

00523
53



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**El ANS (1-anilino-8-sulfonato-naftaleno)
como sensor de ambientes hidrofóbicos.**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
Q U I M I C A
P R E S E N T A :
Jimena Celia Saucedo Peña



MÉXICO, D. F.



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA

2003

A



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado:

Presidente **Dr. MIGUEL ANTONIO COSTAS BASÍN**

Vocal **Dra. SILVIA DEL SOCORRO PÉREZ CASAS**

Secretario **Dr. DANIEL ALEJANDRO FERNÁNDEZ VELASCO**

1er Suplente **Dr. JOSÉ FEDERICO DEL RÍO PORTILLA**

2do Suplente **Dr. ERNESTO CARRILLO NAVA**

Dr. Miguel Antonio Costas Basin
ASESOR



Biol. Hugo Nájera Peña
SUPERVISOR TÉCNICO

HUGO NÁJERA

Jimena Celia Saucedo Peña
SUSTENTANTE




*A mis padres Rocío y Juan Manuel, porque
inspiran mis sueños y alimentan mis ilusiones.*

*A mi abuela Celia, mi primera maestra,
quien todos los días me demuestra que nunca
falta algo por aprender y algo por enseñar.*

*A mis tíos Martha y Manuel, porque su ejemplo
de amor, de honestidad y de valor
frente a la vida ha dejado un dulce sello.*

*A Paty y a Daniel,
porque una vida sin hermanos
es como un capuchino sin canela.*

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la
UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el
contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: SAUCEDA PEÑA
JIMENA CELIA
FECHA: 27-I-2003
FIRMA: 

Agradecimientos:

A Miguel, mi asesor y tutor, por su paciencia, por todo lo que he aprendido bajo su guía.

A Alejandro, a Hugo e Ismael, por su invaluable apoyo y ayuda.

Al Profesor Jorge Cárdenas, a la Mtra. Alejandrina Acosta, a Nieves y a Antonio, quienes amablemente me regalaron de su tiempo, su entusiasmo y su experiencia para llevar a cabo los experimentos de RMN en el Instituto de Química de la UNAM.

Al laboratorio de Ingeniería de Proteínas: a Georgina, Laura, Ma. Elena, Gabriela, Mario, Alejandro S., Samuel, David, Sergio y Gilberto, quienes me hicieron sentir parte de una comunidad como pocas.

A todas las personas del laboratorio 102, por hacer de todos los días una experiencia agradable.

A Atzimba, Gladys, Bianka, José Luis y Ricardo, porque van tantísimos años y seguimos siendo amigos; porque no me cabe la menor duda de que la vida es mejor con ustedes a mi lado.

A Paula, Elisa, Alma, Greta, Pablo, Luis David, Catalina, Carlos (Olvera, Frontana y Cosío), porque compartimos algo más que la química, por los momentos increíbles en la Facultad, por los días, las clases, y los exámenes, por las historias y las confidencias, por el apapacho cuando lo necesitaba, por las palabras de aliento.

A Juan Carlos, Ernesto, Yamilet y Rubén. Porque la complicidad se siente muy bien entre nosotros.

A mi GRAN familia. A mis primos y tíos.

Y a Gerardo, por todos los momentos hermosos.

ÍNDICE

<i>Apartado</i>	<i>Página</i>
I. Introducción.....	1
1.1 <i>Motivación.....</i>	1
1.2 <i>Objetivos.....</i>	4
II. Antecedentes.....	6
2.1 <i>Fluorescencia.....</i>	6
2.11 <i>Generalidades.....</i>	6
2.12 <i>Tipos de Fluorescencia, Espectros de Fluorescencia.....</i>	10
2.13 <i>Medidas Cuantitativas de Fluorescencia.....</i>	11
2.14 <i>Instrumentación.....</i>	14
2.2 <i>Proteínas, Estado de Glóbulo Fundido y ANS.....</i>	17
2.21 <i>Generalidades.....</i>	17
2.22 <i>El Estado de Glóbulo Fundido.....</i>	19
2.23 <i>El ANS como Prueba Fluorescente.....</i>	21
III. Desarrollo.....	25
3.1 <i>Preliminar.....</i>	25
3.2 <i>Material y Métodos.....</i>	26
3.3 <i>Resultados y Discusión.....</i>	29
3.31 <i>Mezclas Binarias: n-Alcohol + ANS.....</i>	29
3.32 <i>Mezclas Binarias: Isómeros del n-Pentanol + ANS.....</i>	41
3.33 <i>Comparación entre las Energías de Transición para ANS en Medios de n-Alcohol e Isómeros del n-Pentanol.....</i>	47
3.34 <i>Mezclas Ternarias: Pentanol + Heptano + ANS.....</i>	50
3.35 <i>Resonancia Magnética Nuclear de ANS.....</i>	56
IV. Conclusiones.....	65
V. Trabajo a Futuro y Anexos.....	68
VII. Referencias.....	71

I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

I.1 Motivación

Los compuestos químicos conocidos como "pruebas fluorescentes" son de gran utilidad en el estudio de sistemas de interés bioquímico. Las propiedades espectroscópicas de estos fluoróforos determinan en última instancia las características del equipo y de la radiación electromagnética necesarias para poder estudiar proteínas, ADN y membranas celulares, por citar algunos sistemas importantes. El pionero en el estudio de dichas pruebas fluorescentes fue Gregorio Weber¹ (1916 – 1997), quien utilizó por primera vez al compuesto fluorescente cloruro de dansilo para "marcar" a ciertas proteínas y poder estudiarlas con la técnica de espectroscopia de fluorescencia, campo en el que también contribuyó notablemente. Además, Weber desarrolló otras pruebas fluorescentes que han sido utilizadas de forma sistemática desde entonces, entre ellas se encuentran el ANS, que concierne a este trabajo, el TNS y los derivados del prodan.

En 1965 Lubert Stryer² publicó un artículo titulado "La interacción de un colorante de naftaleno con apomioglobina y apohemoglobina, una prueba fluorescente para sitios de unión no polares" en el Journal of Molecular Biology. Este artículo, junto con los estudios previos de Weber, sentó un precedente importante para el uso de moléculas aromáticas, rígidas y relativamente pequeñas, capaces de emitir en fluorescencia, para estudiar el problema del plegamiento en las proteínas. La utilización de estas pruebas fluorescentes se ha generalizado. En particular el empleo del compuesto 1-anilino-8-sulfonato naftaleno, ANS por sus siglas en inglés (figura 1) es muy frecuente para detectar intermediarios estables en procesos de desnaturalización de ciertas proteínas. El término "altamente afin al ANS", o "capaz de unir ANS", se ha convertido en una de las características generales que definen la existencia de un estado de glóbulo fundido en una proteína.

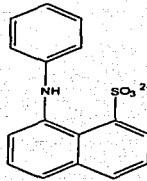


Figura 1: estructura química del 1-anilino-8-sulfonato naptaleno, ANS

El ANS utilizado en conjunto con técnicas de fluorescencia es capaz de detectar cambios en la estructura terciaria de un gran número de proteínas globulares. También se ha reportado que es afín a algunas proteínas en su estado nativo. A la fecha no se sabe a ciencia cierta de qué forma interactúa con estas macromoléculas. Es decir, esta prueba de rutina se ha empleado de forma empírica porque proporciona evidencia sobre diferentes arreglos estructurales en ciertas proteínas expuestas a condiciones particulares, al incrementar sustancialmente su intensidad de fluorescencia, y las razones no son claras, no obstante la explicación más generalizada sobre su supuesta "afinidad hacia zonas hidrofóbicas de la proteína expuestas en el proceso de desnaturalización", que cuenta con gran aceptación entre la comunidad bioquímica. Esta explicación tiene su origen en el artículo original de Stryer², en el cual se describen los experimentos de medición de fluorescencia del ANS en una serie de alcoholes de cadena lineal. El autor observó que, a mayor número de carbonos en la cadena del alcohol, o a "mayor hidrofobicidad" del medio, la intensidad y la energía de fluorescencia del ANS aumentan.

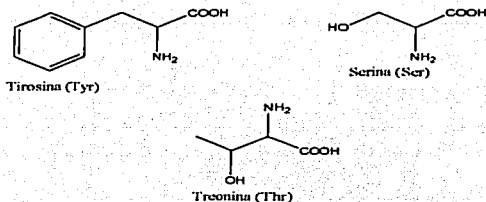


Figura 2: Aminoácidos que presentan un grupo -OH en su cadena lateral

De los 20 aminoácidos más comunes que conforman la estructura primaria de las proteínas existen tres de ellos, la serina, la fenilalanina y la treonina (figura 2), que presentan grupos -OH en su cadena lateral, por lo cual estudiar el comportamiento del ANS en alcoholes equivale a "simular" el ambiente al que estaría expuesto el fluoróforo si pudiera interactuar con alguno de estos dos residuos en una proteína. El ANS podría interactuar con los grupos hidroxilo de la tirosina, treonina y serina. Es por esto que estudiar su comportamiento en medios de alcoholes hidrocarbonados proporciona una analogía interesante. Estos sistemas de alcohol / ANS también permiten una comparación cualitativa entre la "hidrofobicidad" del ambiente al que estaría expuesto el ANS en un ambiente protéico. A grandes rasgos y de forma intuitiva, la "hidrofobicidad" de un medio de alcohol hidrocarbonado se relaciona con el tamaño de la cadena de carbono al que está unido el grupo hidroxilo. Aunque se ha reportado que el ANS se une de forma predominante a los grupos catiónicos en proteínas en disolución mediante la formación de pares iónicos a través del grupo sulfonato, y que esta interacción es fuertemente dependiente de la fuerza iónica y del pH del medio³, el hecho es que esta molécula aumenta significativamente su intensidad de fluorescencia cuando se encuentra disuelta en medios anfífilos, como lo son los alcoholes. Los grupos catiónicos en las proteínas nativas se encuentran, en la mayoría de los casos, expuestos al agua y el ANS fluoresce débilmente en estas condiciones. Sin embargo, al desplegar los grupos no polares que se encuentran en el interior de la proteína y exponerlos al agua, como ocurre en un proceso de desnaturalización parcial, la intensidad de fluorescencia del sistema aumenta

considerablemente. Una posible explicación consiste en que se favorezca la interacción de los grupos no polares del ANS en contacto con las cadenas laterales hidrofóbicas de los residuos de aminoácidos que se encuentran en el interior de la proteína nativa. Dada la intensa fluorescencia del ANS en alcoholes no es descabellado suponer que la molécula puede estar interactuando con los grupos -OH de los aminoácidos que los poseen. En este contexto, profundizar sobre el comportamiento de la "prueba hidrofóbica fluorescente" tiene sentido y posiblemente permita arrojar luz sobre el problema complejo de la asociación entre el ANS y las proteínas.

1.2 Objetivos

En el presente trabajo se estudia exclusivamente el comportamiento del ANS en medios orgánicos (alcoholes y alcoholes + alcano), como una pequeña parte de la tarea cuyo objetivo es comprender mejor y explicar las interacciones que ocurren entre el ANS y las proteínas en estado de glóbulo fundido. Para esto se han utilizado modelos experimentales relativamente sencillos (sistemas de dos y tres componentes) para estudiar la fluorescencia del ANS en ambientes con diferente "hidrofobicidad". En particular se plantearon los siguientes objetivos:

- 1.21 Reproducir las mediciones de fluorescencia del ANS en alcoholes de cadena lineal que realizó Stryer originalmente y emplear también otros alcoholes;
- 1.22 Realizar mediciones de ANS en isómeros estructurales de algunos de estos alcoholes y comparar su fluorescencia con la que presenta en medios de cadena lineal;
- 1.23 Determinar la fluorescencia del ANS en medios compuestos de alcohol lineal + alcano (éste último, disolvente inerte), en búsqueda de una relación entre fluorescencia y la concentración de grupos polares e hidrofóbicos;

- 1.24 Explorar por medio de la técnica de RMN la posibilidad de interacciones tipo puente de hidrógeno del ANS consigo mismo (autoasociación) y/o con el medio.

II. ANTECEDENTES

II. ANTECEDENTES

2.1 FLUORESCENCIA⁴

2.1.1 Generalidades

Cuando la luz interactúa con la materia pueden ocurrir dos tipos de fenómenos: aquellos en los que la luz atraviesa la materia, sin que haya cambio alguno, o aquellos en los que la luz es absorbida, ya sea completamente o sólo en parte. En este último caso, la energía luminosa se transfiere a las moléculas.

La luz es un fenómeno electromagnético y a nivel molecular sólo se puede absorber/emitar en múltiplos de unidades enteras, llamados "cuantos de luz", cuya energía es igual a:

$$E = \frac{hc}{\lambda}$$

donde h es la constante de Planck, λ corresponde a la longitud de onda de la radiación, E es la energía de dicha radiación y c es la velocidad de la luz en el vacío.

Todas las moléculas poseen una serie de niveles de energía cercanos entre sí y pueden llegar a niveles de mayor energía después de ser excitadas, por ejemplo, al absorber un cuanto de luz. Durante este proceso un electrón es promovido a un nivel electrónico energéticamente superior. Las moléculas que pueden alcanzar estos niveles de energía excitados son aquellas en las que se presenta el fenómeno de luminiscencia. Los diferentes estados electrónicos moleculares presentan subniveles que reciben el nombre de estados vibracionales. El primero de estos estados del primer nivel energético en la molécula corresponde a lo que se conoce como "estado basal". Los diferentes estados vibracionales presentan diferencias energéticas entre sí considerablemente menores a los estados electrónicos. Se puede acceder a los estados vibracionales mediante procesos menos energéticos que la excitación por fotones, como por ejemplo, por medio de colisiones entre las moléculas (figura 3).

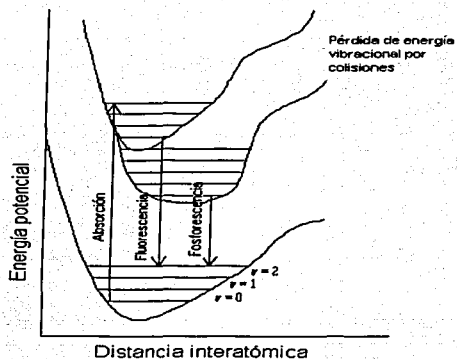


Figura 3: Diagrama esquemático de los niveles de energía para una molécula diatómica y procesos de absorción y emisión de luz.

El fenómeno de fotoluminiscencia se presenta cuando una molécula absorbe radiación y parte de esta energía (o toda ella, en caso de fases gaseosas y diluidas) es reemitida, también en forma de radiación electromagnética. Se conocen tres tipos de fotoluminiscencia: la fluorescencia, la fosforescencia y la fluorescencia retardada. Para explicar cada uno de ellos se recurrirá a la figura 4:

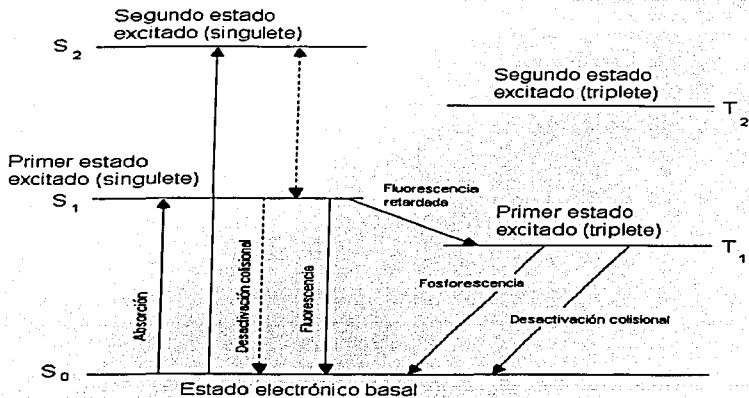


Figura 4: Diagrama de energía de Jablonsky, que muestra de forma esquemática los niveles de energía desde los cuales ocurren los procesos luminiscentes.

La figura 4 recibe el nombre genérico de diagrama de Jablonsky. Si una molécula reemite el cuanto de luz absorbido a partir del primer estado excitado, S_1 , entonces tiene lugar un proceso de fluorescencia. Si la molécula alcanza el estado S_1 , pero se puede acceder a un estado T_1 (que tiene que ser de menor energía), y la molécula emite un fotón desde esta condición, entonces ocurre el fenómeno de fosforescencia. Si se accede al estado T_1 , pero la molécula toma energía del ambiente para volver a alcanzar el estado S_1 , y emite desde aquí, se tendrá una fluorescencia retardada.

