

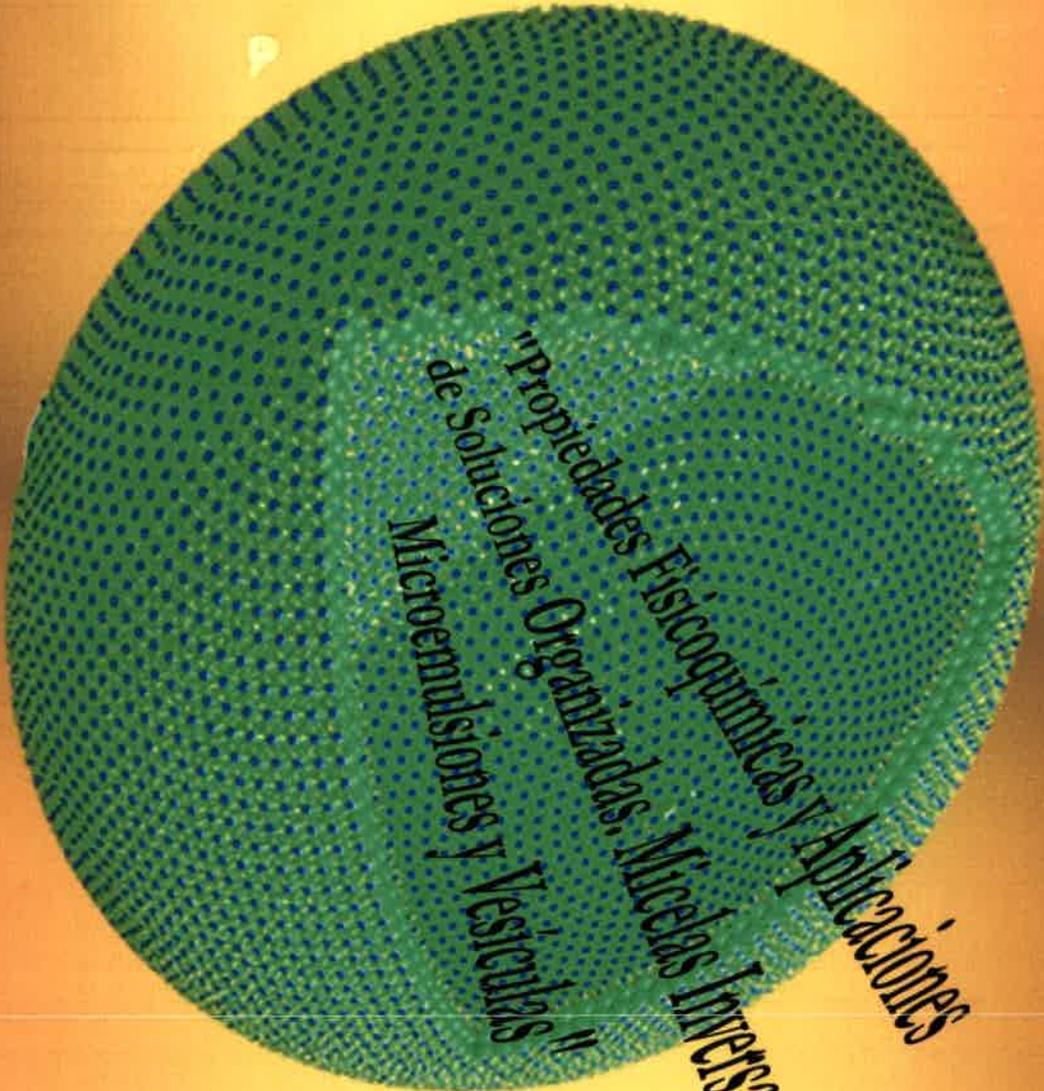
MOYANO, F.
Propiedades Fisicoqu

05848

2008

65848

TESIS DOCTORAL



*"Propiedades Fisicoquímicas y Aplicaciones
de Soluciones Organizadas: Micelas Inversas,
Microemulsiones y Vesículas"*

