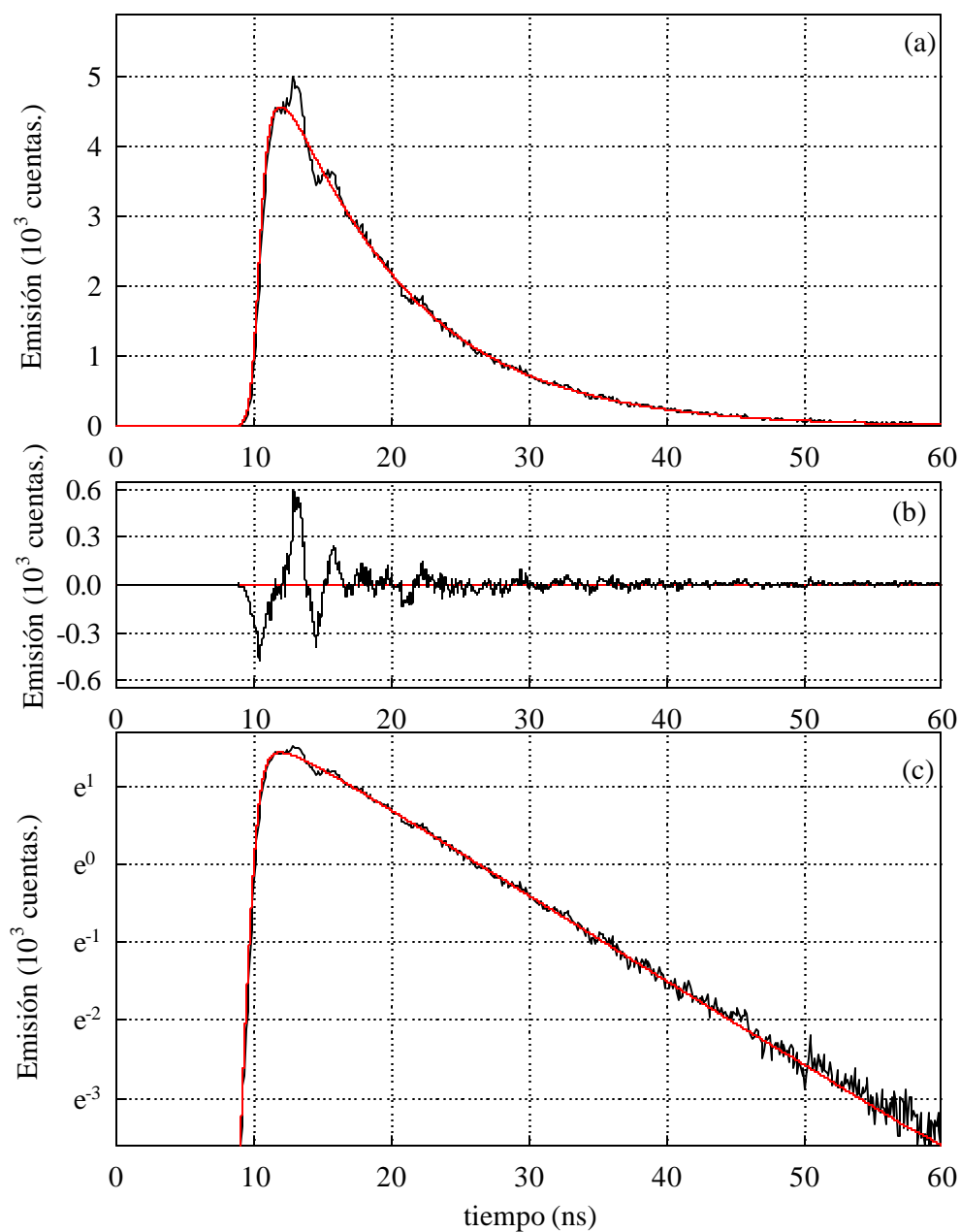


Figura 9.14: Variación de la intensidad de fluorescencia en función del tiempo.
(a) Traza experimental obtenida para una solución de bipterina a pH 6.2 (3/4). Experimento realizado excitando a 350 nm y registrando a 450 nm. La línea roja representa el ajuste no lineal. **(b)** Residuos. **(c)** Decaimiento (3/4) y ajuste (3/4) en escala logarítmica.