En estos tres procesos es importante considerar el espín del electrón promovido (que puede adquirir uno de dos valores posibles, $+1/2$ o $-1/2$). Para que se dé la fluorescencia, el electrón debe conservar el mismo espín que tenía en el estado basal, es decir, la molécula

tendrá que emitir desde el estado S_1 , en el cual la multiplicidad (M) es de 1, o mejor dicho, de singulete. La multiplicidad de un estado se obtiene como:

$$M = 2S + 1$$

donde S es la suma de todos los espines electrónicos en la molécula. Si todos los electrones están apareados, entonces $M = 1$.

Si la fosforescencia tiene lugar, el electrón promovido cambia su espín por medio de un proceso conocido como entrecruzamiento de sistemas y la molécula alcanza ahora el estado de T_1 , en el cual la multiplicidad es de 3, o de triplete. En este caso, dos electrones se encuentran desapareados, por lo que:

$$M = 2 \left(\frac{1}{2} + \frac{1}{2} \right) + 1 = 3$$

Existen procesos que compiten directamente con la fluorescencia y la fosforescencia que reciben el nombre genérico de procesos de desactivación no radiativos. Entre ellos se encuentran los procesos colisionales, en los que la energía absorbida se disipa porque las moléculas chocan entre sí (ya sea con otras moléculas de fluoróforo, o bien con las moléculas de disolvente). La influencia de dichos mecanismos depende de las velocidades de éstos comparadas con la velocidad a la que se pueda llevar a cabo la fotoemisión.

Cuando una molécula absorbe, también es posible que ocurran transiciones $S_0 \rightarrow S_2$, es decir, del estado basal al segundo estado excitado. Sin embargo, la fluorescencia se presenta en la mayoría de los casos a partir del nivel S_1 , por lo que una molécula excitada en S_2 tendrá que decaer mediante un proceso sin radiación al estado S_1 , antes de emitir en fluorescencia. Las transiciones electrónicas del estado basal S_0 al estado excitado T_1 son transiciones "prohibidas", o altamente improbables. En la mayoría de los casos, la fosforescencia se presenta únicamente en sistemas sólidos. La razón obedece a que el proceso en el cual el electrón cambia de espín en el estado excitado para después emitir un fotón y regresar al estado basal ($T_1 \rightarrow S_0$) es mucho más lento (10^{-4} s) que la emisión a partir

de un estado S_1 (10^{-12} s). Es por eso que hay mayor oportunidad para que ocurran procesos de desactivación sin radiación, como por ejemplo, que las moléculas de disolvente tomen la energía que podría emitir el fluoróforo, si el sistema es líquido. La absorción de radiación es de los procesos más rápidos que se conocen (10^{-15} s). Cuando se da el fenómeno de fosforescencia el material sigue emitiendo incluso después de que se ha retirado la fuente luminosa de excitación.

2.12 Tipos de Fluorescencia, Espectros de Fluorescencia

La fluorescencia puede ser de tres tipos:

- 1) **Fluorescencia de Stokes:** ocurre cuando los fotones emitidos son menos energéticos que los utilizados para excitación, es decir, la radiación de emisión presenta una longitud de onda superior a la radiación de excitación. Este tipo de fluorescencia ocurre principalmente en soluciones líquidas.
- 2) **Fluorescencia anti-Stokes:** ocurre si la radiación emitida es más energética que la de excitación. Ocurre al añadir energía térmica al sistema y es frecuente en gases diluidos a altas temperaturas.
- 3) **Fluorescencia de resonancia:** consiste en la emisión de fotones de igual energía que los fotones de excitación. Nunca ocurre en solución debido a las interacciones con el disolvente, pero es común en cristales y en gases.

Asociada a la fluorescencia existen dos tipos de dispersión: la dispersión de Rayleigh y la dispersión de Raman. La primera ocurre cuando el fotón incidente excita al fluoróforo a un nivel vibracional superior al basal, para ser reemitido con la misma energía. El fenómeno de Rayleigh ocurre a cualquier longitud de onda de excitación, pero disminuye como la cuarta potencia de esta longitud. Para evitar interferencias con el análisis, se debe trabajar a la mayor longitud de onda de excitación posible. La dispersión de Raman ocurre a diferencias fijas de la dispersión de Rayleigh y se da por energía sustraída o añadida a este fotón de excitación. Esta dispersión es significativamente menor que la de Raman.

En fluorescencia, toda molécula tendrá asociados dos tipos de espectros: a) el espectro de excitación, que consiste en un barrido de longitudes de onda en un intervalo donde aparecen las eficiencias relativas de cada radiación de excitación en una λ de emisión fija; b) el espectro de emisión, que muestra la intensidad relativa de la radiación reemitida por la molécula a cada longitud de onda en una λ de excitación fija. En principio, el espectro de excitación en fluorescencia de una molécula debe tener la misma forma que el espectro de absorción en UV-visible, ya que se trata del mismo fenómeno de absorción de luz; sin embargo, debido a diferencias en la instrumentación de un fluorómetro y un espectrofotómetro, ambos espectros se deben corregir considerando las diferencias en la instrumentación de cada aparato. El espectro de excitación es útil debido a que permite escoger la mejor longitud de onda de excitación para obtener el espectro de emisión, pero un espectro de absorción serviría para el mismo fin. Esta longitud de onda será aquella en el espectro que sea menos energética, para evitar fotodescomposición de la muestra, y preferentemente que presente la mayor eficiencia posible (donde la muestra absorba significativamente).

El espectro de emisión de un fluoróforo particular es independiente de la longitud de onda de excitación. Cualquier longitud de onda a la que ocurra la absorción será capaz de producir fluorescencia. La longitud de onda del máximo de fluorescencia es, en general, independiente de la radiación de excitación, sin embargo, la intensidad de la fluorescencia si puede variar en relación con la intensidad de la absorción. Las proteínas, sin embargo, presentan residuos fluorescentes químicamente diferentes (como la tirosina y el triptofano), por lo cual en algunos casos es evidente que el espectro de emisión sí depende de la longitud de onda de excitación que se utilice.

2.13 Medidas cuantitativas de fluorescencia

Se han definido dos cantidades importantes en fluorescencia, útiles al analizar los espectros. La primera de ellas es una constante que recibe el nombre de **desplazamiento de Stokes** y su expresión matemática es la siguiente:

$$\text{Desplazamiento} = 10^7 \left(\frac{1}{\lambda_{ex}} - \frac{1}{\lambda_{em}} \right)$$

La segunda es una variable que se conoce como **eficiencia cuántica** y se define como:

$$\Phi = \frac{\text{cuantos emitidos}}{\text{cuantos absorbidos}}$$

A mayor Φ se tendrá una mayor intensidad de fluorescencia. Se ha encontrado que la eficiencia cuántica de un compuesto depende de la longitud de onda utilizada para su excitación. No se dará una explicación detallada de esta expresión. Los libros citados en la bibliografía al final del presente trabajo proporcionan excelente material al respecto^{1,4}.

La intensidad de fluorescencia de un compuesto (F) también depende de su concentración. La expresión que relaciona a estas dos variables está dada por:

$$F = \Phi I_0 (1 - e^{-\epsilon bc})$$

donde Φ es la eficiencia cuántica, I_0 es la intensidad de la radiación incidente, ϵ es la absorptividad molar, b corresponde a la longitud del paso de luz en la muestra (paso de la disolución) y c es la concentración molar del fluoróforo. Para soluciones muy diluidas, la expresión se reduce a una expresión similar a la Ley de Lambert y Beer en espectrofotometría:

$$F = K \Phi I_0 \epsilon bc$$

Una gráfica de intensidad de fluorescencia como función de la concentración del fluoróforo debe ser lineal a concentraciones bajas. A altas concentraciones y dependiendo de las interacciones del fluoróforo con el medio, o bien con otras moléculas diferentes a las del disolvente, la intensidad de fluorescencia puede alcanzar un máximo y después decrecer, o

bien volverse constante. Asimismo, la intensidad de fluorescencia también depende de la temperatura, como se puede apreciar en la figura 5.

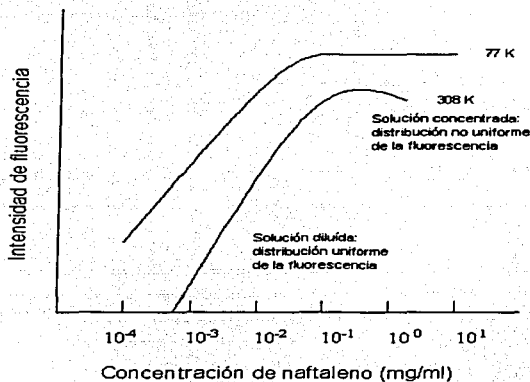


Figura 5*: Dependencia de la intensidad de fluorescencia con la concentración del fluoróforo y la temperatura

La viscosidad de una disolución está directamente relacionada con su temperatura. Es por esto que en medios líquidos, al aumentar la temperatura (y por lo tanto disminuir la viscosidad del sistema), se observará en general una menor intensidad de fluorescencia. En medios muy viscosos, las posibilidades de apagamiento del fluoróforo por colisiones con otras moléculas del medio se reducen, por lo que la intensidad de fluorescencia es grande en comparación con medios poco viscosos, como se explica en mayor detalle más adelante.

Existe una tercera variable cuyo uso en fluorescencia también es frecuente, la *polarizabilidad del medio*, que depende de la constante dieléctrica de éste y del índice de refracción. Esta variable es adimensional. Se define mediante la siguiente ecuación:

$$\Delta f = \frac{\varepsilon - 1}{2\varepsilon + 1} - \frac{n^2 - 1}{2n^2 + 1}$$

donde ε es la constante dieléctrica del medio y n es el índice de refracción.

En la determinación de fluorescencia de emisión (intensidad arbitraria como función de λ), el centro de masa espectral es una variable útil y se calcula de la siguiente manera:

$$CEM(\text{nm}) = \frac{\sum I_i \lambda_i}{\sum I_i}$$

Donde I_i es la intensidad de luz emitida (en unidades arbitrarias) correspondiente a la longitud de onda λ_i .

Se debe recordar que la variable CEM es conveniente debido a que la intensidad de luz emitida por la misma muestra fluorescente puede variar de aparato en aparato; sin embargo la longitud de onda es un parámetro universal, que permite comparar muestras medidas en dos o más aparatos diferentes.

2.14 Instrumentación

A continuación aparece una representación esquemática sencilla de los componentes ópticos de un fluorómetro de filtro típico:

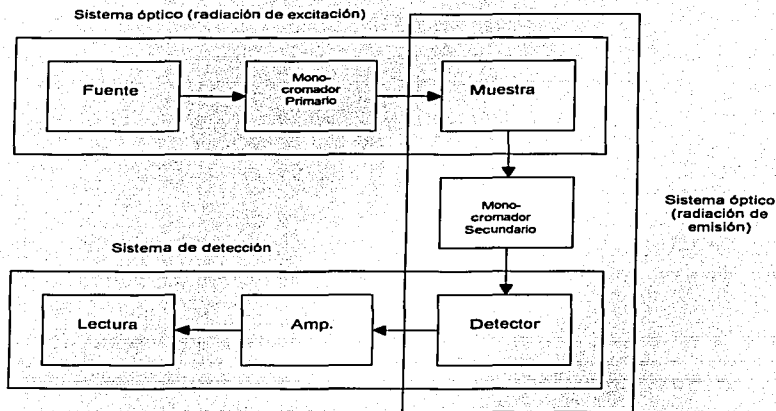


Figura 6*: Diagrama esquemático de los componentes ópticos de un fluorómetro

En primer lugar, la longitud de onda de excitación se escoge con ayuda de un monocromador primario, o de excitación, que se encuentra entre la fuente de radiación (por lo general una lámpara de xenón, halógeno, vapor de mercurio o filamento de tungsteno) y la muestra. Después de la excitación se detectan las longitudes de onda de emisión y sus intensidades relativas, para lo cual se utiliza un monocromador secundario, o de emisión, y un detector que se encuentran a un ángulo de 90° con respecto a la luz incidente. A la salida del fotodetector se amplifica la corriente que es proporcional a la energía de fluorescencia.

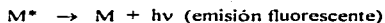
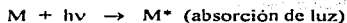
Se debe hacer énfasis en la sensibilidad que presentan las técnicas de fluorescencia, que es tres o cuatro órdenes de magnitud superior a la sensibilidad de técnicas espectrofotométricas. En espectrofotometría, la fuente y el detector están orientados a 180° .

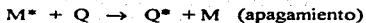
por lo que en todo momento existe una señal electrónica considerable. La radiación absorbida se mide **indirectamente**. En espectroscopia de fluorescencia la señal de luz se mide de una forma **directa**, es decir, no es necesario restar la radiación proveniente de la fuente a la radiación emitida por la muestra, porque el detector está orientado a 90° de la fuente y no la puede "ver". Es por esto que se dice que las mediciones de fluorescencia son mediciones **absolutas**. La señal de salida puede ser controlada ajustando la intensidad de la fuente, variando las rendijas del monocromador, o controlando la amplificación a la salida del detector.

2.15 Fuentes de Interferencia en Fluorescencia

La intensidad de fluorescencia de una muestra es sensible a los siguientes factores:

- Descomposición fotoquímica.** La luz ultravioleta incidente en la muestra puede causar cambios fotoquímicos o destrucción del compuesto fluorescente, provocando un decaimiento gradual en la intensidad de fluorescencia. Para evitar esta situación es necesario utilizar la mayor longitud de onda posible en la excitación del compuesto y exponer lo menos posible la muestra a la radiación incidente y a la luz UV del ambiente.
- Viscosidad.** La fluorescencia de un compuesto es mayor en medios más viscosos. En éstos, la energía de transferencia en una solución (procesos no fluorescentes) decrece por una reducción en los procesos colisionales.
- Apagamiento ("quenching").** Este es un proceso en el cual existe una competencia entre la emisión de radiación fluorescente y la formación de una especie no fluorescente a partir del fluoróforo y otra sustancia presente en el medio. Este fenómeno puede ser utilizado intencionalmente, para hacer evidente la interacción del fluoróforo con otra especie, o bien puede ser una interferencia no deseada en la medición. Se puede representar esquemáticamente de la siguiente manera:





Las causas de apagamiento son múltiples: entre ellas se puede mencionar un aumento en la temperatura del medio, la presencia de oxígeno en la solución (que disminuye la fluorescencia de algunos compuestos hasta en un 20% en medios acuosos), la presencia de alguna impureza de origen metálico, la pérdida de estructura en una proteína, o bien el apagamiento por concentraciones demasiado altas del fluoróforo, que implica interacciones no deseables del tipo ANS – ANS, cuando $Q = M$.

2.2 PROTEÍNAS, ESTADO DE GLÓBULO FUNDIDO Y ANS

2.21 Generalidades

Las proteínas son macromoléculas con diferentes niveles de estructura, a saber⁵:

- Estructura primaria: corresponde a la secuencia de aminoácidos que forman el “esqueleto” de cualquier proteína, a partir del extremo amino – terminal. Incluye la descripción de todos los enlaces peptídicos y puentes disulfuro que conectan a los residuos de aminoácidos en una cadena polipeptídica. Cada proteína presenta un número y disposición muy particular de residuos de aminoácidos y su estructura primaria determina cómo se pliega en un arreglo único tridimensional, que a su vez determina la función de la proteína⁵ (figura 7^{6,1}, figura 8^{6,2}).
- Estructura secundaria: especifica la conformación local de segmentos de la proteína, en los que la cadena adopta conformaciones regulares repetitivas, como las hélices α y las hojas β ; o no repetitivas, como las vueltas y giros de conformación definida.⁷ Algunos tipos de estructura secundaria son particularmente estables y ocurren con mucha frecuencia entre las proteínas. Los patrones que ilustran mejor

este hecho son las hélices α y las hojas β . La estructura secundaria se estabiliza por la formación de puentes de hidrógeno entre un protón unido a nitrógeno y un oxígeno de carbonilo pertenecientes a dos diferentes residuos de aminoácido en una secuencia de éstos⁵ (figura 7, figura 8).

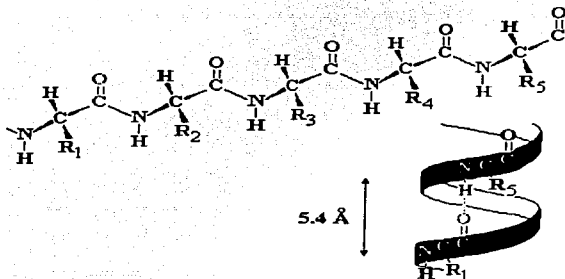


Figura 7⁵: Arriba: representación de la secuencia de aminoácidos que conforman la estructura primaria de una proteína; abajo: formación de puentes de hidrógeno en hélice alfa, para estabilizar la estructura secundaria.