Año: 2008

Fernando Moyano



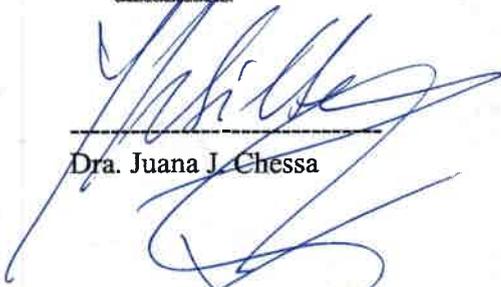
UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO

Facultad de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales

Departamento de Química



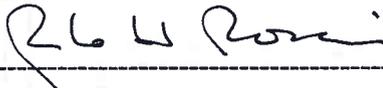
DIRECTOR:


Dra. Juana J. Chessa

CO-DIRECTOR:


Dr. N. Mariano Correa

MIEMBROS DE LA COMISIÓN DE TESIS


Dra. María Rita Micaela Hoyos de Rossi.


Dr. Norman García.


Dra. M. Cristina Miras.



11 de Noviembre de 2008

Autor: Fernando Moyano

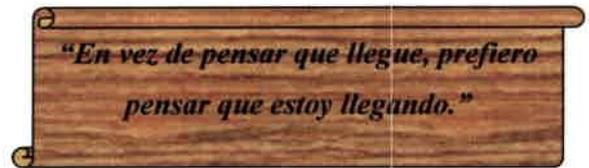


65848

MFN:
Clasif:
T.518



AÑO: 2008



AÑO: 2008

Agradecimientos

A mi directora de tesis, la Dra. Juana J. Chessa de Silber, a quien le debo un profundo respeto y admiración por su sapiencia. Además, agradecerle la oportunidad de iniciarme en mi carrera científica.

A mi codirector de tesis, el Dr. Mariano Correa, quien contribuyó en forma decisiva en mi formación, por sus conocimientos invaluable y consejos durante estos años.

Al Dr. Darío Falcone, Dr. Leonides Sereno y la Dra. Patricia Molina por colaborar siempre y en todo momento en forma desinteresada.

Al jurado de tesis, la Dra. María Rita Micaela Hoyos de Rossi, el Dr. Norman García y la Dra. M. Cristina Miras por su guía y comprensión en la confección de mi tesis doctoral.

A mi familia por nuestras añoranzas y nuestros sueños que nos quedan por cumplir.

A Valeria, por todo su apoyo y amor.

A mis amigos José Natera, Diego Acevedo, Mariano Correa, Mariano Bruno, Darío Falcone, Patricia Molina, Carina Guardianelli, Luis Cruz, Luciano Ingoglia, por todos los momentos compartidos y por haberme apoyado en las buenas y en las malas.

A los compañeros de laboratorio, por su alegría y compañía en largas horas de trabajo.

A CONICET por brindarme el apoyo financiero a través de los distintos tipos de becas de formación de postgrado que me otorgó, sin el cual no hubiera sido posible la realización de mi doctorado.

A la Universidad Nacional de Río Cuarto, en especial al Departamento de Química, por brindarme el espacio físico para poder desempeñar mis tareas de investigación.

Y a todos los que de algún modo u otro contribuyeron para la realización de mi tesis doctoral.

Resumen

En este trabajo de tesis fueron caracterizadas las propiedades de diferentes interfases con el fin comprender la capacidad de reconocimiento molecular que poseen la interfaz de los sistemas organizados estudiados.

Se investigaron las propiedades de micelas inversas de 1,4-di (2-etilhexil) sulfosuccinato de sodio (AOT) y de vesículas unilaminares grandes de di-oleil-fostatidil colina (DOPC) empleando como medio dispersante agua. Dichos sistemas organizados fueron caracterizados por moléculas prueba de diferentes características: polar, propionil-2-dimetilamino naftaleno (PRODAN); neutra, 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH); catiónicas, ioduro de trans-4-[4-(dimetilamino)-estiril]-1-metilpiridinio (HC) e ioduro de trans-4-[4-(dihexadecil amino)-estiril]-1-metil piridinio (DIA).

Para comparar el comportamiento de dichas moléculas en medio homogéneo se empleó técnicas espectrofotométricas. Las propiedades se explican teniendo en cuenta distintas interacciones presentes en el sistema en cuestión, empleando el método de comparación solvatocrómico de Kamelt-Taft.