Compuesto	t_F (ns)	
	forma ácida	forma básica
pterina	7.6	5.0
6-carboxipterina	5.8	4.1
6-formilpterina	7.9	2.2
ácido fólico	7.0	3.5
biopterina	9.1	7.6
neopterina	8.9	7.4

Tabla 9.4: Tiempos de vida de fluorescencia (t_F) de las formas ácida y alcalina (error ± 0.4 ns).

Puede observarse que los tiempos de vida de fluorescencia para las formas ácidas son mayores que los de las correspondientes formas alcalinas. También es apreciable que se encuentran afectados por el tipo de sustituyente en la posición 6.

Los tiempos de vida de fluorescencia obtenidos corresponden a tiempos de vida de los estados excitados (S_1):

$$\tau_F = 1 / k_F$$

donde k_F corresponde a la suma de todas las constantes de velocidad de los distintos procesos que contribuyen al decaimiento del estado excitado. Por ejemplo, si consideramos que la fluorescencia del estado excitado S_1 compite con conversión interna a S_0 (k_{IC}) y cruzamiento intersistemas (k_{ISC}), la velocidad de decaimiento de la

$$-d[S_1] / dt = k_F^0 [S_1] + k_{IC} [S_1] + k_{ISC} [S_1] = k_F [S_1]$$

concentración S_1 vendrá dada por:

donde k_F^0 es la constante de velocidad de fluorescencia intrínseca o natural. La constante k_F , obtenida experimentalmente, es: $k_F = \Sigma k_i$.

Puede deducirse la siguiente expresión para el rendimiento cuántico de fluorescencia:

$$\Phi_F = \frac{k_F^0}{\Sigma k_i} = \tau_F \cdot k_F^0$$

Esta expresión permite calcular k_F^0 a partir de Φ_F y τ_F . Los valores de k_F^0 obtenidos de esta manera se listan en la Tabla 9.5.

Compuesto	k_F^0 (ns ⁻¹)	
	Forma ácida	Forma alcalina
pterina	0.042	0.043
6-carboxipterina	0.045	0.055
6-formilpterina	0.015	0.033
biopterina	0.039	0.038
neopterina	0.043	0.042

Tabla 9.5: Constantes de velocidad intrínseca (k_F^0 , ns⁻¹)

Observando el conjunto de datos de la Tabla 9.5, puede apreciarse que, excepto para el caso de la 6-formilpterina, todos los valores de constantes de velocidad intrínseca (k_F^0) son similares. Esto sugiere que la velocidad de desactivación del estado excitado S_1 por fluorescencia es similar para todas las pterinas estudiadas y es independiente de la forma ácido-base. Por consiguiente, las diferencias observadas en

los rendimientos cuánticos de fluorescencia (Φ_F) y tiempos de vida (τ_F) experimentales deben ser consecuencia de diferencias en las constantes de velocidad de otros procesos de desactivación (conversión interna, cruzamiento intersistemas), más que a diferencias en las constantes de velocidad del decaimiento por fluorescencia (k_F^0).

Emisión fluorescente de pterinas en soluciones fuertemente alcalinas.

En ciertos experimentos, se observó que los rendimientos cuánticos de fluorescencia de las pterinas disminuyen en soluciones fuertemente alcalinas ($\text{pH} > 11$). Es importante recordar que a estos valores de pH no existen equilibrios ácido-base que puedan justificar variaciones en la emisión fluorescente. Por ello se decidió realizar un estudio sistemático de este fenómeno sobre tres compuestos de la familia: pterina, 6-carboxipterina y 6-formilpterina. Se llevaron a cabo medidas estacionarias y resueltas en el tiempo. En ambos casos se realizaron series de experimentos empleando soluciones con concentración de pterina constante y valores de pH creciente.

Se observó que los espectros de emisión de los tres compuestos analizados disminuyen progresivamente en intensidad al aumentar el pH por encima de 11. Sin embargo, los máximos de emisión de estos espectros no varían con el pH. A modo de ejemplo, en la Figura 9.15, se muestra este fenómeno para la 6-carboxipterina. Por otro lado, se determinaron los tiempos de vida de fluorescencia (τ_F) para los mencionados compuestos en función del pH. Para ello se realizaron experimentos similares a los descritos en el Capítulo anterior (se excitó a 350 nm y se registró la emisión a 450 nm en función del tiempo). Se observó en todos los casos que los tiempos de vida de fluorescencia disminuyen progresivamente con valores de pH superiores a 11. En la Figura 9.16 se puede apreciar los resultados obtenidos en estos experimentos para 6-carboxipterina.