- Estructura terciaria: es la descripción tridimensional completa de una proteína. Es estabilizada por interacciones del tipo van der Waals y por puentes salinos.⁵ (figura 8⁷). Recientemente se han utilizado técnicas de RMN de alta resolución para determinar la estructura de proteínas en disolución relativamente pequeñas. Se puede determinar totalmente mediante un análisis de difracción de rayos X a una proteína cristalizada.
- Estructura cuaternaria: cuando las proteínas están conformadas por varias subunidades polipeptídicas, su arreglo en el espacio recibe el nombre de estructura cuaternaria⁵ (figura 8).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

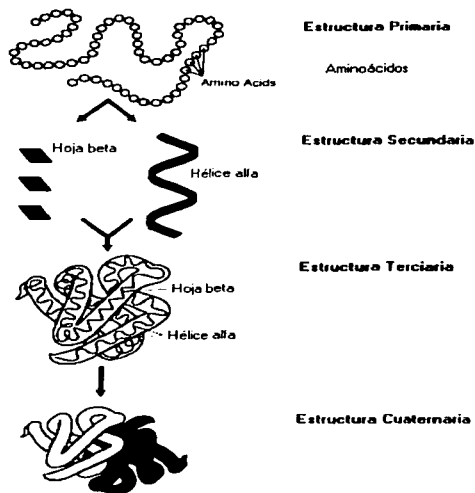


Figura 4-2: Representación esquemática de los niveles de estructura que presentan las proteínas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.22 El Estado de Glóbulo Fundido

Para ser biológicamente activas, las proteínas deben adoptar una estructura tridimensional única, que constituye su conformación nativa y funcional⁶. Debido a su gran número de aminoácidos, las conformaciones que podría adoptar una proteína diferentes a la conformación nativa son prácticamente infinitas. Sin embargo, en medios fisiológicos, muchas proteínas globulares se pliegan justo después de ser sintetizadas a su conformación adecuada, una entre un mar de posibilidades. De este hecho se infiere que existen rutas compuestas por estados conformacionales más accesibles que otros, que pueden dar lugar a

intermediarios cinética y termodinámicamente estables. La caracterización de estos intermediarios constituye evidencia directa sobre cuáles son estos mecanismos preferenciales en los procesos de plegamiento. Dentro de las técnicas que se pueden utilizar para caracterizar a estos intermediarios se encuentra el dicroísmo circular, la resonancia magnética nuclear y la fluorescencia, tanto intrínseca (aquella que se debe a la emisión en UV de los residuos de triptófano, tirosina y fenilalanina en el polipéptido) como extrínseca (la que se hace presente cuando se adicionan moléculas con propiedades fluorescentes, como el ANS, a la solución de proteína).

De los intermediarios hasta ahora descritos, el más conocido recibe el nombre de "glóbulo fundido", por su nombre en inglés, "molten globule". La existencia del estado de glóbulo fundido fue propuesta por primera vez al desnaturalizar dos tipos de α -lactalbúminas, bovina y humana respectivamente, en un medio ácido de Gu - HCl (cloruro de guanidinio)⁹. El mecanismo propuesto se puede representar de la forma siguiente:



donde "N" corresponde a la forma nativa de la proteína; "A" a la forma en medio parcialmente desnaturalizante (en el caso del experimento con lactalbúminas, medio ácido) y "U" a la forma totalmente desnaturalizada. Para una gran cantidad de proteínas globulares la forma "A", el glóbulo fundido se ha caracterizado con técnicas de dicroísmo circular (CD), resonancia magnética nuclear (RMN), difracción difusa de rayos X y cromatografía de exclusión en gel, entre otras^{10, 24, 25, 26}, haciendo evidente que esta especie presenta forma de glóbulo compacto y que conserva gran parte de su estructura secundaria, pero con estructura terciaria lentamente fluctuante.

El glóbulo fundido es una conformación con mucha estructura secundaria, sin interacciones terciarias, que expone los grupos aromáticos de la cadena polipeptídica al disolvente en el que se encuentra. Presenta un alto grado de compactación, sin empaquetamiento rígido en el interior de la molécula, y un incremento en las fluctuaciones de las cadenas laterales⁹.

La evidencia concluyente para la existencia del estado de glóbulo fundido se presentó en 1990¹⁰, cuando Pitysin et. al. realizaron diversos experimentos con un gran número de proteínas globulares, entre ellas las lactalbúminas originales, anhidrasa carbónica, β - lactamasa y fosfoglicerato cinasa y evidenciaron la presencia de este tipo de intermediarios en el proceso de desnaturalización.

2.23 El ANS como Prueba Fluorescente

El ANS (1-anilino-8-sulfonato naftaleno) es un compuesto aromático que se ha utilizado sistemáticamente en la caracterización de estructura de cierto tipo de proteínas. Esta especie química presenta una fluorescencia débil en disolución acuosa, sin embargo, su fluorescencia aumenta considerablemente en presencia de ciertas proteínas^{1, 2, 4, 10, 11}.

El ANS se ha utilizado, entre otras aplicaciones, para la detección y caracterización de los estados de glóbulo fundido. Stryer realizó un trabajo importante de caracterización de las propiedades fluorescentes del ANS, posterior a Weber¹, en el que encontró que el ANS se une de forma estequiométrica (uno a uno) y específica tanto a la apomioglobina como a la apohemoglobina, aunque no lo hace con la mioglobina y la hemoglobina en estado nativo, debido a que en estas últimas el sitio que se uniría con el ANS se encuentra ocupado por un grupo hemo. La interacción del ANS con las dos primeras apoproteínas se manifiesta como un incremento considerable en la intensidad de fluorescencia del complejo fluoróforo – proteína, con respecto a la que se detecta en agua (eficiencia cuántica de 0.004 en agua, y hasta 0.98 en apomioglobina), además de un corrimiento del máximo a mayor energía (menor longitud de onda). Con ayuda de técnicas de dispersión óptica rotatoria y polarización de fluorescencia, así como con estudios hidrodinámicos, se llegó a la conclusión de que, aunque la apomioglobina es ligeramente más asimétrica y voluminosa que la mioglobina, también presenta estructura compacta, que se manifiesta en el complejo formado por apomioglobina – ANS. Además, el complejo apomioglobina – ANS, que presenta una alta eficiencia cuántica en fluorescencia, pierde esta propiedad al adicionar cantidades estequiométricas de hemin, que desplazan al ANS en su interacción con la apoproteína, y existe transferencia de energía entre los residuos aromáticos (tirosinas y

triptófano) y el ANS cuando este último se encuentra formando el complejo. Se debe preservar gran parte de la conformación de la mioglobina en el complejo ANS – apomioglobina, ya que tanto el ANS como la hemina se unen en el mismo sitio en la apoproteína. Estos resultados se interpretaron de la manera siguiente: el ANS interactúa con las regiones hidrofóbicas expuestas al disolvente en la apomioglobina y en la aopohemoglobina, aumentando considerablemente su intensidad de fluorescencia.

Además de los experimentos descritos anteriormente, Stryer también determinó la intensidad de fluorescencia del ANS en diferentes medios orgánicos, específicamente en alcoholes a temperatura ambiente². La forma en que asigna intensidades de fluorescencia relativas al ANS en los diferentes alcoholes no se describe en el texto original del artículo, sin embargo, se reportan los siguientes valores para la eficiencia cuántica absoluta del compuesto, que aumenta de 0.004 en agua, a 0.15 en etilglicol, 0.22 en metanol, 0.37 en etanol, 0.46 en n – propanol, 0.56 en n – butanol y 0.63 en n – octanol. A continuación se muestra la gráfica del artículo original:

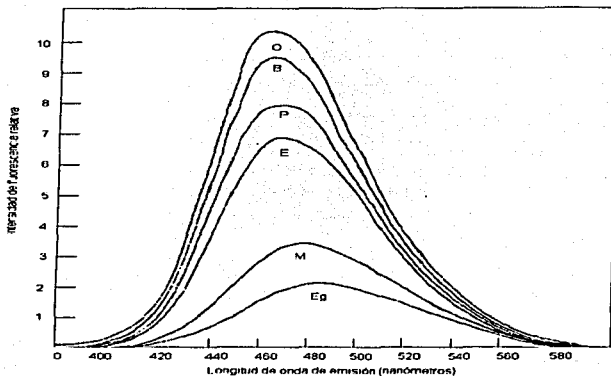


Figura 9^a: Espectro de emisión de fluorescencia, soluciones 10^{-5} M de ANS en etilglicol (E β), metanol (M), etanol (E), n-propanol (P), n-butanol (B) y octanol (O).

Como se puede ver en la figura 9, el incremento en la intensidad de fluorescencia del ANS para los alcoholes utilizados también está acompañado de un corrimiento hacia mayores energías en la longitud de onda del máximo de emisión del espectro. La explicación tradicional para este fenómeno consiste en lo siguiente: en el estado electrónicamente excitado, el ANS presenta un incremento en su momento dipolar con respecto al estado basal. Si el medio disolvente es polar, las moléculas de éste se orientarán con respecto al fluoróforo excitado, por lo cual ocurrirá una transferencia de energía entre el ANS y su entorno (energía no radiante), antes de que se dé la emisión fluorescente. En un medio no polar, se podrá emitir la mayor parte de la energía de excitación en forma de fotón. Es por esta razón que la intensidad de fluorescencia, así como la energía en el máximo de emisión, son mayores en disolventes poco polares, con respecto a disolventes más polares. A partir de esta última observación experimental, Stryer propuso que el ANS es "sensible" a las

regiones hidrofóbicas parcialmente expuestas al disolvente, tanto en apomiglobina como en apohemoglobina, y que es posible detectar estas regiones mediante la técnica de emisión en fluorescencia. Aunque Stryer utilizó originalmente al ANS para caracterizar proteínas nativas, los ejemplos de trabajos en los que dicha molécula se ha empleado en el estudio de los procesos de plegamiento de las proteínas (detección del intermediario de glóbulo fundido) son múltiples^{11 - 16}. Un ejemplo interesante lo constituye el hecho de que en un medio con proteína, la intensidad de fluorescencia del ANS aumente a ciertas concentraciones del agente desnaturante (típicamente urea o cloruro de guanidinio); sin embargo en ausencia de este último, o bien a altas concentraciones de desnaturante, es decir, con la proteína en su estado nativo²³ (figura 10), no se detecta intensidad de fluorescencia significativa. Esto se ha interpretado como evidencia de la existencia de un estado intermediario, esto es, diferente al estado nativo o desnaturado²³, en la ruta de plegamiento de ciertas proteínas que, además, deben exponer sus regiones hidrofóbicas al medio acuoso en un proceso de desnaturación¹.

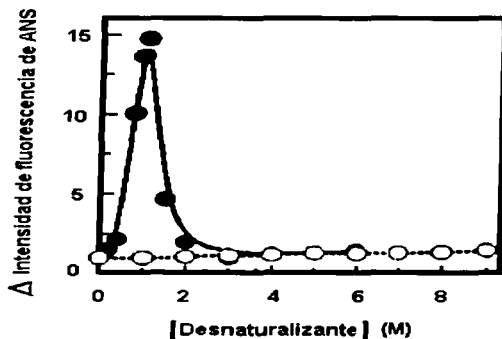


Figura 10²³: Unión de ANS a TIM, después de la desnaturación con cloruro de guanidinio (puntos rellenos), y con urea (puntos sin relleno).

Tomada y modificada de referencia 23.

III. DESARROLLO

III. DESARROLLO

3.1 Preliminar

Como se dijo anteriormente, en fluorescencia independiente del tiempo se pueden medir dos tipos de espectros: de excitación y de emisión. Para investigar el comportamiento del ANS en diferentes disolventes se escogió la técnica de emisión debido a que ésta es mucho más empleada en los estudios de fluorescencia de proteínas (tanto intrínseca como extrínseca) que la técnica de excitación.

Con el propósito de encontrar una longitud de onda de excitación adecuada para el ANS en fluorescencia, se corrió el espectro de absorción de UV/visible de éste tanto en agua como en n-decanol, para concentraciones de 5 y 100 μM . De acuerdo con Stryer² (figura 8), la longitud de onda de máxima emisión del sistema ANS/disolvente decrece en el siguiente orden: agua, metanol, etanol, n-butanol y n-octanol. Como se decidió excitar a la misma longitud todos los sistemas fue necesario elegir una λ que fuese adecuada para todos ellos: el intervalo entre los máximos de emisión de ANS en agua y en decanol contiene a todos los máximos de los sistemas n-alcoholes (C_1 a C_9) + ANS, por lo que se seleccionó la longitud de onda de excitación única para todos los sistemas a partir de estos espectros de absorción. La longitud de onda seleccionada fue de 360 nm. Es necesario mencionar que en el momento en que se escogió la λ de excitación para los sistemas de alcohol + ANS se consideró al n-decanol dentro de los disolventes a estudiar. Sin embargo, debido a que el n-decanol es muy viscoso y la solubilidad del ANS en éste es pequeña, la reproducibilidad para estos experimentos no fue satisfactoria, por lo que se decidió no incluirlo en los resultados reportados en este trabajo.

Para determinar los espectros de emisión en fluorescencia se excitó a los sistemas agua/ANS y n-decanol/ANS con luz UV de 360 nm. Se determinó el paso de rejilla (emisión y excitación respectivamente) necesario para detectar intensidad de radiación electromagnética que correspondieran a concentraciones de ANS que fueran de 5 a 100 μM

(5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 70 y 100 μM). Las dimensiones óptimas de las rejillas fueron de 0.5 mm tanto en excitación como en emisión. El objetivo de esta prueba consistió en seleccionar un único paso de rejilla que se utilizaría posteriormente para medir todos los sistemas.

Debido a que el ANS se hidrata fácilmente, se determinó el contenido real de agua de la muestra. A continuación se presentan los resultados:

Medición	% agua (peso)
1	13.4344
2	13.6724
3	13.5171
4	13.9237
5	13.7552
6	13.6653
7	14.3802
8	13.8853
Promedio	13.7792
Dev. Est.	0.2942
Peso Fórmula	310.4894 g/mol
ANS (nominal)	
Peso Fórmula	353.2724 g/mol
ANS (real)	

Tabla 0: Determinación de contenido de agua en ANS por técnica de Karl Fischer

Posteriormente se tuvo cuidado en guardar el reactivo en un frasco ámbar cerrado y sellado, a temperatura ambiente.

3.2 Material y Métodos

Se compró el reactivo 1-anilino-8-sulfonato naftaleno a Sigma (98% pureza, 1.5 mol $\text{H}_2\text{O}/\text{mol}$ ANS) y se utilizó sin purificación adicional. Se consideró el peso fórmula real determinado en la titulación con hidranal (Aldrich) en un aparato de Karl Fischer. Todos

los disolventes grado HPLC, se utilizaron sin purificación adicional y se compraron a Aldrich, excepto el metanol, que se compró a Baker.

Para realizar las mediciones de absorbancia se utilizó un espectrofotómetro Beckman Du 7500. Las mediciones de fluorescencia se hicieron en un espectrofluorómetro de cuenta de fotones marca ISS (modelo PC1) con lámpara de xenón.

Se prepararon mezclas binarias de ANS en cada uno de los siguientes medios: n-nonanol, n-octanol, n-heptanol, n-hexanol, n-pentanol, n-butanol, n-propanol, etanol, metanol, 3-metil-1-butanol, 2-metil-1-butanol, 3-pentanol y 2-metil-2-butanol. Para todos estos alcoholes, se prepararon disoluciones en concentración de 5, 10, 20, 30, 40, 50 y 60 μM respectivamente, mediante diluciones sucesivas de una solución madre en cada sistema, debido a la incapacidad de pesar directamente cantidades tan pequeñas de ANS. Se debe aclarar que no se utilizaron concentraciones superiores a 60 μM debido a que para los disolventes más viscosos se presentaron problemas de solubilidad. En todos los casos, se pesaron de 0.0020 a 0.0011 g de ANS y se disolvieron en 10 mL del disolvente correspondiente. Se tomaron alícuotas adecuadas de las soluciones madre y se llevaron a un volumen final de 5 mL. La incertidumbre de pesado fue de ± 0.0002 g y la incertidumbre en el volumen fue de $\pm 0.5\%$ de la capacidad del matraz aforado. Para dispensar las alícuotas, se utilizaron pipetas automáticas marca Gilson con capacidad de 1 y 0.2 mL, cuya incertidumbre nominal fue de ± 0.002 y ± 0.0002 respectivamente. En todos los casos se procuró tomar el espectro de emisión en fluorescencia en un periodo que no superara las dos horas después de preparar las disoluciones.