La capacidad de sensar electrones de las diferentes hemicianinas encontrada en medio homogéneo dio lugar al estudio en micelas inversas de benceno/AOT/agua. Se determinaron las diferentes regiones de la interfaz micelar donde se incorporó la molécula prueba. Se observó la competencia del agua con la cabeza polar de AOT (aniónica) por solvatar la carga positiva que estas moléculas poseen. Mediante el empleo de HC se pudo determinar la concentración micelar crítica (*cmc*) empleando técnicas espectrofotométricas. Luego se extendió el estudio a micelas no acuosas de heptano/AOT/dimetilformamida y dimetilacetamida empleando como molécula prueba PRODAN. Como estos solventes no poseen la capacidad de interactuar mediante puente de hidrogeno con la cabeza polar de AOT, hacen la interfaz micelar menos estructurada y con mayor polaridad. Mediante la incorporación de PRODAN a la interfaz, fue posible determinar la constante de partición (K_p), mediante técnicas de absorción y emisión.

Se extendió el estudio a vesículas unilaminares grandes de DOPC empleando las distintas moléculas prueba y así fue posible determinar regiones diferentes de la bicapa. Diferenciando entornos fluidos de los que no lo son, como así también regiones en donde hay una mayor capacidad de dar electrones. Además, se determinó la K_p espectrofotométricamente para PRODAN y HC entre la bicapa lipídica y el agua.

Con el propósito de emplear técnicas alternativas a la espectroscopia en el estudio de vesículas, se estudió el proceso de transferencia de carga de PRODAN en agua y en vesículas de DOPC mediante técnicas electroanalíticas. Luego fue posible determinar la K_p por dicha técnica y compararla con la obtenida por espectrofotometría.

Por último, es necesario destacar que todos los estudios fisicoquímicos que se aplicaron a los sistemas organizados, conllevan a que los mismos pueden ser empleados para el reconocimiento molecular. De esa manera es posible crear y desarrollar "nanoreactores inteligentes" para realizar reacciones enzimáticas, catálisis de diferentes solutos, o emplearlos como transportadores de drogas específicos con actividad farmacológica.

Abstract

In this thesis work, the properties of different interfaces were characterized with the purpose to gain more insights on the capacity that these interfaces have on the molecular recognition process.

The properties of reverse micelles made with the 1,4-bis (2-ethylhexyl) sulfosuccinate (AOT) surfactant and that of the large unilamellar vesicles of 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine (DOPC), were investigated. To characterize these organized systems, probes molecules of different characteristic such as: the non ionic dyes: 6-propionyl -2-(dimethylaminonaphthalene) (PRODAN), and 1,6 diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH); the cationic hemicyanines trans-4-[4-(dimethylamino)-styryl]-1-methylpyridinium iodide (HC) and the 4,4-(dixedadecylamino)styryl-N-methylpyridinium iodide (DIA) were used.

To gain more insights on the photophysics of the different molecular probes used in homogeneous media, we use the Kamlet and Taft solvatochromic comparison method. Thus, in homogeneous media, it was quantified the solute-solvent interactions from the absorption and emission bands.

Due to the capacity that the cationic hemicyanines to undergo a specific interaction with the medium through the electron donor capacity of the solvents as measure by the β solvent parameter, we have investigated the behavior of the cationic hemicyanines HC and DIA in water/AOT/benzene reverse micelles media using absorption and emission spectroscopy in addition to the steady-state and time-resolved fluorescence emission techniques. The results show that HC and DIA are powerful dyes to characterize different interfaces properties simultaneously as they can be used to sense, at the same time, fluidity and specific interactions at the interface.

The study was extended to non-aqueous reverse micelles made of heptane/AOT/dimethylformamide or dimethylacetamide using PRODAN as molecular probe. As those solvents do not interact through hydrogen bond with the AOT polar head, make the interface micelles less structured and with higher polarity than when hydrogen bond donor solvents are encapsulated.

With regards to vesicles bilayer, this thesis work show studies performed to vesicles of DOPC using different molecular probes and, it was possible to determine different properties of different regions of the bilayer where they can be incorporated. Not only microfluid environments were differentiated from those that are not but, also regions where there is great electron donor capacity were found. The studies were extended to the use of electrochemical techniques to characterize these organized systems.