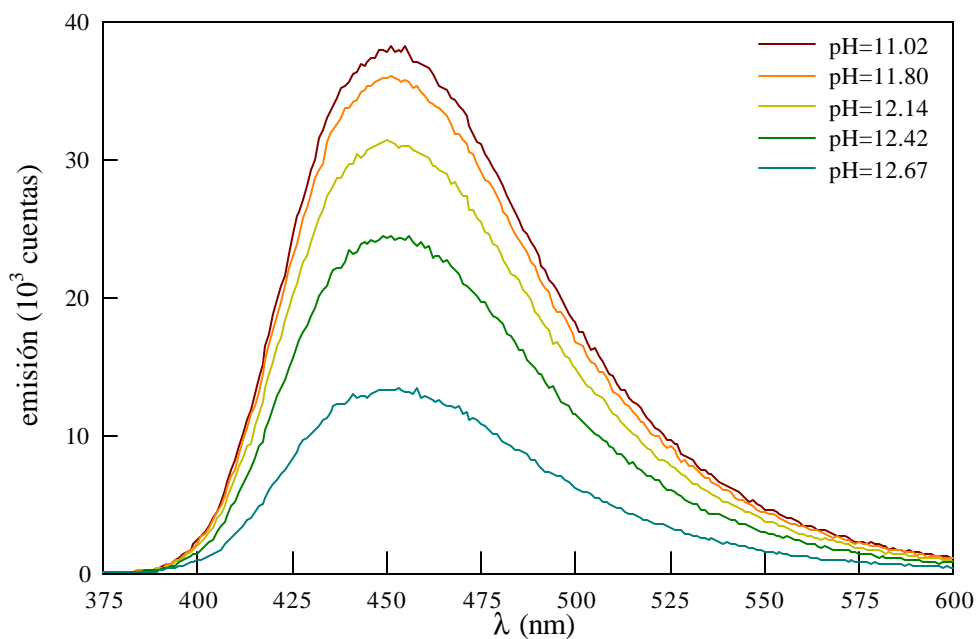


Figura 9.15: Espectros de emisión de soluciones fuertemente alcalinas de 6-carboxipterina.

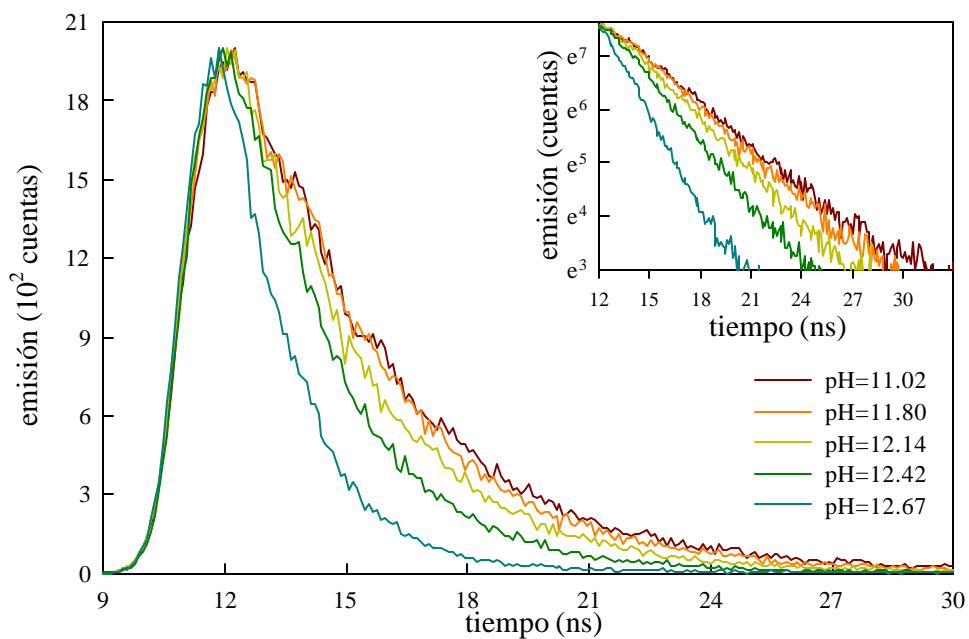


Figura 9.16: Variación de la intensidad fluorescente en función del tiempo. Trazas obtenidas para soluciones de 6-carboxipterina a diferentes pH. Se excitó con luz de 350 nm y se registró a 450 nm.