Las mezclas ternarias de ANS, n-heptano, y n-pentanol se elaboraron de la siguiente forma: los disolventes de diferente composición (desde 0 hasta 0.8 fracción mol de n-heptano en n-pentanol) se prepararon pesando proporciones adecuadas de ambos reactivos. A continuación se obtuvieron las muestras de ANS como se habría hecho para un disolvente puro, es decir, diluyendo una solución madre y llevando a la concentración por volumen deseada, que en este caso fue de 20 μM para cada uno de los sistemas. En este caso, tanto

los disolventes como las mezclas se mantuvieron a 0 °C hasta momentos antes de medir, para evitar la evaporación del n-heptano.

Se tomó el espectro de emisión de fluorescencia de cada una de las muestras, tanto de las binarias como de las ternarias. En todos los casos se utilizó como blanco el disolvente correspondiente sin ANS, en las mismas condiciones en que se midió la muestra problema, y se restó al espectro original de cada muestra. Las condiciones de medida para todos los casos fueron de 14 amp en intensidad de lámpara (arco de xenón), 0.5 mm de paso de rejilla en excitación y emisión, excitación en 360 nm y el espectro de emisión se midió de 400 nm a 600 nm, con un barrido de $\Delta\lambda = 1$ nm, a una temperatura de 25 °C. Se utilizó una celda de cuarzo (Starna, Spectrosil TM) con un paso de luz de 1 cm de forma rectangular, con tapón hermético, de 3 mL de capacidad. Algunas de las mezclas binarias de alcoholes lineales + ANS se midieron más de una vez. Esto permitió estimar una incertidumbre en la medición, asociada tanto a la preparación de las disoluciones como a la medición de la intensidad de fluorescencia. Es importante mencionar que la muestra se mantuvo tapada herméticamente durante el transcurso de toda la medición. Debido a que la fluorescencia es una propiedad muy sensible a la concentración del fluoróforo, cualquier variación en la composición del sistema (debido principalmente a evaporación del disolvente) alteraría la medición.

Los espectros de RMN se corrieron con una resolución de 300 MHz, en dimetil sulfóxido deuterado, para concentraciones de ANS desde 20 mg/0.7 mL, hasta 5 mg/0.7 mL (8×10^4 a 1×10^4 μ M respectivamente). No fue posible utilizar concentraciones menores de ANS debido al incremento significativo en los tiempos de adquisición del aparato de RMN. Para estos experimentos se secó la muestra de 1,8-ANS en un cañón de tolueno a presión reducida, durante 12 horas. Esto se hizo con el fin de eliminar la mayor cantidad de agua posible.

3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.31 Mezclas Binarias: n-Alcohol + ANS

Para las mezclas binarias de n-alcohol + ANS (5 a 60 μM) se determinó la intensidad de fluorescencia de máxima emisión en cada uno de los sistemas. Las mediciones se realizaron por duplicado para los disolventes metanol, etanol, n-butanol y n-octanol, y por triplicado para n-hexanol. Los sistemas en propanol, n-pentanol y n-heptanol se midieron una sola vez. A partir de las repeticiones fue posible asignar una incertidumbre en la medición de intensidad de fluorescencia. Para los sistemas que se midieron más de una vez, la incertidumbre se estimó como la mayor diferencia en las intensidades de fluorescencia máximas de los espectros. Para los tres sistemas sin repeticiones, la incertidumbre se asignó como la incertidumbre en el alcohol C_{n+1} . Por ejemplo, la incertidumbre asignada a n-heptanol fue la misma que la que se calculó para n-octanol. En el caso n-nonanol, la incertidumbre fue la misma que para n-octanol. Los resultados que se muestran a continuación son los valores que se obtuvieron para las mejores determinaciones en los casos en que se cuenta con repeticiones; las "mejores determinaciones" son aquellas que presentaron un valor de R^2 más cercano a uno cuando se hizo la regresión lineal para obtener la ecuación de la recta "intensidad de fluorescencia como función de la concentración de ANS".

Compuesto	metanol	etanol	n propanol
IF 5 μM	19888	47332	63912
IF 10 μM	43603	100279	119527
IF 20 μM	72562	188191	218647
IF 30 μM	107399	251749	273885
IF 40 μM	132916	300790	306408
IF 50 μM	157373	340648	338511
IF 60 μM	159149	377343	357700
λ max (nm)	481	471	469

Compuesto	n butanol	n pentanol	n hexanol
IF 5 μM	83582	68241	55724
IF 10 μM	125770	126947	114333
IF 20 μM	228426	234802	191087
IF 30 μM	313111	303838	255859
IF 40 μM	373925	352840	308341
IF 50 μM	422358	384050	354884
IF 60 μM	454853	402111	390463
λ_{max} (nm)	469	467	469

Compuesto	n heptanol	n octanol	n nonanol
IF 5 μM	71336	66666	68022
IF 10 μM	123131	123704	138222
IF 20 μM	220527	217217	257760
IF 30 μM	286724	290713	332091
IF 40 μM	363400	350586	436770
IF 50 μM	409891	393778	436968
IF 60 μM	465663	421319	545119
λ_{max} (nm)	469	470	469

Tabla 11: Intensidades de fluorescencia (unidades arbitrarias) en el máximo de emisión para sistemas de ANS + n-alcohol

Para el análisis de intensidad de fluorescencia como función del número de carbonos (figura 13) las barras de incertidumbre se estimaron también de la forma como se explicó anteriormente. Se debe hacer énfasis en que estas estimaciones de la incertidumbre corresponden en realidad a una "incertidumbre mínima" calculada a partir de la reproducibilidad en los experimentos, por lo que el error verdadero asociado a la medición de intensidad de fluorescencia debe ser mayor.

Los valores numéricos de las intensidades de fluorescencia se graficaron como función de la concentración de ANS, para detectar la zona en donde la dependencia era lineal (figura 11). La intensidad de fluorescencia (IF) en unidades arbitrarias (ua) corresponde a una misma λ , que se especifica en la tabla 1.

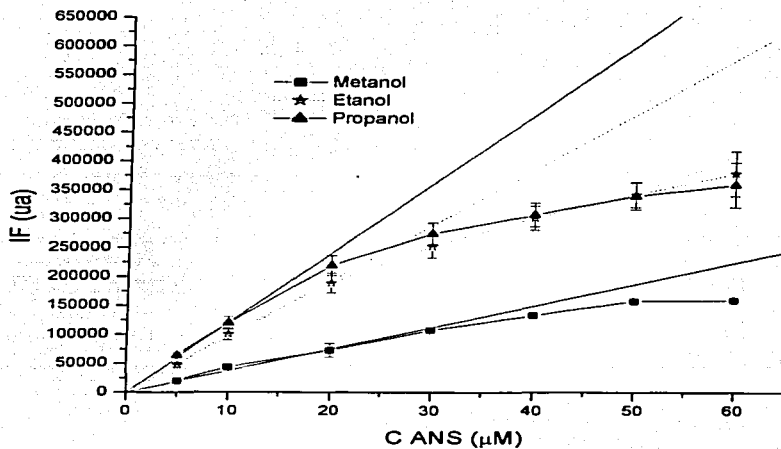


Figure 11: Intensidad de fluorescencia del ANS en los medios metanol, etanol y propanol

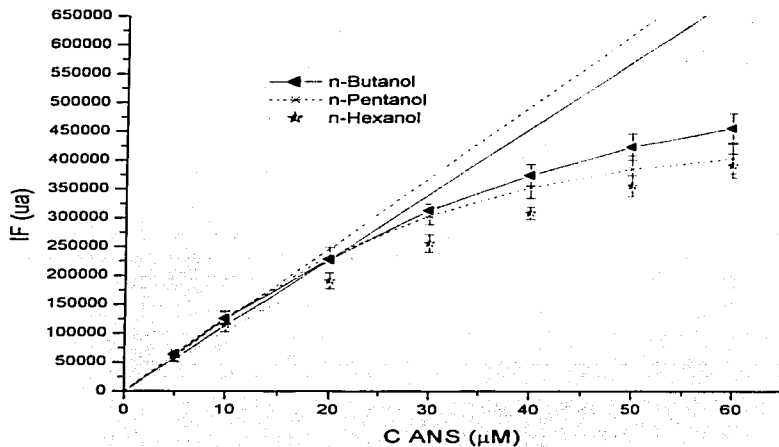


Figura 12: Intensidad de fluorescencia del ANS en los medios n-butanol, n-pentanol y n-hexanol

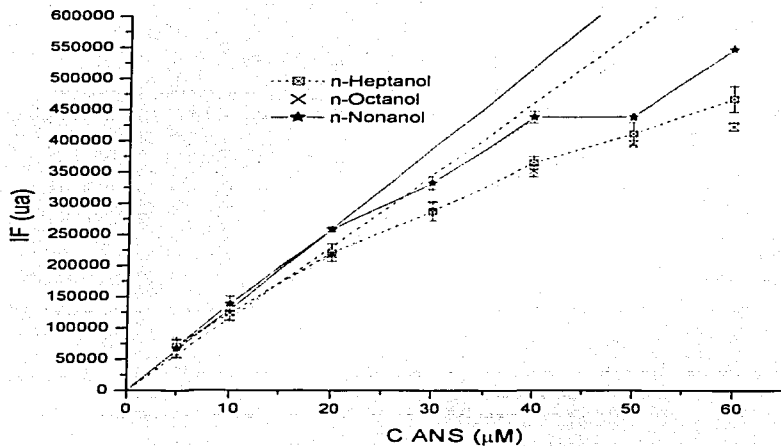


Figura 13: Intensidad de fluorescencia del ANS en los medios n-heptanol, n-octanol y n-nonanol

Se hizo la regresión lineal de cada serie de puntos, forzando el paso por cero, y se trazaron las rectas correspondientes. Para calcular dicha recta se consideró la zona de concentraciones en donde se cumple la ley de Lambert y Beer

Sistema	No. de puntos considerados	Pendiente
Metanol	6	$3712 \pm 7.5 \text{ u.a./}\mu\text{M}$
Etanol	3	$9583 \pm 496 \text{ u.a./}\mu\text{M}$
n-Propanol	3	$11979 \pm 508 \text{ u.a./}\mu\text{M}$
n-Butanol	4	$11367 \pm 112 \text{ u.a./}\mu\text{M}$
n-Pentanol	3	$12318 \pm 514 \text{ u.a./}\mu\text{M}$
n-Hexanol	3	$10334 \pm 515 \text{ u.a./}\mu\text{M}$
n-Heptanol	3	$11480 \pm 589 \text{ u.a./}\mu\text{M}$
n-Octanol	3	$10901 \pm 171 \text{ u.a./}\mu\text{M}$
n-Nonanol	3	$12910 \pm 171 \text{ u.a./}\mu\text{M}$

Tabla 2: Intensidad de fluorescencia de ANS en n-alcoholes como función de la concentración de ANS, regresiones lineales

En las figuras 11, 12 y 13 es claro que la intensidad de fluorescencia aumenta de forma lineal a bajas concentraciones de ANS (hasta aproximadamente 20-30 μM); sin embargo a concentraciones más elevadas de ANS el cambio en la intensidad de fluorescencia como función de la concentración deja de ser lineal. Esta última región se asocia con el fenómeno de apagamiento, ya que a estas concentraciones de fluoróforo las interacciones entre las mismas moléculas de ANS se vuelven mucho más frecuentes y el regreso al estado basal de las moléculas excitadas se produce a través de procesos no fluorescentes. Para la zona lineal, a una concentración constante de ANS, éste fluoresce más intensamente en n-nonanol, y menos intensamente en metanol. En la figura 14 se graficó la intensidad de fluorescencia como función del número de carbonos del medio, para una concentración 20 μM de ANS, ya que para este valor de concentración se cumple la ley de Lambert y Beer. Sin embargo, no es evidente, como reportó Stryer², que a mayor tamaño de la cadena hidrocarbonada en el alcohol, es decir a mayor "hidrofobicidad" del medio, la intensidad de fluorescencia del ANS aumente. La fluorescencia del ANS en etanol es tres veces el valor que presenta en metanol. Sin embargo, de propanol a n-nonanol la diferencia es menos de un tercio, sin que sea evidente una relación con el tamaño de la cadena, ya que si fuera así,

el ANS presentaría menor IF en n-propanol que en n-butanol, y por supuesto, menor IF que en hexanol.

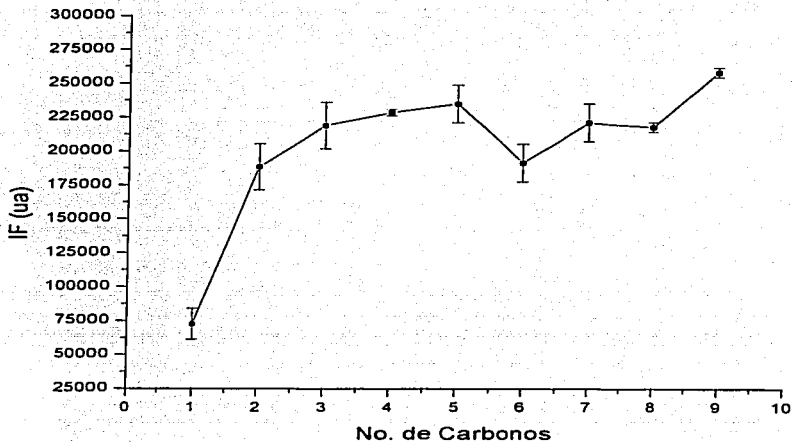


Figura 14: Variación de la intensidad de fluorescencia como función del número de carbonos en la cadena lineal del alcohol, para una concentración de ANS de 20 μ M. Las barras de error son estimación del "error mínimo" asociado con la reproducibilidad experimental.

En la sección 3.31 se explicó cómo se calcularon las barras de error de la figura 14. Sin embargo, el error real debe ser mayor, por lo cual se puede decir que la intensidad de fluorescencia no cambia a partir de dos carbonos en la cadena lineal del alcohol.

Para apreciar mejor la diferencia entre los datos experimentales obtenidos y los datos de Stryer², se graficaron ambas determinaciones como función del número de carbonos. Debido a que Stryer utiliza intensidades de fluorescencia relativas, los valores de intensidad de fluorescencia absolutos obtenidos en este trabajo para todos los n-alcoholes se dividieron entre el valor mayor (la IF del ANS en n-nonanol para los datos del presente trabajo, la IF del ANS para n-octanol para el trabajo de Stryer). La figura comparativa se muestra a continuación:

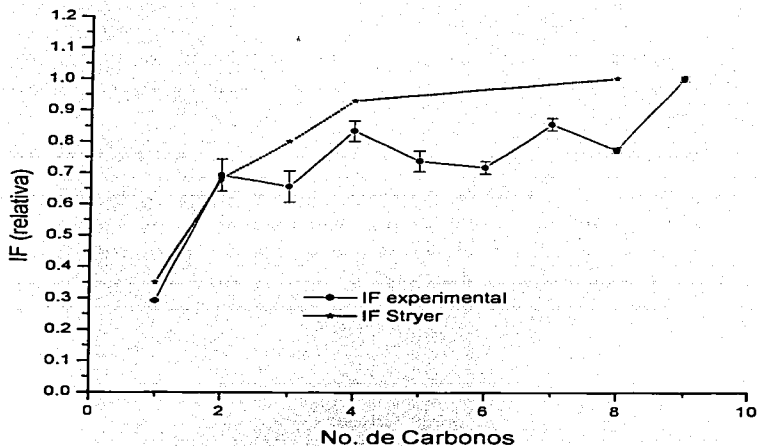


Figura 15: Variación de la intensidad de fluorescencia como función del número de carbonos en la cadena lineal del alcohol. Los datos de Stryer se reportan a una concentración de 100 μM de ANS, mientras que los datos obtenidos experimentalmente están a 60 μM de ANS.

En la figura 15, considerando el intervalo de incertidumbre en los datos obtenidos experimentalmente, y aún considerando los datos del trabajo original de Stryer, es notable que la intensidad de fluorescencia no varía sustancialmente con el número de carbonos en la cadena del alcohol lineal, a partir de tres carbonos, en la zona de concentraciones indicada. Se debe tomar con reserva esta comparación; como se dijo anteriormente, se grafica para concentraciones de ANS donde no se cumple la ley de Lambert y Beer.