Finally it is necessary to highlight that all the physicochemical studies that were applied to the different organized systems were performed in order to understand better the interface so, they can be modified to create and design new and "smarts nanoreactors" to perform enzymatic reactions, catalysis or to employ them as possible drugs with pharmacological activity deliveries.

Resumen del contenido

Objetivos

Introducción

Materiales y métodos

Estudio en medio homogéneo

Estudio en micelas inversas de AOT

Estudio en vesículas unilaminares grandes de DOPC

Conclusiones

Abreviaturas

Anexo

Referencias

Índice general

Capítulo 1

Sistemas Organizados
Micelas Inversas
Vesículas
Fundamentos Teóricos

A. SISTEMAS ORGANIZADOS

1. A-1. Reseña histórica	27
1. A-2. Interacciones Moleculares y Solubilidad	29
a) <i>Interacciones no específicas</i>	30
i) <i>Interacción ión-dipolo</i>	30
ii) <i>Interacción dipolo-dipolo</i>	30
iii) <i>Interacción dipolo-dipolo inducido</i>	31
iv) <i>Interacción dipolo instantáneo-dipolo inducido. Interacciones dispersivas o Fuerzas de interacción de London.</i>	31
b) <i>Interacciones específicas</i>	32
i) <i>El puente de hidrógeno</i>	32
ii) <i>Complejos electrón - dador - aceptor (EDA)</i>	33
c) <i>Interacciones hidrofóbicas</i>	33
1. A-3. Sistemas organizados	35
1. A-4. Parámetro de empaquetamiento	38

AÑO: 2008

B. MICELAS

1. B-1. Introducción	40
1. B-2. Micelas inversas	41
1. B-3. Micelas inversas de AOT. Estructura y propiedades	45
1. B-4. Estructura del agua incorporada en micelas inversas de AOT	48

C. VESÍCULAS

1. C-1. Generalidades	49
1. C-2. Estructura química de los fosfolípidos	50
1. C-3. Inclinação de los ácidos grasos	52
1. C-4. Estructura de vesículas	52
1. C-5. Fluidez de la bicapa	53
1. C-6. Permeabilidad de la membrana	57

D. TÉCNICAS Y FUNDAMENTOS

1. D-1. Procesos primarios de espectrofotometría molecular	58
1. D-2. Tiempos de vida de fluorescencia	61
1. D-3. Fluorescencia en estado estacionario y resuelta en el tiempo	61
1. D-4. Efecto de solvente sobre los espectros de absorción y de emisión	62
1. D-5. Parámetros del solvente	64

Capítulo 2

**Materiales y Métodos
Técnicas experimentales**

A. MATERIALES Y MÉTODOS

2. A-1. Reactivos	67
2. A-2. Materiales	69

AÑO: 2008

2. A-3. Preparación de vesícula unilaminares grandes de DOPC. Extruder 70

B. TÉCNICAS

2. B-1. Conteo de fotón único (Single Photon Counting, SPC) 71

2. B-2. Anisotropía de fluorescencia 74

2. B-3. Cambio en los espectros de emisión al excitar la molécula al rojo del máximo de la banda de absorción (REES). (Red-edge excitation shifts) 76

2. B-4. Procedimiento de Longitud de Onda Selectiva de Fluorescencia. (The Wavelength – Selective Fluorescence Approach) 79