Se analizó la dependencia de la intensidad de fluorescencia (determinada como el área bajo el espectro de emisión) Se encontró un comportamiento lineal de Stern-Volmer para la variación de la intensidad de fluorescencia con la concentración de hidroxilos. En la Figura 9.17, se muestran las correspondientes gráficas de Stern-Volmer obtenidas para los tres compuestos estudiados. Análogamente, se encontró el mismo tipo de relación para la dependencia de los tiempos de vida con la concentración de hidroxilos. Las gráficas de Stern-Volmer pueden observarse en la Figura 9.17. En estos experimentos los valores de I_0 y τ_0 se obtuvieron promediando valores correspondientes a pH entre 10.0 y 10.8.

En la tabla 9.6 pueden observarse los valores de las constantes de Stern-Volmer (K_{SV}) obtenidos de las gráficas presentadas en la Figura 9.17. Puede apreciarse que, para una determinada sustancia analizada, los dos valores de constantes de Stern-Volmer obtenidos en los experimentos de estado estacionario y tiempo de vida de fluorescencia, son similares. Estos resultados permiten inferir que el fenómeno de disminución de la intensidad de la emisión fluorescente de las pterinas al aumentar el pH es un proceso de *quenching* de fluorescencia dinámico por iones hidroxilo.

Con las constantes de Stern-Volmer (K_{SV}) obtenidas y con los valores de τ_f , se calcularon las constantes de velocidad bimoleculares del *quenching* de fluorescencia (k_q) por hidroxilos Se utilizó para estos cálculos un promedio de los valores de K_{SV} obtenidos de las gráficas de I_0/I vs. OH^- y de τ_0/τ vs. OH^- . Estos resultados se muestran en la Tabla 9.6.