La independencia de la intensidad de fluorescencia con el tamaño del n-alcohol ($n > 2$), mostrada en la figura 14, puede explorarse usando otras propiedades físicas de los disolventes, tales como la constante dieléctrica (ϵ), el índice de refracción (η) y la polarizabilidad del medio, que se definió en los antecedentes de este trabajo. Es sabido que la fluorescencia también depende de la variable de polarizabilidad⁴. La tabla 3 muestra los valores de estas propiedades físicas²² para los n-alcoholes utilizados. La relación del cambio en la intensidad de fluorescencia con la polarizabilidad del medio se puede apreciar en la figura 14. Los valores numéricos para el cambio en la intensidad de fluorescencia como función de la concentración de ANS corresponden a las pendientes reportadas en la tabla 2.

Sustancia	(constante dieléctrica)	(índice de refracción)	Polarizabilidad (adimensional) M
Metanol	32.6300	1.3265	0.3093
Etanol	24.3000	1.3594	0.2892
n-propanol	20.1000	1.3837	0.2742
n-butanol	17.1000	1.3973	0.2632
n-pentanol	13.9000	1.4079	0.2501
n-hexanol	13.3000	1.4161	0.2450
n-heptanol	12.1000	1.4225	0.2377
n-octanol	10.3400	1.4276	0.2263
n-nonanol	9.2000	1.4319	0.2168

Tabla 3: constante dieléctrica, índice de refracción y polarizabilidad de los disolventes n-alcoholes

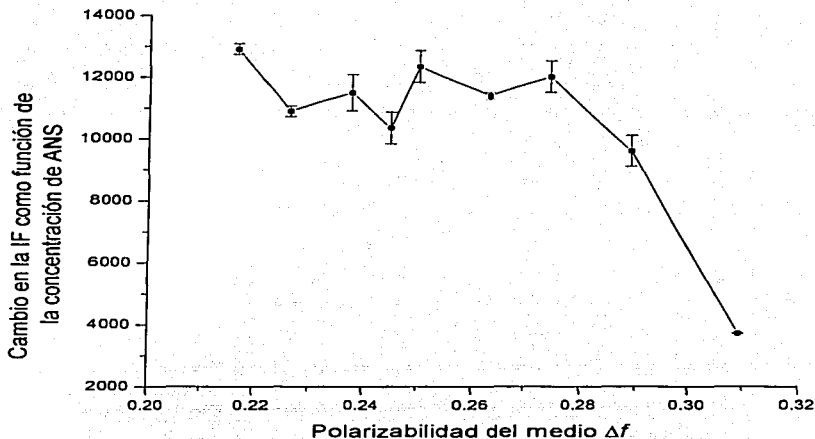


Figura 16: Cambio en la intensidad de fluorescencia (zona Lambert - Beer) para los medios de n-alcoholes en función de su polarizabilidad. Las barras de incertidumbre corresponden al error calculado en la pendiente, al realizar la regresión lineal.

De los resultados experimentales anteriores se concluye que la fluorescencia del ANS no depende del medio en que se encuentra, cuando se trata de alcoholes lineales líquidos de tres carbonos o más. Las figuras 13 y 14 respaldan la aseveración anterior; la polarizabilidad del medio, que se usa de forma frecuente para correlacionar la dependencia de la intensidad de fluorescencia con la "facilidad" que tienen los electrones para reagruparse alrededor del estado excitado del fluoróforo, no hace una diferencia en la emisión del ANS para medios alcohólicos de tres carbonos o más. Los resultados obtenidos en esta sección no están de acuerdo con los reportados por Stryer². A este respecto se debe

mencionar que Stryer trabajó con concentraciones de ANS superiores a las concentraciones donde se cumple con la ley de Lambert y Beer, es decir, donde se presentan fenómenos de apagamiento. Es posible que la tendencia en fluorescencia que él observó, al aumentar el número de carbonos en la cadena lineal del alcohol, se deba a este hecho. En fluorescencia es común utilizar una celda de paso de luz menor a 1 cm si se quiere contrarrestar el apagamiento. Sin embargo, Stryer no menciona si en sus experimentos se consideró o no esta variante experimental. Para explorar si la diferencia entre los resultados de Stryer y los reportados aquí podían deberse o no al hecho de que la concentración de ANS que utilizó Stryer fue de 100 μM , se ajustó cada serie de datos experimentales para los diferentes medios de n-alcohol a una ecuación de la forma³:

$$IF = a(1 - e^{bc})$$

donde IF es la intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias, C es la concentración de ANS (μM) y a , b son los parámetros del ajuste. Con estas ecuaciones se extrapoló el valor de la intensidad de fluorescencia para una concentración de 100 μM , con el fin de comparar con los datos obtenidos por Stryer. Los resultados se presentan a continuación:

Disolvente	a	b	IF a 100 μM
Metanol	23895 \pm 27242	-0.01970 \pm 0.00355	20563
Etanol	507329 \pm 15903	-0.02256 \pm 0.00119	454177
n-Propanol	398808 \pm 8850	-0.03780 \pm 0.00187	389706
n-Butanol	598065 \pm 13440	-0.02428 \pm 0.00095	545308
n-Pentanol	468290 \pm 12383	-0.03407 \pm 0.00189	452771
n-Hexanol	517954 \pm 15948	-0.02305 \pm 0.0012	466284
n-Heptanol	659633 \pm 37362	-0.01989 \pm 0.00178	569374
n-Octanol	533448 \pm 6983	-0.02642 \pm 0.00063	495457
n-Nonanol	746338 \pm 108636	-0.02030 \pm 0.00472	648317

Tabla 4: Parámetros de ajuste para curvas intensidad de fluorescencia como función de la concentración de ANS para los diferentes medios: extrapolación a concentraciones de 100 μM

La ecuación propuesta representa un buen ajuste para los valores experimentales obtenidos. En seguida se incluye la gráfica de algunos valores experimentales y de las curvas de ajuste.

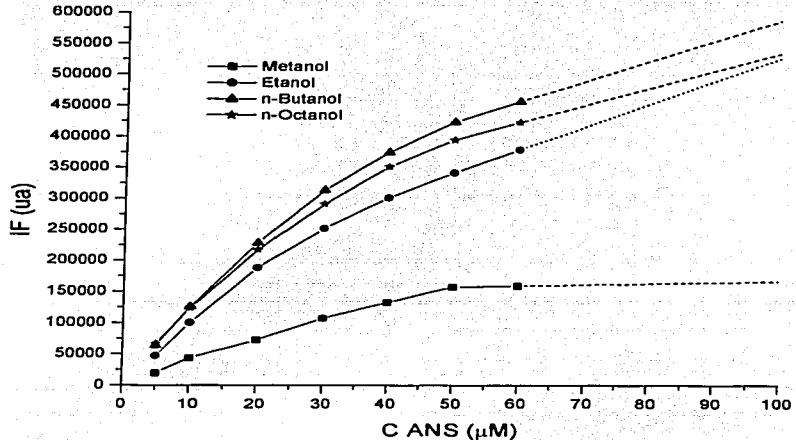


Figura 17: Ajuste exponencial de curvas de intensidad de fluorescencia como función de la concentración de ANS: las líneas continuas unen los puntos experimentales obtenidos; las líneas punteadas representan la ecuación del ajuste. En todos los casos, el coeficiente de correlación R^2 fue superior a 0.99

La tabla 4 y la figura 17 ponen de manifiesto que aún ajustando los valores experimentales obtenidos a una curva adecuada y extrapolando para la concentración empleada por Stryer en sus determinaciones ($100 \mu\text{M}$), no se obtiene la tendencia reportada en el artículo

original. En este caso, se predice una intensidad de fluorescencia menor para ANS en *n*-octanol que en *n*-butanol. Considerando los resultados experimentales de esta sección, para la zona de concentraciones donde se cumple la ley de Lambert y Beer se concluye que la intensidad de fluorescencia del ANS en *n*-alcoholes no depende de la cadena lineal hidrocarbonada del alcohol cuando la cadena consiste de tres o más carbonos. Es probable que la interacción más importante del ANS con el alcohol, aquella que determina su intensidad de fluorescencia, sea a través del grupo hidroxilo del alcohol. Sin embargo, el hecho de que al cambiar de un medio de metanol a uno de *n*-propanol se observe un aumento importante en la intensidad de fluorescencia del ANS puede implicar que los grupos hidrocarbonados en la vecindad inmediata del hidroxilo ($-\text{CH}_3$ y $-\text{CH}_2-$) también influyan en la intensidad de fluorescencia. Para profundizar sobre esta posibilidad se realizaron experimentos con isómeros estructurales de un *n*-alcohol que se describen y discuten a continuación.

3.32 Mezclas binarias: Isómeros de *n*-Pentanol + ANS

Se prepararon disoluciones de ANS en isómeros estructurales del *n*-pentanol: 3-metil-1-butanol, 2-metil-1-butanol, 3-pentanol y 2-metil-2-butanol, cuyas estructuras se muestran más adelante, en la figura 19), y se midieron los espectros de $IF_{\lambda, \text{max}}$ (en unidades arbitrarias) a las mismas concentraciones que en el caso de los *n*-alcoholes, es decir de 5 a 60 μM . se determinó la intensidad de fluorescencia de máxima emisión en cada uno de los sistemas. Estas determinaciones se realizaron una sola vez para cada medio. Los resultados gráficos y los valores numéricos correspondientes se muestran a continuación

Compuesto	3 metil 1 butanol	2 metil 1 butanol	2 metil 2 butanol	3 pentanol	n pentanol
IF 5 μM	29873	41360	35669	42674	66241
IF 10 μM	78561	80359	70212	85917	126947
IF 20 μM	160551	143722	121625	160083	234802
IF 30 μM	196169	206826	169536	223010	303838
IF 40 μM	226839	242781	188834	279176	352840
IF 50 μM	237419	271642	234553	308045	384050
IF 60 μM	269612	281516	260086	344443	402111
λ max (nm)	469	467	468	468	467

Tabla 5: Intensidades de fluorescencia en el máximo de emisión para sistemas de ANS + isómeros del n-pentanol

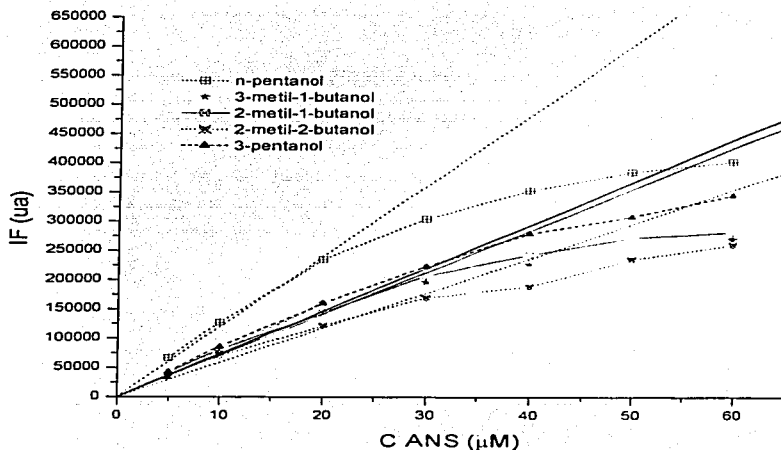


Figura 10: Intensidad de fluorescencia del ANS en los medios n-pentanol, 3-metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol, 2-metil-2-butanol y 3-pentanol

Se realizó el mismo análisis que para los n-alcoholes. Se hizo la regresión lineal de cada serie de puntos, forzando el paso por cero, y se trazaron las rectas correspondientes. Para calcular dicha recta se consideró la zona de concentraciones en donde se cumple la ley de Lambert y Beer. Para fines de claridad, se tabularon los valores de las rectas como sigue, ordenando los sistemas de mayor a menor pendiente, incluyendo los valores para n-pentanol, con el fin de compararlos con los de sus isómeros estructurales.

Sistema	No. de puntos considerados	Pendiente
n-pentanol	3	11994 ± 330 u.a./μM
3-metil-1-butanol	3	7897 ± 308 u.a./μM
3-pentanol	5	7316 ± 220 u.a./μM
2-metil-1-butanol	4	7080 ± 195 u.a./μM
2-metil-2-butanol	4	5894 ± 233 u.a./μM

Tabla 6: Intensidad de fluorescencia de ANS en isómeros del n-pentanol como función de la concentración de ANS, regresiones lineales

Al igual que en el caso de los n-alcoholes, de la figura 18 es claro que la intensidad de fluorescencia aumenta de forma lineal a bajas concentraciones de ANS (hasta aproximadamente 20-30 μM) para luego disminuir su pendiente en la zona de apagamiento. Esta zona de concentraciones es la misma que se encontró para los medios de n-alcoholes. A continuación se presentan las estructuras químicas desarrolladas de los isómeros del n-pentanol utilizados:

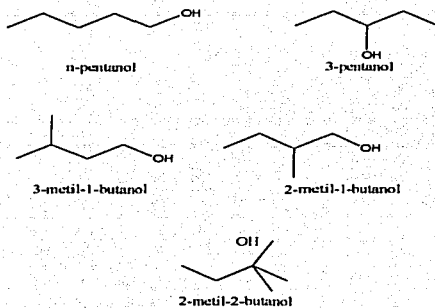


Figura 19: estructura química de los isómeros del n-pentanol utilizados como medios para medir la intensidad de fluorescencia del ANS

Como puede apreciarse de la tabla 6, la pendiente de la recta intensidad de fluorescencia como función de la concentración de ANS es mayor para el n-pentanol. Para los isoalcoholes 3-pentanol, 2-metil-butanol y 2-metil-2-butanol la pendiente es la misma si se considera la incertidumbre obtenida en el ajuste y es ligeramente mayor para el 3-metil-1-butanol. Las pendientes para todos los isoalcoholes son menores incluso que la pendiente para etanol, que es de $9\,583 \pm 170$ u. a. μM^{-1} . A pesar de que los isómeros estructurales del n-pentanol contienen el mismo número de carbonos en la cadena hidrocarbonada, la intensidad de fluorescencia del ANS en estos medios no es ni siquiera cercana a la que presenta en el n-pentanol, por lo que se propone que existe una evidente influencia de la geometría molecular. Esta afirmación se ilustra en la figura que se presenta a continuación:

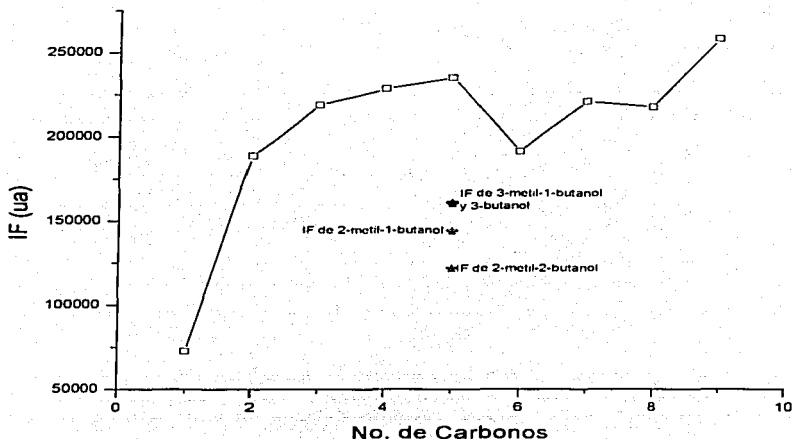


Figura 20: Comparación de intensidades de fluorescencia de ANS en isómeros del n-pentanol, con los resultados obtenidos para n-alcoholes, soluciones con concentración de ANS = 20 μ M.

Aunque no se cuenta con repeticiones para las mediciones de intensidad de fluorescencia de ANS en isómeros del n-pentanol y no es posible asignar una incertidumbre, como en el caso de los n-alcoholes, de la figura 20 es evidente que la intensidad de fluorescencia en estos nuevos medios está por debajo de la que se observó para cualquiera de n-alcoholes, excepto para el caso de metanol.

Se debe mencionar que la intensidad de fluorescencia de una muestra es directamente proporcional al número de moléculas que emiten luz desde el estado excitado después de perturbar al sistema con energía en forma de un haz de radiación electromagnética. Al

comparar las intensidades de fluorescencia del ANS en los isómeros del n-pentanol con la que presenta en el alcohol lineal para la misma concentración del fluoróforo, es evidente que mayor número de éstas logran energía de fluorescencia en n-pentanol. Esto puede deberse a dos causas: 1) que mayor número de moléculas logren alcanzar el estado excitado en-pentanol que en sus isómeros, y que la emisión sea igualmente favorecida en todos los pentanoles; 2) que igual número de moléculas de ANS alcanzan el estado excitado en todos los medios, pero en los isómeros del n-pentanol la desactivación no radiativa ocurre de forma más eficiente.