2. B-5. Dispersión dinámica de luz (Dinamic light scattering) 80

Generalidades 80

2. B-6. Técnicas Voltamétricas 83

I) Proceso de Electrodo 83

II) Cinética de Reacción de Electrodo 85

III) Cinética de Control Difusional 86

IV) Voltametría de Barrido Lineal y Cíclico de Potencial 88

V) Solución de las ecuaciones difusionales 89

Capítulo 3

Estudio en Medio Homogéneo

PRODAN, DPH, DIA y HC

3. A-1. PRODAN 93

3. A-2. Estudio en agua 97

3. A-3. Estudio electroquímico de la molécula PRODAN en agua 102

3. B-1. DPH 108

3. C-1. Hemicianinas. DIA y HC 110

AÑO: 2008

3. C-2. DIA	111
3. C-3. DIA en benceno	118
3. D-1. HC	120
3. D-2. Estudio de HC en benceno	128

Capítulo 4

**Estudio en Micelas
DIA, HC y PRODAN**

4. A-1. DIA	131
<i>a) DIA en micelas inversas de benceno/AOT. $W = 0$</i>	131
<i>b) Estudio del corrimiento del máximo de emisión de DIA al cambiar la longitud de onda de excitación (REES).</i>	134
<i>c) Estudio del tiempo de vida de fluorescencia de DIA en micelas inversas de benceno/AOT. $W = 0$.</i>	135
<i>d) DIA en micelas inversas de benceno/AOT/agua. $W = 10$.</i>	136
<i>e) Estudio del corrimiento del máximo de emisión de DIA al cambiar la longitud de onda de excitación (REES). $W = 10$</i>	140
<i>f) Estudio del tiempo de vida de fluorescencia de DIA en micelas inversas de Benceno/AOT/agua. $W = 10$.</i>	140
4. B-1. HC	141
<i>a) Variación de la concentración de AOT en micelas inversas de benceno/AOT. $W = 0$.</i>	142
<i>b) Estudio del tiempo de vida de HC en micelas inversas de Benceno/AOT. $W = 0$.</i>	145
<i>c) Estudio del corrimiento del máximo de emisión de HC al cambiar la longitud de onda de excitación (REES). $W = 0$.</i>	147

AÑO: 2008

<i>d) Variación de la concentración de AOT en benceno/AOT/agua. $W = 10$.</i>	148
<i>e) Estudio del tiempo de vida de fluorescencia de HC en micelas inversas de benceno/AOT/agua. $W = 10$.</i>	151
<i>f) Estudio del corrimiento del máximo de emisión de HC al cambiar la longitud de onda de excitación (REES).</i>	152
4. C-1. PRODAN	155
<i>1) Estudio en micelas inversas no acuosa de heptano/AOT/DMF y DMA</i>	155

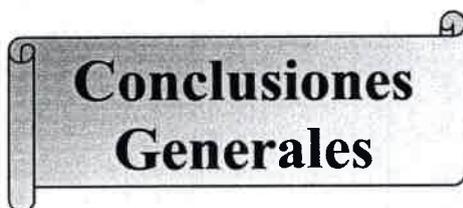
Capítulo 5

**Estudio en Vesículas
PRODAN, DPH DIA y HC**

5. A-1. PRODAN	163
<i>a) Efecto de la variación de [DOPC].</i>	163
<i>b) Efecto de la variación de [PRODAN] a una concentración de DOPC constante.</i>	167
<i>c) Estudio del corrimiento del máximo de emisión de PRODAN al cambiar la longitud de onda de excitación (REES).</i>	169
<i>d) Estudio de los tiempos de vida de fluorescencia de PRODAN en vesícula de DOPC.</i>	171
<i>e) Micropolaridad de la vesícula de DOPC.</i>	172
5. A-2. Estudio electroquímico en vesícula unilaminares grandes de DOPC.	173
5. B-1. HC y DIA	179
<i>a) Efecto de la variación de [DOPC]</i>	180
<i>b) Determinación de la constante de partición (K_p) de HC en DOPC.</i>	182
<i>c) Estudio del corrimiento del máximo de emisión de HC y DIA al cambiar la longitud de onda de excitación (REES).</i>	184

AÑO: 2008

<i>d) Estudio del tiempo de vida de fluorescencia de DIA y HC en vesícula de DOPC.</i>	186
<i>e) Depolarización de fluorescencia en estado estacionario de DIA y HC en vesícula de DOPC.</i>	188
5. B-1. DPH	189
<i>a) Efecto de la variación de [DPH]</i>	189
<i>b) Efecto de la variación de [DPH]</i>	190
<i>c) Estudio del corrimiento del máximo de emisión de DPH al cambiar la longitud de onda de excitación (REES).</i>	192
<i>d) Estudio de tiempos de vida de DPH en vesícula de DOPC.</i>	193



Conclusiones Generales

Medio Homogéneo
Vesículas
Micelas inversas

<i>Estudio en medio homogéneo</i>	195
<i>Estudio en micelas inversas de AOT</i>	196
<i>Estudio en vesículas unilaminares grandes de DOPC</i>	197
Abreviaturas	199
Anexo I	201
Referencias	203