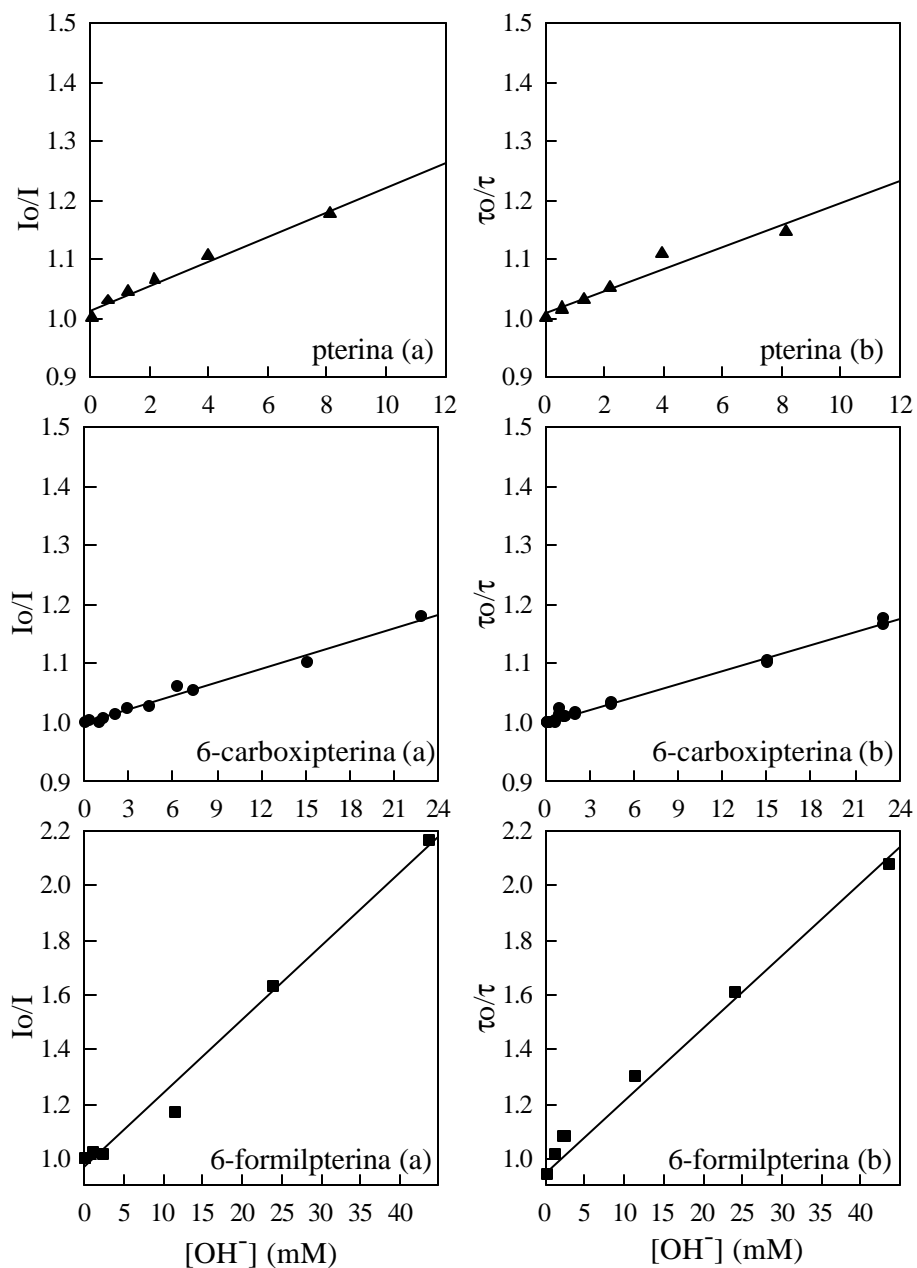


Figura 9.17: Gráficas de Stern-Volmer: (a) Variación de la intensidad de fluorescencia (I_F) como función de la concentración de hidroxilos. (b) Variación de los tiempos de vida de fluorescencia (t_F) como función de la concentración de hidroxilos. Ambas series de experimentos se realizaron excitando a 350 nm.

Compuesto	$K_{SV} (\pm 1 M^{-1})^a$	$K_{SV} (\pm 1 M^{-1})^b$	$k_q (\pm 0.1 M^{-1} s^{-1})$
pterina	20	16	3.6×10^9
6-carboxipterina	7.7	8.1	1.9×10^9
6-formilpterina	26	23	1.1×10^{10}

Tabla 9.6: Resultados de análisis de Stern-Volmer. ^a K_{SV} obtenidos de la intensidad de fluorescencia. ^b K_{SV} obtenidos de las medidas de tiempos de vida de fluorescencia.

Titulaciones ácido base

Para pterina, 6-carboxipterina y 6-formilpterina se realizaron titulaciones ácido-base siguiendo el procedimiento que se detalla a continuación. Se preparó una solución inicial con pH = 12 y concentración tal que la absorbancia a 350 nm (A^{350}) fuera menor a 0.12. Se varió el pH agregando alícuotas de solución de HCl o NaOH de volumen despreciable. Por lo tanto, se trabajó a concentración de sustancia estudiada y fuerza iónica constante. Se obtuvieron espectros de emisión, excitando a 350 nm, de soluciones con distintos valores de pH. La intensidad de la emisión (I) de estos espectros se obtuvo integrando entre 360 y 600 nm.

En estas condiciones experimentales la absorbancia a 350 nm de las soluciones varía con el pH, debido a que las distintas formas ácido-base de cada pterina presentan diferentes coeficientes de extinción molar a dicha longitud de onda. Por consiguiente, para poder analizar la dependencia de la intensidad de la emisión de fluorescencia como una función del pH es necesario realizar una corrección por absorbancia. De este modo, para cada valor de intensidad obtenido se realizó la siguiente corrección:

$$I^{\text{corr}} = \frac{I}{1 - 10^{(-A^{350}(\text{pH}=\text{x}))}}$$

donde I^{corr} es la intensidad de fluorescencia corregida por absorbancia, I es la integral del espectro de emisión de fluorescencia a determinado pH y A^{350} es la absorbancia a 350 nm. La absorbancia a 350 nm se obtuvo de los correspondientes espectros de absorción.

La Figura 9.18 muestra la variación de las integrales de las intensidades de fluorescencia corregidas por absorbancia como una función del pH en el rango entre 4 y 10.5. La conducta observada en esta figura se debe al equilibrio previamente mencionado entre las formas ácida y básica de las pterinas. Se realizaron ajustes no lineales de estas curvas con la siguiente ecuación:

$$I^{\text{corr}} = I^{\text{corr}}_a + (I^{\text{corr}}_b - I^{\text{corr}}_a) \cdot [K_a / (K_a + [H^+])] \quad (1)$$

donde I^{corr}_a e I^{corr}_b son las integrales de la intensidad de fluorescencia de la forma ácida y de la forma alcalina respectivamente, K_a es la constante de disociación.