Haciendo una comparación con el trabajo original de Stryer, que propone que el ANS fluoresce con mayor intensidad en ambientes más hidrofóbicos, se tendría que concluir que los isómeros del n-pentanol crean ambientes menos hidrofóbicos que el etanol, lo cual está en clara contradicción con el hecho de que el etanol es un líquido miscible con el agua, y el n-pentanol o cualquiera de sus isómeros estructurales no lo son. La figura 20 indica que hay una evidente influencia de la geometría molecular del alcohol sobre la intensidad de fluorescencia del ANS. De los experimentos en n-alcoholes se llegó a la conclusión que a partir de dos carbonos en la cadena lineal, el ambiente local al cual se encuentra expuesto el ANS no influye de manera significativa, por lo que la interacción que produce la fluorescencia podría darse vía el grupo $-OH$. Mientras que para los alcoholes lineales el ambiente inmediato del $-OH$ no debe ser muy diferente al aumentar el tamaño de la cadena, para los isómeros del n-pentanol los hidroxilos no son igualmente accesibles, y por lo tanto no son equivalentes a los del alcohol lineal.

La interacción del grupo o grupos hidroxilo con el ANS debe estar sujeta a la accesibilidad del $-OH$, que está directamente relacionada con la estructura química del alcohol (ver figura 20). Los resultados de la figura 20 y la tabla 6 sugieren que el impedimento estérico sobre el grupo hidroxilo reduce los contactos entre este (estos) grupo(s) y el ANS; como consecuencia de ello, menos moléculas del ANS emiten en fluorescencia, muy posiblemente debido a alguna de las dos razones mencionadas anteriormente. Esta afirmación apoya la conclusión a la que se llegó en la sección 3.31, es decir, que la intensidad de fluorescencia del ANS depende de la interacción ANS - hidroxilo, y también

depende de la geometría molecular de los grupos químicos en la vecindad inmediata al hidroxilo. Desgraciadamente, la precisión de las mediciones no es suficiente para distinguir claramente entre el comportamiento de cada isómero. Con objeto de caracterizar mejor la interacción hidroxilo – ANS se realizaron experimentos de RMN, que se describirán en una sección posterior.

3.33 Comparación entre Energías de Transición para ANS en Medios de n-Alcohol e Isómeros del n-Pentanol

La discusión con respecto a los resultados experimentales de intensidad de fluorescencia para ANS en n-alcoholes e isómeros del n-pentanol (secciones 3.31 – 3.32) se realizó con los datos de intensidad máxima que se obtuvieron a partir de los espectros crudos de emisión para todas las muestras. Para el análisis de un espectro de fluorescencia, además de la variable IF se puede utilizar el centro espectral de masa, CEM (ver sección 2.13). El CEM es una estimación de la energía promedio de la transición electrónica más probable entre el estado excitado y el estado basal del ANS. Antes de presentar los datos calculados de CEM es necesario decir que para los valores experimentales obtenidos éste no varió de forma significativa con la concentración de ANS, resultado que es congruente, ya que la energía de la transición de un estado excitado a un estado basal generalmente no depende de la concentración de moléculas de fluoróforo.

La siguiente figura presenta la variación del CEM como función de la cadena hidrocarbonada en un medio de alcohol lineal, así como los CEM que se obtuvieron para los isómeros del n-pentanol.

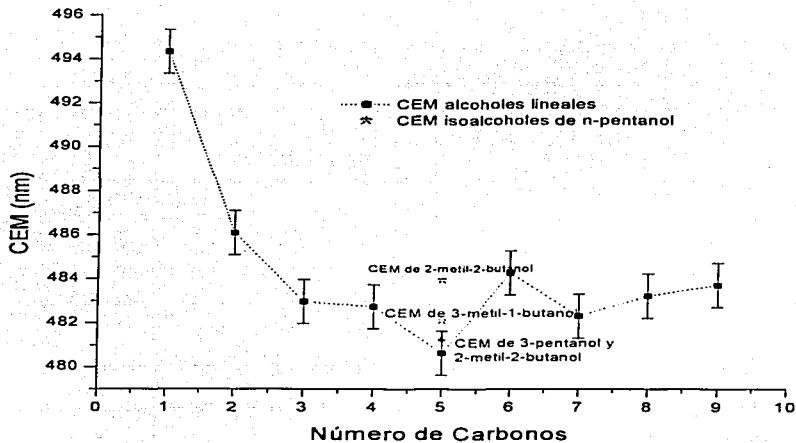


Figura 21 : Comparación del centro espectral de masa entre n-alcoholes e isoalcoholes del n-pentanol (no se muestran incertidumbres para isoalcoholes) para una concentración de ANS de 20 μ M

sistema	CEM (nm)
3-metil-1-butanol	482.1 \pm 1.1
2-metil-1-butanol	481.2 \pm 0.7
2-metil-2-butanol	483.9 \pm 1.4
3-pentanol	481.2 \pm 0.3

Tabla 7: Incertidumbre asociada a los CEM de los espectros de ANS en isómeros del n-pentanol. La incertidumbre es la desviación estándar de los datos de CEM para isómeros del n-pentanol y concentraciones de ANS de 5 a 60 μ M.

Como se dijo anteriormente, el CEM de los espectros para diferentes concentraciones de ANS en n-alcoholes no varía; en particular se mantiene constante en la zona de Lambert y Beer. Para el caso de los isoalcoholes del n-pentanol no se incluyó la incertidumbre en la figura 21, pero se presenta en la tabla 7. La interpretación es la siguiente: excepto para los medios etanol y metanol, la energía de la transición del ANS del estado excitado al estado basal es independiente del alcohol puro. Para los alcoholes lineales el comportamiento del CEM es consistente con el de la intensidad de fluorescencia, es decir, ninguna de las dos variables dependen del tamaño de la cadena lineal en el alcohol, cuando ésta contiene más de dos carbonos. Para los isómeros del n-pentanol, debido al impedimento estérico, hay menos contactos entre el ANS y los grupos hidroxilo que en comparación con el n-pentanol. Como la intensidad de fluorescencia también es proporcional a la "asociación" del ANS con los grupos hidroxilo de los alcoholes en el medio, ésta tendrá que ser menor en los isómeros del n-pentanol. Aunque en este caso la proporción de moléculas de ANS que emiten en fluorescencia es menor que en n-pentanol, las moléculas que sí logran emitir lo hacen con la misma energía que tendrían en el alcohol de cadena lineal, ya que se encuentran expuestas a la misma influencia del grupo o grupos hidroxilo. Es así como se ha proporcionado una explicación consistente con los resultados experimentales para conciliar el hecho de que las intensidades de fluorescencia de ANS en n-alcoholes e isoalcoholes del n-pentanol sean diferentes, y sus CEM, que son proporcionales a la energía más probable de emisión en fluorescencia, sean iguales.

Es evidente que la molécula de ANS en el estado basal presenta un momento dipolar diferente de cero, ya que 1) no presenta ejes de simetría, y 2) contiene átomos electronegativos - nitrógeno, oxígeno y azufre - a los que se puede asociar una carga parcial. La asignación de cargas formales a estos átomos electronegativos es consistente con los experimentos de RMN que se describen más adelante. Si el ANS presenta un momento dipolar mayor en el estado excitado con respecto al estado basal, este estado se verá estabilizado energéticamente en un medio suficientemente móvil y polarizable como el metanol, o el etanol. La menor energía de transición (las mayores) que se observa en estos dos medios y el hecho de que sea mayor y permanezca constante para alcoholes de más de dos carbonos puede ser consecuencia de que el rearrreglo de moléculas de disolvente

alrededor del ANS excitado sea menos favorable a mayor tamaño y volumen total de las moléculas de disolvente, y por lo tanto el estado excitado es menos estabilizado, provocando una transición al estado basal más energética. Es por eso que el centro espectral de masa de los espectros de ANS en metanol y etanol se encuentre a los mayores (energías menores) con respecto a los CEM para n-alcoholes (e isómeros del n-pentanol) que presentan más de dos carbonos. Además, como el CEM es el mismo para n-pentanol y sus isoalcoholes, la geometría local alrededor del grupo hidroxilo en cada alcohol – tanto lineales de más de dos carbonos, como isómeros) – no tiene influencia sobre la energía de emisión en fluorescencia. Aparentemente sólo el volumen y el tamaño total de las moléculas de disolvente que interactúan con el ANS tienen influencia sobre la energía de emisión, aunque a partir de tres carbonos en la cadena lineal del alcohol esta energía se vuelve constante.

3.3.4 Mezclas Ternarias: *Pentanol + Heptano + ANS*

Como se mencionó anteriormente, la proporción relativa de grupos polares con respecto a grupos inertes en cierto medio se puede proponer como una definición intuitiva de hidrofobicidad en un sistema (ver ANEXO I). En particular esta variable es útil para expresar la composición de una mezcla alcohol – alcano. Con esta nueva expresión de la composición de un medio se pueden comparar las hidrofobicidades tanto de alcoholes puros como de mezclas alcohol + alcano inerte, teniendo en cuenta que en el alcohol la cadena hidrocarbonada es poco afín al agua y el grupo – OH es muy afín a ésta. El compuesto inerte, en particular un alcano, es poco afín al agua también.

A partir de los experimentos anteriores – medición de IF para alcoholes de cadena lineal y para isómeros del n-pentanol – se propuso que la interacción del ANS con el medio ocurre vía el grupo – OH en un alcohol y que la geometría del ambiente local al que se encuentra unido dicho grupo es determinante para la fluorescencia del ANS.

Para profundizar sobre la importancia de la hidrofobicidad del medio en la fluorescencia del ANS, se propuso medir la emisión de mezclas ternarias de alcohol lineal, alcano y ANS. Se escogió al n-heptano como el alcano y al n-pentanol como el alcohol lineal. Se debe mencionar que la preparación de las mezclas ternarias resultó particularmente complicada debido a que el n-heptano es un disolvente volátil, lo cual generó incertidumbre en su concentración real. El análisis de los resultados se hizo utilizando dos tipos de variables de composición: 1) la fracción mol del alcano en el alcohol y 2) la fracción ψ en la mezcla del grupo - OH, (ver ANEXO I). A continuación se muestra la variación de la intensidad de fluorescencia a una concentración de ANS de $20 \mu\text{M}$ como función de la fracción mol de n-heptano en el medio:

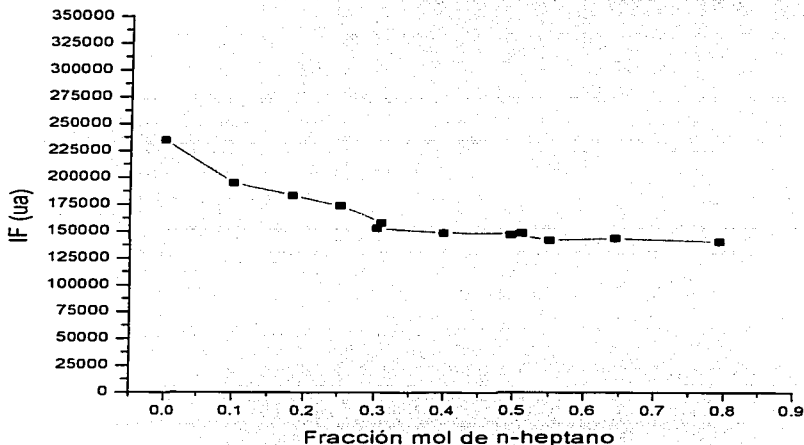


Figura 22: Variación de la intensidad de fluorescencia del ANS en medios con diferente proporción de n-heptano, para una concentración de ANS de $20 \mu\text{M}$

En primer lugar salta a la vista que a medida que se incrementa la cantidad relativa de n-heptano en el sistema, el ANS decrece su intensidad de fluorescencia hasta que llega un momento en que ésta se vuelve constante (a una fracción mol de heptano de aproximadamente 0.4). Si se tiene presente que el n-heptano es más hidrofóbico que el n-pentanol, en mezclas ternarias a medida que se incrementa la concentración de hidrófobo la intensidad de fluorescencia del ANS disminuye. Los resultados obtenidos en este experimento están en franca contradicción con las conclusiones a las que llegó Stryer, cuando afirmó que el ANS fluoresce con más intensidad en ambientes hidrofóbicos.

Se puede graficar la IF del ANS en las diferentes mezclas ternarias como una función de la variable de composición ψ , que refleja de una forma cuantitativa la hidrofobicidad del medio. Como se explica en el ANEXO I, un alcohol puro tiene una ψ asociada que depende de la relación de volúmenes molares entre el metanol y el alcohol dado. Se puede preparar medios con la misma proporción de grupos hidroxilo mezclando proporciones adecuadas de un alcano, como el n-heptano, y un alcohol, como el n-pentanol, con el fin de "emular" un alcohol puro dado, con cierta proporción de grupos -OH, que queda determinada por el número de carbonos de la cadena lineal. También se pueden preparar mezclas con una ψ asociada que no corresponda a ningún alcohol puro. En la siguiente figura se muestra la intensidad de fluorescencia como función de ψ tanto para las mezclas ternarias como para los alcoholes puros, a una concentración de 20 μM del ANS. Se "emuló" a los alcoholes lineales con 6, 7, 8, y 9 carbonos con el fin de comparar las IFs del ANS en los diferentes medios.

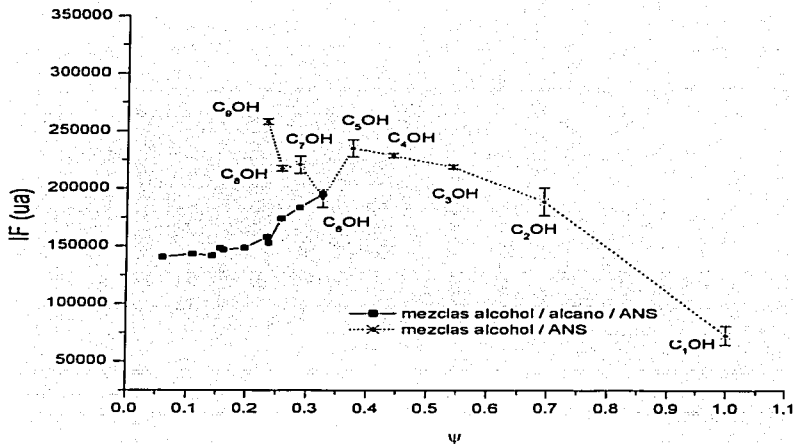


Figura 23: Comparación entre la intensidad de fluorescencia de ANS en medios puros de n-alcóholes y la intensidad de fluorescencia en mezclas de n-pentanol / n-heptano que emulan el contenido de grupos hidrofílico, para una concentración de ANS de 20µM. No fue posible asociar una incertidumbre en la IF de las mezclas de alcohol + alcano, debido a que sólo se contó con una repetición.

En un primer análisis, de acuerdo con la figura 23, estos resultados experimentales sugerirían que la concentración de grupos hidrofóbicos en el medio no determina por sí misma la intensidad de fluorescencia del ANS, ya que esta última es diferente para los alcoholes puros y para las mezclas de n-pentanol + n-heptano que los emularon en el contenido total de grupos -OH (y, por lo tanto, también en el contenido total de grupos -CH₂- y -CH₃, que se tomaron como equivalentes).

La explicación que se da al hecho de que menor proporción de moléculas de ANS emita en fluorescencia en los medios de n-alcohol + n-alcano con respecto al medio de n-alcohol puro es la siguiente: en los alcoholes líquidos de cadena lineal ocurre el fenómeno de autoasociación²¹; este hecho es independiente del número de carbonos en la estructura: el ANS en un medio de n-alcohol puro interactúa con el grupo, o los grupos hidroxilo de un *multímero* del n-alcohol. El n-heptano en la mezcla disminuye el fenómeno de autoasociación del n-pentanol, y aunque el ANS seguirá interactuando con el (o los) grupo(s) hidroxilo del alcohol, este grupo funcional ya no será parte de un *multímero*, o bien será parte de un *multímero* de menor número de unidades, con respecto al alcohol puro. Considerando los experimentos del presente trabajo, no es posible determinar la causa por la cual un *multímero* del alcohol asociado al fluoróforo ANS pueda propiciar que mayor número de moléculas emitan en fluorescencia, con respecto a un monómero o a un *multímero* de menor tamaño; sin embargo la hipótesis concuerda con el hecho de que la IF del ANS es menor en cualquier isómero con respecto al n-pentanol, ya que los alcoholes ramificados seguramente se encuentran menos asociados que los alcoholes lineales en estado puro, debido a la poca accesibilidad del grupo hidroxilo que se encuentra impedido estéricamente en los primeros.