Índice de Figuras

Figura 1. Arreglo cabeza cola de dos moléculas dipolares.	31
Figura 2. Agregación entre dos moléculas de hidrocarburo A y B en agua. Los óvalos sombreados representan moléculas de agua. Adaptado de referencia 10.	34
Figura 3. Diferentes zonas de un surfactante anfifílico tipo.	36
Figura 4. Propiedades que definen el parámetro de empaquetamiento de un surfactante.	38
Figura 5. Estructura de la micela directa e inversa.	42
Figura 6. Representación esquemática de una micela inversa de AOT. (1) Laguna acuosa; (2) Interfase micelar; (3) Fase orgánica.	45
Figura 7. Bicapa lipídica y corte transversal de una vesícula tipo.	49
Figura 8. Diferentes zonas de solubilidad de un fosfolípido tipo.	50
Figura 9. Ubicación del fosfolípido en la bicapa lipídica.	52
Figura 10. Transición de estado en una bicapa lipídica entre la fase de gel y la de cristal-líquido.	54

Figura 11. Temperatura de transición de fase para fosfolípidos de diferentes grupos polares en función de la longitud de la cadena hidrocarbona. Todos los ácidos grasos insaturados tienen su insaturación (cis (C) o trans(T)) en la posición 9. Adaptado Referencia 28	55
Figura 12. Ejemplo del cálculo de la temperatura de transición a partir de los valores de anisotropía de la fluorescencia (r). Adaptado Referencia 28	56
Figura 13. Efectos dinámicos de la membrana biológica: (a) rotación de los enlaces de carbono, (b) flexibilidad de la cadena hidrocarbonada, (c) fluctuación de la bicapa, (d) difusión transmembrana.	57
Figura 14. Gráfico típico de permeabilidad de la membrana en función de la temperatura. Figura adaptada a referencia 33.	58
Figura 15. Diagrama de Jablonski. Gráfico adaptado de referencia 101.	59
Figura 16. Representación esquemática de la hidratación de los fosfolípidos.	70
Figura 17. Extruder utilizado para la formación de vesículas unilaminares grandes de DOPC.	71
Figura 18. Representación del probable histograma de cuentas vs canales de tiempo en un experimento de conteo de fotón único. Adaptado de referencia.	72
Figura 19. Efecto de excitación en el borde rojo sobre el espectro de emisión. La línea sólida representa el espectro observado, la línea cortada representa las emisiones desde los estados F (Franck – Condon) y R (relajado). Grafico adaptado de referencia 101.	78
Figura 20. Foto del equipo de dispersión de luz utilizado en el laboratorio.	82
Figura 21. Esquema del circuito usado en esta técnica de barrido lineal de potencial y respuesta del sistema. Electrodo: (T) trabajo, (R) referencia y (C) contraelectrodo	88
Figura 22. Voltametría cíclica. a) Perturbación potenciostática; b) Respuesta en corriente.	89