Los resultados de estos ajustes se muestran en la Figura 9.18. Puede apreciarse que en los tres casos analizados el comportamiento experimental puede ser ajustado con la ecuación propuesta. Puede, por consiguiente, interpretarse dicho comportamiento reconociéndose tres regiones de pH. Existe un rango de pH en el cual sólo existe la forma ácida del compuesto, en el cual no hay variaciones en el espectro de emisión y, por ende, en su integral. Análogamente existe un rango de pH en el cual sólo está presente la forma básica. Por último, existe un rango de pH, ubicado entre los dos anteriormente mencionados, en el cual coexisten las dos formas ácido-base y, consecuentemente, la intensidad de la emisión fluorescente toma valores intermedios.

Los valores de K_a obtenidos mediante estos ajustes no lineales y los valores de literatura obtenidos de titulaciones espectrofotométricas se listan en la Tabla 9.7 [Monópoli *et al.*, 2000; Thomas *et al.*, 1996; Thomas *et al.*, 2000]. No hay diferencia

significativa entre los dos grupos de resultados experimentales para pterina y 6-carboxipterina. Este hecho sugiere dos posibles explicaciones. Por un lado, que las constantes de disociación del equilibrio entre las dos formas ácido-base de los estados singletes excitados son iguales que las constantes de disociación correspondientes al mismo equilibrio en estado basal. Por el otro, que la desactivación de los estados excitados singletes de las formas ácidas es mucho más rápida que la desprotonación.

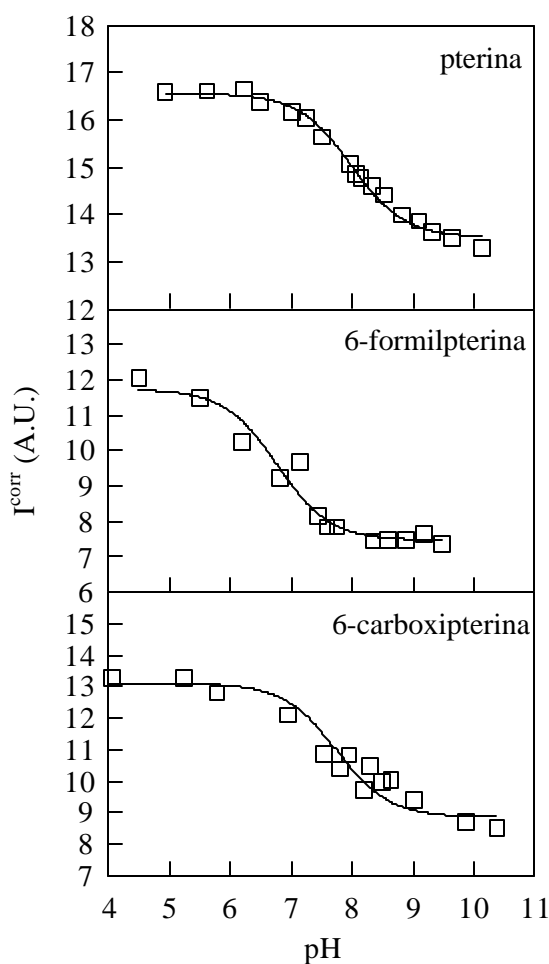


Figura 9.18: Variación de la intensidad de fluorescencia corregida por la absorbancia de la solución a la longitud de onda de excitación (350 nm) como función del pH. En línea continua se observa la intensidad de fluorescencia calculada ajustando los datos experimentales con la ecuación (1).

Compuesto	K_a^1	pKa ¹	K_a^2	pKa ²
Pterina	$1.23 \times 10^{-8} \pm 6 \times 10^{-10}$	7.9	$1.0 \times 10^{-8} \pm 2 \times 10^{-9}$	8.0
6-carboxypterina	$1.3 \times 10^{-8} \pm 1 \times 10^{-9}$	7.9	$1.8 \times 10^{-8} \pm 4 \times 10^{-9}$	7.7
6-formylpterina	$4.7 \times 10^{-8} \pm 2 \times 10^{-9}$	7.3	$1.7 \times 10^{-7} \pm 6 \times 10^{-8}$	6.8

Tabla 9.7: Valores de pKa para el equilibrio mostrado en la Figura 9.13

¹Valores publicados previamente en la literatura por titulaciones espectrofotométricas. ²valores obtenidos para este trabajo de la intensidad de fluorescencia experimental. Los errores se estimaron con S_{n-1} .

Sin embargo, en el caso de la 6-formilpterina las diferencias en los valores de las constantes de disociación son significativas, teniendo en cuenta sendos errores experimentales. Estos resultados sugieren la existencia de un equilibrio ácido-base en el estado excitado de formilpterina más ácido que en el estado basal.