Para finalizar con el análisis de fluorescencia, se discutirá sobre los CEM en las mezclas ternarias. La figura que se presenta a continuación muestra los CEM para los espectros de las mezclas ternarias de n-heptano, n-pentanol y ANS. Se compararon con los datos calculados para el ANS en medios de n-alcohol.

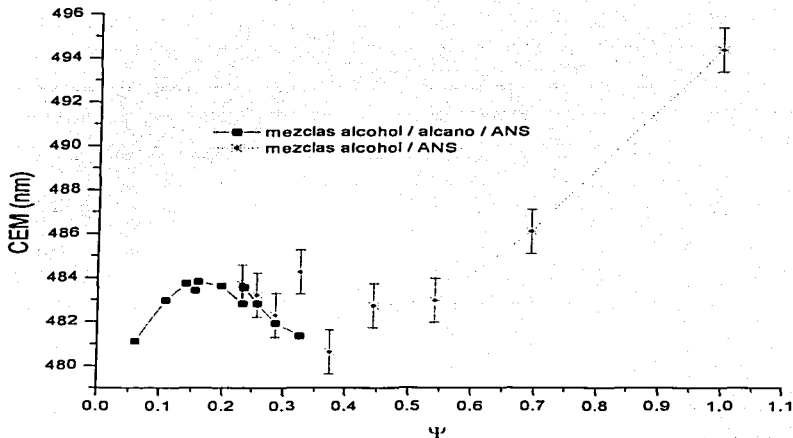


Figura 24 : Comparación entre los centros espectrales de masa de ANS en n-alcoholes y en mezclas de n-pentanol / n-heptano, para una concentración de ANS de 20 μM . El CEM presenta una incertidumbre de ± 1 nm para los alcoholes puros; la incertidumbre asociada a las mezclas n-pentanol, n-heptano + ANS posiblemente sea mayor que este valor debido a la dificultad en la preparación de las soluciones y a la alta volatilidad del n-heptano.

Se observa una tendencia general para los datos anteriores: el intervalo de valores para CEM en las mezclas se encuentra entre 481 nm y 484 nm, y es muy similar al que presenta el ANS en los alcoholes puros de cadenas con más de dos carbonos. Que los CEM varíen poco se explica de la siguiente manera: como en las mezclas ternarias se llegó a una composición límite de 0.2 n-pentanol – 0.8 n-heptano (fracción mol, que corresponde a una ψ de 0.08), la concentración de n-pentanol todavía es suficientemente grande como para poder interactuar con todas las moléculas de ANS en el estado excitado. Como el alcohol

es polar, es más factible que el ANS se asocie con una molécula polar que con el n-heptano. Al igual que con un alcohol puro de cadena lineal (de más de 2 carbonos), la presencia de n-pentanol en el medio aumenta la energía del estado excitado para el fluoróforo, provocando que la transición al estado basal sea más energética que en metanol o etanol. De nuevo, aunque las IF para mezclas binarias es mayor que para mezclas ternarias, a la misma concentración de ANS, los CEM son idénticos, ya que las energías de transición están determinadas exclusivamente por la interacción con el o los hidroxilos del medio. La adición de un componente hidrofóbico, el n-heptano, no altera las energías de transición del estado basal al estado excitado del ANS, pero muy probablemente si rompa los multímeros de alcohol que favorecen que mayor número de moléculas de fluoróforo emitan en fluorescencia.

3.35 Resonancia Magnética Nuclear de ANS

El átomo de nitrógeno del grupo anilino en la molécula de ANS tiene la capacidad de polarizar fuertemente al protón con el que está enlazado (ver figura 26). Debido a que este protón se encuentra suficientemente cerca del grupo sulfonato ($-SO_3^-$), se exploró la posibilidad de que existiera una interacción tipo puente de hidrógeno entre estos dos grupos. Uversky¹⁹ ya ha realizado estudios de fluorescencia en los disolventes agua, etilbenceno y dioxano, donde concluye que el ANS, aún a concentraciones muy bajas (2 μM), está presente en forma de dímero, posiblemente formando un puente de hidrógeno con otra molécula de ANS. A continuación se describen dos experimentos sencillos de RMN de H^1 que proporcionaron información sobre la existencia de un puente de hidrógeno entre los grupos $-SO_3^{2-}$ y $-NH-$ del ANS (ver figura 26).

Experimento de intercambio con CD_3OD

Se tomó el espectro de RMN de protón del ANS en el disolvente DMSO (dimetil sulfoxido deuterado). Se escogió este disolvente debido a que es suficientemente polar como para disolver al ANS, y al mismo tiempo permite apreciar el efecto de intercambio entre el metanol deuterado y el protón del grupo anilino. A continuación se presenta el espectro

determinado experimentalmente para el ANS en concentración de 8×10^{-4} μM en DMSO deuterado:

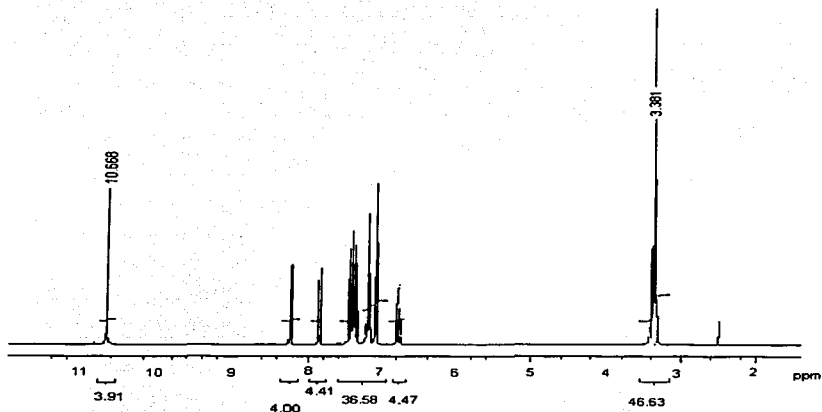


Figura 25: Espectro de RMN de ANS, 8×10^{-4} μM en DMSO 300 MHz. Espectro sin modificaciones

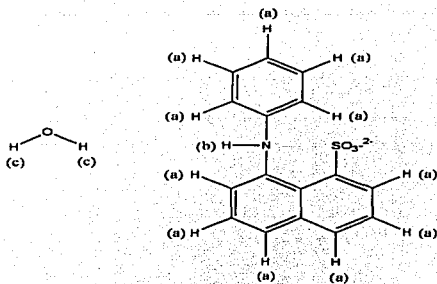


Figura 26: Estructura química del ANS, con protones explícitos

En el espectro de la figura 25 se pueden identificar los siguientes tipos de señales (véase arriba también, figura 26):

- (a) señales correspondientes a protones aromáticos (6.6 a 8.4 ppm);
- (b) señal correspondiente a protón de anilina (10.6 ppm);
- (c) señal correspondiente a protones de agua (3.4 ppm).

La señal a campo alto (3.381 ppm) corresponde los protones de agua que todavía presentaba la muestra, aún después de secar. Las señales múltiples que se presentan de 6.8 ppm a 8.2 ppm son las de protones aromáticos del fenilo de anilina y de naftaleno. La señal a 10.668 ppm es la del protón de anilina.

Es adecuado comparar la señal de protón de anilina de ANS con alguno de sus análogos, donde no exista la posibilidad de formar puente de hidrógeno intramolecular. El 1-anilino-naftaleno, por ejemplo, presenta un desplazamiento químico del protón de anilina de 5.84 ppm en cloroformo deuterado (400 MHz)²⁰. Este desplazamiento se encuentra a campo más alto que el protón de anilina de ANS, debido a que en este último compuesto el protón

de anilina se encuentra más desprotegido porque forma parte de un puente de hidrógeno (que puede ser intra o intermolecular). La señal en 3.4 ppm de la figura 25, que corresponde a los protones del agua, se eliminó de forma gráfica para generar la figura 27. A pesar de que se secó el reactivo por 12 horas, no se pudo evitar totalmente la presencia del H₂O.

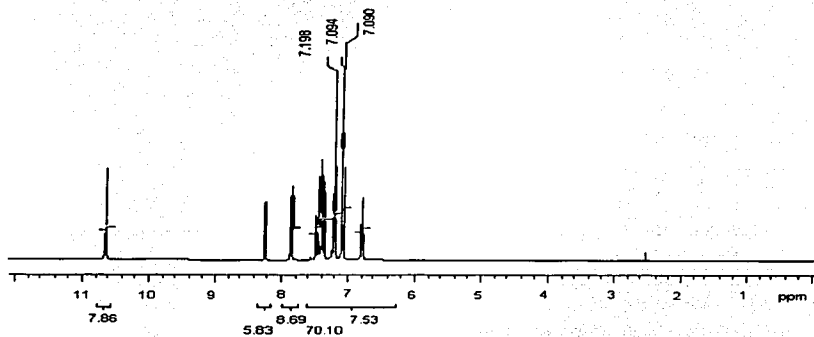


Figura 27: Espectro de RMN de ANS, 8×10^{-4} μ M en DMSO 300 MHz., se ha eliminado la señal de protones de agua.

A la muestra anterior se añadió metanol deuterado y se volvió a tomar el espectro de RMN. El tiempo de adquisición fue de aproximadamente 8 minutos. El espectro se presenta a continuación:

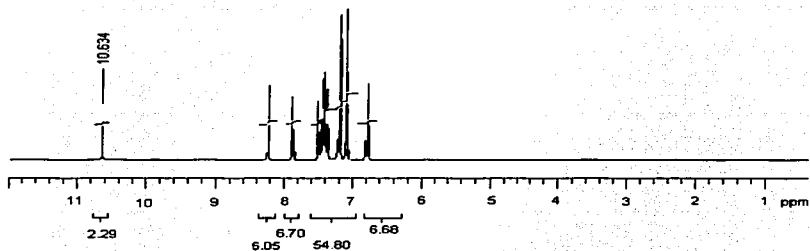


Figura 28: Espectro de RMN de ANS, 8×10^{-4} μ M en DMSO
300 MHz, adición de metanol deuterado a la muestra

El espectro de la figura 28 presenta las mismas señales que el espectro de la figura 27. Las proporciones relativas entre la señal de protón de anilina (10.6 ppm) y el multiplete aromático central (7.0 a 7.5 ppm) se deben comparar para estos dos espectros, para determinar si se llevo a cabo o no el intercambio. La relación de las señales se muestra en la tabla 7.

Espectro de figura	Area de proton de amina	Area de protones aromaticos	Relacion de areas (amina / aromaticos)
22	7.86	70.10	11.21%
23	2.29	54.80	4.18%

Tabla 7: Relación de áreas en señales de espectros presentados en figura 27 y figura 28.

Para el espectro de la figura 28 la relación de áreas entre protón de amina y protones aromáticos es aproximadamente la tercera parte del espectro en la figura 27. Esto significa que el metanol deuterado que se ha agregado a la muestra sí establece un equilibrio de intercambio de protones con el protón de anilina. Sin embargo este intercambio no es

inmediato, como ocurriría, por ejemplo, con el 1-anilino naftaleno, donde el protón de interés no tiene posibilidades de formar un puente de hidrógeno.

Este experimento proporciona evidencia sobre la existencia de un puente de hidrógeno que se establece con el átomo de nitrógeno del grupo anilino del ANS, debido a la dificultad para el intercambio con metanol deuterado, dificultad que es inexistente en compuestos como el 1-anilino naftaleno, que intercambia con metanol deuterado inmediatamente.

Experimento de dilución de la muestra

Con el fin de reunir más evidencia experimental que apoyara la existencia de un puente de hidrógeno intramolecular en el ANS se realizó el siguiente experimento: se preparó una disolución de $8 \times 10^4 \mu\text{M}$ del reactivo en DMSO deuterado, se corrió el espectro de RMN y luego se diluyó a concentraciones de $4 \times 10^4 \mu\text{M}$, $2 \times 10^4 \mu\text{M}$ y $1 \times 10^4 \mu\text{M}$, tomando de nuevo el espectro de RMN en cada ocasión. Los espectros experimentales que se han modificado de forma gráfica para no incluir la señal de protones de agua se muestran a continuación:

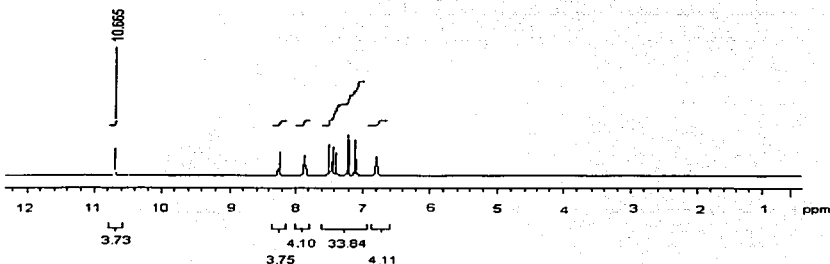
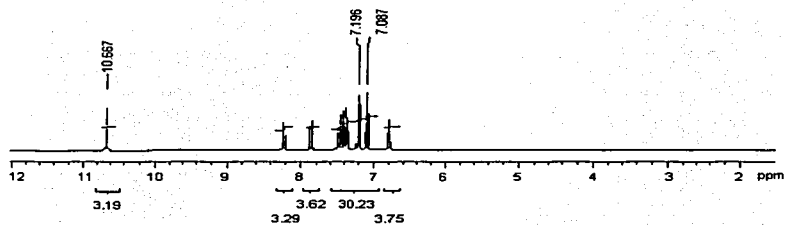
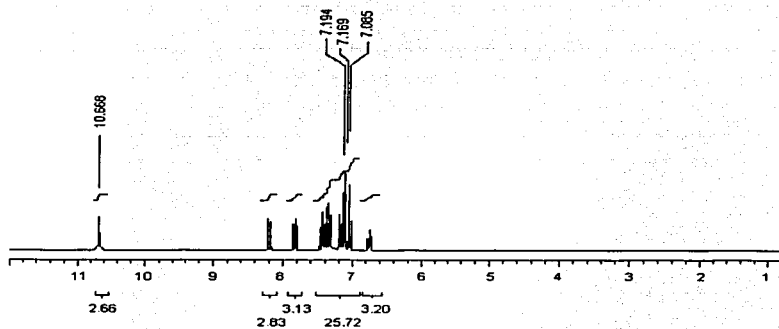
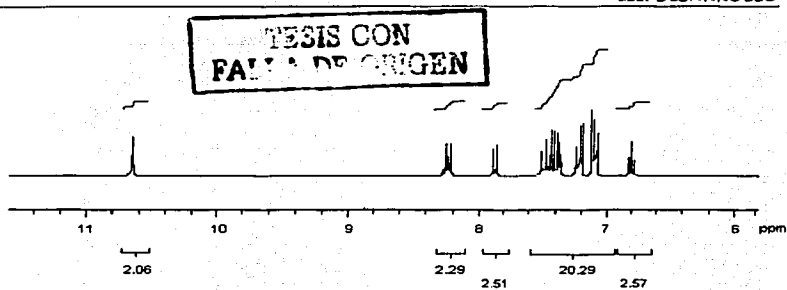


Figura 29: Espectro de RMN de ANS, $8 \times 10^4 \mu\text{M}$ en DMSO, 300 MHz

Figura 30: Espectro de RMN de ANS, $4 \times 10^{-4} \mu\text{M}$ en DMSO, 300 MHzFigura 31: Espectro de RMN de ANS, $2 \times 10^{-4} \mu\text{M}$ en DMSO, 300 MHz

Figura 32: Espectro de RMN de ANS, 1×10^{-4} μ M en DMSO, 300 MHz

Como se puede apreciar en la tabla 8, la proporción protón de anilina / protones aromáticos es la misma para los cuatro espectros. Además, la señal de protón de amina aparece en el mismo valor de desplazamiento químico aún después de diluir. Si este protón estuviera formando un puente de hidrógeno con otra molécula de ANS, es decir formando dímeros, éste dejaría de ser visible al disminuir la concentración del reactivo en solución: el desplazamiento químico sería diferente.

Espectro de figura	Area de proton de amino	Area de protones aromaticos	Relacion area amino area aromatico	Desplazamiento de proton de amino (ppm)	Desplazamiento de protones aromaticos (ppm)
24	3.73	33.84	11.02%	10.6	7.1
25	3.19	30.23	10.55%	10.6	7.1
26	2.66	25.72	10.34%	10.6	7.1
27	2.06	20.29	10.15%	10.6	7.1

Tabla 8: Comparacion entre las areas de las diferentes señales para las cuatro diluciones de la muestra y desplazamientos quimicos

Estos resultados experimentales se encuentran en oposición con los obtenidos con Uversky¹⁹, quien reporta a partir de experimentos de fluorescencia que el ANS forma dímeros aun a concentraciones de 2 μM . Esta última afirmación debe ser tomada con reservas, debido a que las técnicas de espectroscopia de fluorescencia son extremadamente sensibles, capaces de detectar concentraciones órdenes de magnitud más pequeñas que aquéllas detectables en resonancia. En el presente trabajo no fue posible llegar a concentraciones más pequeñas que 1000 μM , tres órdenes de magnitud superiores a las utilizadas por Uversky.

Para concluir con el presente análisis, a partir de los experimentos de RMN, es razonable afirmar que la molécula de ANS presenta un puente de hidrógeno intramolecular en solución, en un medio altamente polar, aunque aprótico (DMSO). Este puente de hidrógeno es el que se establece entre el grupo sulfonato ($-\text{SO}_3^{2-}$) y el grupo anilino ($-\text{NH} - \phi$) del ANS, única posibilidad real después de descartar la formación de puentes intermoleculares. El hecho de que exista intercambio de protones implica que el grupo hidroxilo de los alcoholes puede formar un puente de hidrógeno con el grupo anilino, y desde luego, también con el grupo sulfonato.

IV. CONCLUSIONES

IV. CONCLUSIONES

Se estudió la fluorescencia del compuesto 1-anilino-8-sulfonato-naftaleno, el ANS, en diferentes medios líquidos. Las asociaciones de ANS con ciertas proteínas nativas, así como con intermediarios estables entre la proteína nativa y la proteína desnaturizada son responsables de un incremento significativo en la fluorescencia del sistema que permite detectar a los intermediarios. Aunque se tiene la hipótesis de que dicho compuesto interactúa con zonas "hidrofóbicas" no específicas en estas proteínas, en el presente trabajo se ha encontrado que:

1. Para la serie de alcoholes de cadena lineal que va de metanol a nonanol, que podría considerarse como una serie en la que la "hidrofobicidad" de la cadena unida al grupo $-OH$ va en aumento con el número de carbonos, la intensidad de fluorescencia del ANS se mantiene prácticamente constante a partir de propanol, dentro del intervalo de incertidumbre asociado con las mediciones experimentales.
2. Stryer trabajó con concentraciones de ANS de $100 \mu M$, concentraciones que se encuentran fuera de la zona en donde se cumple la ley de Lambert y Beer, es decir, donde el cambio en la intensidad de fluorescencia del ANS como función de su concentración no es lineal. Al realizar las mismas mediciones a concentraciones de ANS donde la respuesta con la IF es lineal, se llegó a la conclusión de que el grupo funcional responsable de la fluorescencia de dicha molécula es el grupo hidroxilo, ya que al modificar el número de carbonos en la cadena del n-alcohol la IF permanece sin cambios.
3. La intensidad de fluorescencia del ANS en n-pentanol es mayor que en cualquiera de los 4 isómeros estructurales ensayado (IF en isómeros $\cong 0.6$ IF en n-pentanol). Este hecho no contradice que el ANS pueda interactuar por medio del grupo hidroxilo con los alcoholes en las asociaciones fluorescentes. Sin embargo, la accesibilidad del hidroxilo es importante y se propone que mientras menos

impedimento estérico presente el hidroxilo, la proporción de moléculas que emitan en fluorescencia desde el estado excitado será mayor. La energía de esta emisión es la misma para todos los alcoholes con más de dos carbonos en su estructura, incluso para los isómeros del n-pentanol, lo cual apoya la apreciación inicial de que el tamaño de la cadena hidrocarbonada no es importante, y la geometría local del medio es un factor importante para la emisión en fluorescencia.

4. La hidrofobicidad de un medio que contiene n-alcohol, definida de forma conveniente a partir de la variable de composición ψ , para una mezcla de n-pentanol y n-heptano, no es proporcional al aumento en intensidad de fluorescencia del ANS. En particular, a menor proporción de alcano en el medio, mayor será la intensidad de fluorescencia del compuesto de interés, hecho que de nuevo está en contra de la apreciación general sobre la supuesta "afinidad" del ANS por regiones hidrofóbicas. Aún para mezclas alcohol (C>2) + alcano + ANS, el CEM no varía con la proporción de alcano utilizado y es el mismo que para mezclas alcohol (C>2) + ANS, lo cual apoya la hipótesis de que es la interacción con el grupo hidroxilo la que determina la energía de emisión en fluorescencia. Sin embargo, la IF para estas mezclas ternarias es menor que la esperada para mezclas alcohol + ANS con la misma proporción de grupos hidroxilo en el medio. Aunque no se realizaron experimentos para apoyar una posible explicación, se cree que la adición de alcano al medio rompe los multimeros de alcohol, que son estos últimos los que estarían asociados con el ANS en medios de alcohol puro, y que la presencia de multimeros favorece que mayor número de moléculas emitan en fluorescencia. Esta explicación no se contrapone con ninguno de los hechos experimentales.
5. Por último, los experimentos de RMN de H^1 proporcionan evidencia que apoya la existencia de un puente de hidrógeno intramolecular entre el protón de amina y el grupo sulfonato del ANS. A pesar de que Uversky en sus experimentos utilizó concentraciones mucho menores del fluoróforo (2 μM) y que llegó a la conclusión de que éste existe como dímero, si el puente de hidrógeno en el ANS es intramolecular, la formación de este dímero no sería posible. Esta última

apreciación debe tomarse con reservas, ya que la menor concentración de ANS utilizada en este trabajo es de $1 \times 10^4 \mu\text{M}$, muy por arriba de la empleada por Uversky, y es posible que sean necesarias un mayor número de diluciones para hacer evidente la existencia de un dímero.

**V. TRABAJO A FUTURO Y
ANEXOS**

V. TRABAJO A FUTURO Y ANEXOS

Con el fin de mejorar y ampliar el presente trabajo, se presentan las siguientes sugerencias:

- 1) Para ensayar la hipótesis que explica la variación de la intensidad de fluorescencia del ANS de un medio a otro, es necesario realizar estudios de intensidad de fluorescencia como función del tiempo, para tiempos del orden de magnitud de la vida media del fluoróforo, y determinar los mecanismos de un posible apagamiento, así como el perfil de decaimiento. Para este fin, es crucial asegurarse de que no existan interferencias indeseadas, como el apagamiento por oxígeno, por ejemplo, por lo que se necesita extremo cuidado en el control de las variables. Debido a que los fenómenos de apagamiento son frecuentes cuando se trabaja con líquidos relativamente poco viscosos (agua, metanol, etanol, dimetil éter) se debe burbujear un gas inerte al disolvente, previo a la determinación, o bien llevar el líquido a ebullición por algunos minutos y tapar inmediatamente, antes de preparar las disoluciones, previo al proceso de medición;
- 2) Para tener una certidumbre absoluta sobre la concentración del fluoróforo en el medio se deben tomar mediciones de absorbancia a varias concentraciones y ajustar a una curva de calibración; es decir, se debe confirmar la concentración de ANS en el medio por alguna técnica alternativa, y la espectroscopia de absorción resulta muy adecuada;
- 3) Como la intensidad de fluorescencia reportada en unidades arbitrarias varía dependiendo del aparato que se esté usando, estrictamente se debería utilizar la "eficiencia cuántica". Sin embargo, no siempre es posible porque esta última forma de reportar intensidad de fluorescencia requiere que se determine el valor del coeficiente de extinción molar del fluoróforo, que a su vez depende de cada medio líquido, y además dicho coeficiente debe corregirse con un factor que relacione la eficiencia de los fotomultiplicadores del espectrofluorómetro y del

espectrofotómetro. Una forma de darle universalidad a las medidas de intensidad de fluorescencia sin tener que hacer todo esto consiste en emplear una solución estándar de algún compuesto cuya eficiencia cuántica se conozca (se ha empleado a la fluoresceína en agua), y referir la intensidad de fluorescencia medida a esta calibración:

- 4) Para profundizar en el comportamiento de ANS en medios "similares" a las cadenas laterales de residuos de aminoácidos que conforman a las proteínas, sería interesante explorar las propiedades de esta prueba fluorescente en soluciones de agua y fenol, "emulando" a los residuos de tirosina, que también contienen un grupo hidroxilo, que en principio también es capaz de interactuar con el ANS en solución;
- 5) Finalmente, se puede considerar medir la fluorescencia en medios de aminoácidos libres.

ANEXOS

1. Variable de Concentración ψ_A en una Mezcla Alcohol - Alcano

Variable ψ_A en una Mezcla de Alcohol - Alcano

La variable ψ_A es una variable de concentración. Se ha utilizado de forma exitosa para calcular la constante fracción - volumen de equilibrio, K^v , para formación de tetrámeros, en mezclas binarias de alcohol - alcano²¹. En el presente trabajo, se utilizará esta variable para relacionar con la variable dependiente, intensidad de fluorescencia del ANS en mezclas alcohol - alcano, debido a que se quiere hacer explícita la importancia del grupo - OH como grupo funcional en el fenómeno de fluorescencia.

Antes de escribir la ecuación de ψ se proporcionarán las siguientes definiciones:

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

- Fracción volumen, ϕ_1 (fracción del componente 1 en la mezcla):

$$\phi_1 = \frac{x_1 u_1}{x_1 u_1 + x_2 u_2}$$

Donde x_i , u_i son la fracción mol y el volumen molar respectivamente, de la especie "i" en la mezcla.

La variable de concentración ψ considera la fracción molar de un componente por mol de segmentos en un sistema.

- Los números de segmentos por molécula de alcohol alcohol y por molécula de disolvente inerte, r_A y r_2 son:

$$r_A = \frac{V_A}{u} \qquad r_2 = \frac{V_2}{u}$$

Donde V_A , V_2 son los volúmenes molares del alcohol y del alcano, respectivamente, y u es el volumen molar del segmento escogido ("volumen molar segmental").

La variable ψ se define como:

$$\psi_A = \frac{\phi_1}{r_A} = \frac{x_1}{x_1 r_A + x_2 r_2}$$

Para una mezcla de alcohol – alcano, x_1 es la fracción molar del alcohol, y x_2 es la fracción molar del alcano.

Es evidente que el volumen segmental, u , se escoge a conveniencia. Para este caso se escogió al volumen molar del metanol (CH_3OH), que es de $40.7 \text{ cm}^3/\text{mol}$, lo cual quiere decir que el grupo hidroxilo ocupa un segmento, y que la variable r_A es la fracción del volumen de la molécula de alcohol que ocupa dicho grupo.

VI. REFERENCIAS

VI. REFERENCIAS

1. Lakowicz, J. R., Principles of Fluorescence Spectroscopy, 1999, Plenum Press Pub. Co., U.S.A.
2. Stryer, L. "The Interaction of a Naphthalene Dye with Apomyoglobin and Apohemoglobin. A Fluorescent Probe of Non-polar Binding Sites", *J. Mol. Biol.* (1965) **13**, 482-495.
3. Matulis, D., Lovrien, R. "1-Anilino-8-Naphthalene Sulfonate Anion-Protein Binding Depends Primarily on Ion Pair Formation", *Biophysical Journal* (1998) **74**, 422-429.
4. Guilbault, G. G. Practical Fluorescence. Theory, Methods and Techniques, 1973, Marcel Dekker, N.Y., U.S.A.
5. Nelson, D. L., Cox, M. M., Lehninger Principles of Biochemistry, 2000, Worth Publishers, N.Y., U.S.A.
6. 6.1. <http://www.chembio.uoguelph.ca/educmat/phy456/456lec01.htm>
6.2. <http://folding.stanford.edu/education/prstruc.html>
7. Laguna, J., Piña, E., Bioquímica de Laguna, 2002, Manual Moderno, México.
8. Chánéz-Cárdenas, M. E. "El Uso de 1-anilino-8-naftalenosulfonato (ANS) para la Identificación de intermediarios en la Ruta de Plegamiento de Proteínas Globulares", *Boletín de Educación Bioquímica* (1998) **17**, 1, 11-17.
9. Dolgikh, D.A., Bilmanshin, R. I., Braznikov, E. V., Bychkova, G. B., Semisotnov, S., Venyaminov, S. Yu., Ptitsyn, O.B. "α-Lactalbumin: Compact State with Fluctuating Tertiary Structure?", *FEBS Letters* (1981) **136**, 2, 311-315.

10. Ptitsyn, O.B., Pain, R. H., Semisotnov, G. B., Zerovnik, E., Razgulyaer, O. I. "Evidence for a Molten Globule State as a General Intermediate in Protein Folding", *FEBS Letters* (1990) **262**, 1, 20-24.
11. Rosen, C.G., Weber, G. "Dimer Formation from 1-Anilino-8-naphthalenesulfonate Catalyzed by Bovine Serum Albumin. A New Fluorescent Molecule with Exceptional Binding Properties", *Biochemistry* (1969) **8**, 10, 3915-3920.
12. Goto, Y., Fink A. L., "conformational States of β - Lactamase: Molten – Globule States at Acidic and Alkaline pH with High Salt", *Biochemistry* (1989) **28**, 945 – 952.
13. Semisotnov, G. V., Rodinova, N. A., Razgulyaev, O. I., Uversky, V. N., Gripas, A. F., Gilmanshin, R. I. "Study of the "Molten Globule" Intermediate State in Protein Holding by a Hydrophobic Fluorescent Probe", *Biopolymers* (1991) **31**, 119 – 128.
14. Bychkova, V. E., Berni, R., Rossi, G. L., Kutyshenko, V. P., Ptitsyn, O. B. "Retinol – Binding Protein Is in the Molten Globule State at Low pH", *Biochemistry* (1992), **31**, 7566 – 7571.
15. Itzhaki, L. S., Evans, P. A., Dobson, C. M., Radford, S. E. "Tertiary Interactions in the Folding Pathway of Hen Lysozyme: Kinetic Studies Using Fluorescent Probes", *Biochemistry* (1994), **33**, 5212 – 5220.
16. Jones, B. E., Jennings, P. A., Pierre, R. A., Matthews, C. R. "Development of Nonpolar Surfaces in the Folding of *Escherichia coli* Dihydrofolate Reductase Detected by 1- Anilino-naphthalene-8-sulphonate Binding", *Biochemistry* (1994), **33**, 15250 – 15258.

17. Das, B. K., Bhattacharyya, T., Roy, S. "Characterization of a Urea Induced Molten Globule Intermediate State of Glutaminyl - tRNA Synthetase from *Escherichia coli*", *Biochemistry* (1995), **34**, 5242 - 5247.
18. Seale, J. W., Gorovits, B. M., Ybarra, J., Horowitz, P. M., "Reversible Oligomerization and Denaturation of the Chaperonin GroES", *Biochemistry* (1996), **35**, 4079 - 4083.
19. Uversky, V. N., Winter, S., Löber, G. "Self-Association of 8-Anilino-1-Naphthalene-Sulfonate Molecules: Spectroscopic Characterization and Application to the Investigation of Protein Folding", *Biochimica et Biophysica Acta* (1998), **1388**, 133 - 142.
20. http://www.aist.go.jp/RIODB/SDBS/sdbs/owa/sdbs_sea.cre_frame_sea
21. Andreoli-Ball, L., Patterson, D., Costas, M., Cáceres-Alonso, M., "Heat Capacity and Corresponding States in Alkan - 1 - ol - n - Alkane Systems", *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1* (1988), **84**, 11, 3991 - 4012.
22. CDATA, *Database of Thermodynamic and Transport Properties for Chemistry and Engineering*. Department of Physical Chemistry. Institute of Chemical Technology (distributed by F12 Chemie GmbH, Berlin): Prague. 1991
23. Vázquez - Contreras, E., Zubillaga, R.A., Mendoza - Hernández, G., Costas, M., Fernández - Velasco, D., "Equilibrium Unfolding of Yeast Triosephosphate Isomerase: a Monomeric Intermediate in Guanidine - HCL and Two - State Behavior in Urea", *Protein and Peptide Letters*, (2000), **7**, 1, 57 - 74.
24. Van Holde, K. E., Jonson, W. C., Ho, P. S., Principles of Physical Biochemistry, 1998, Prentice Hall, U.S.A.

25. Harris, R. K., Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. A Physicochemical View, 1986, John Wiley & Sons, N.Y., U.S.A.
26. Fersht, A., Structure and Mechanism in Protein Science, 1999, W. H. Freeman and Company, N. Y., U. S. A.