AÑO: 2008

Figura 23. Espectros de emisión normalizados de PRODAN en medio homogéneo. $[\text{PRODAN}] = 1 \times 10^{-6} \text{ M}$. $\lambda_{\text{exc}} = 359 \text{ nm}$.	94
Figura 24. Espectros de absorción de PRODAN en agua variando la concentración.	98
Figura 25. Absorbancia vs. concentración de PRODAN en agua. $\lambda_{\text{max}} = 360 \text{ nm}$.	98
Figura 26. Espectros de emisión de la molécula de PRODAN en agua variando la concentración. $\lambda_{\text{exc}} = 389 \text{ nm}$.	99
Figura 27. Relación de intensidad entre la banda a 430 nm y 525 nm. $\lambda_{\text{exc}} = 389 \text{ nm}$	99
Figura 28. Voltagramas cíclicos de la PRODAN. Intervalo de potencial barrido 0 V- 0,6 V. $v = 50 \text{ mV seg}^{-1}$. $[\text{PRODAN}] = 6 \times 10^{-6} \text{ M}$. Electrodo de trabajo: alambre de Pt, electrodo de referencia: Ag/ClAg.	103
Figura 29. Variación de la i_p en función de $v^{1/2}$. $[\text{PRODAN}] = 6 \times 10^{-6} \text{ M}$. $[\text{LiClO}_4] = 0,1 \text{ M}$	105
Figura 30. Variación de la i_p en función de $v^{1/2}$. $[\text{PRODAN}] = 2 \times 10^{-5} \text{ M}$. $[\text{LiClO}_4] = 0,1 \text{ M}$.	105
Figura 31. Variación de la i_p en función de $[\text{PRODAN}]$. $[\text{LiClO}_4] = 0,1 \text{ M}$. $v = 50 \text{ mV seg}^{-1}$	106
Figura 32. Variación de i_p en función de $[\text{PRODAN}]$. $[\text{LiClO}_4] = 0,1 \text{ M}$. $v = 50 \text{ mV seg}^{-1}$.	107
Figura 33. Espectros de absorción UV-Visible de la molécula DPH en solventes puros. $[\text{DPH}] = 2,5 \times 10^{-6} \text{ M}$	108
Figura 34. Localización de la carga en el estado fundamental (E.F) y el estado excitado (E.E) de las hemicianinas. Siendo μ_g y μ_e los momentos dipolares en el estado fundamental y excitado respectivamente.	111
Figura 35. Espectros de emisión normalizados de DIA. $[\text{DIA}] = 1 \times 10^{-6} \text{ M}$	111
Figura 36. Corrimientos de la ν_{abs} (○), ν_{emi} (●) y ν_{00} (⊖) en solventes de diferentes polaridad. $[\text{DIA}] = 1 \times 10^{-6} \text{ M}$.	113
Figura 37. Regresión lineal de la ν_{abs} de DIA con el parámetro β . $[\text{DIA}] = 1 \times 10^{-6} \text{ M}$.	114

AÑO: 2008

Figura 38. Regresión lineal de las bandas de emisión de DIA con el parámetro β . [DIA] = 1×10^{-6} M.	115
Figura 39. Regresión lineal de los corrimientos de Stokes de DIA con el parámetro β de los solventes empelados. [DIA] = 1×10^{-6} M.	116
Figura 40. Corrimientos de la ν_{00} en solventes con diferentes β . [DIA] = 1×10^{-6} M.	116
Figura 41. Ancho de media banda (HW) de los espectros de absorción en distintos solventes de polaridad/polarizabilidad diferente. [DIA] = 5×10^{-6} M.	117
Figura 42. Ancho de media banda de los espectros de emisión en distintos solventes de polaridad/polarizabilidad diferente. [DIA] = 5×10^{-6} M.	118
Figura 43. Espectro de absorción normalizado de DIA en benceno. [DIA] = 1×10^{-6} M.	119
Figura 44. Espectro de emisión normalizado de DIA en benceno. [DIA] = 1×10^{-6} M.	119
Figura 45. Espectros de absorción de HC en diferentes solventes. [HC] = 1×10^{-5} M.	121
Figura 46. Espectros de emisión de HC en diferentes solventes. [HC] = 1×10^{-5} M.	121
Figura 47. Corrimientos de la ν_{abs} (●), ν_{emi} (○) y ν_{00} (⊖) en solventes de diferentes polaridad. [HC] = 1×10^{-5} M.	123
Figura 48. Regresión lineal de la frecuencia de absorción de HC con el parámetro β .	124
Figura 49. Regresión lineal de la frecuencia de emisión de HC con el parámetro β . [HC] = 1×10^{-5} M.	124
Figura 50. Correlación de los corrimientos de Stokes de HC con el parámetro β de los solventes empleados. [HC] = 1×10^{-5} M.	125
Figura 51. Corrimientos de la ν_{00} en solventes con diferentes β . [HC] = 1×10^{-6} M.	126
Figura 52. Ancho de media banda de los espectros de emisión en distintos solventes de polaridad/polarizabilidad	126

diferente. [HC] = 1×10^{-5} M.

Figura 53. Espectros de absorción de HC en benceno. [HC] = 2×10^{-5} M. **128**

Figura 54. Variación de absorción de HC en benceno. [HC]: a) 1×10^{-6} M, b) 4×10^{-6} M, c) 7×10^{-6} M, d) 1×10^{-5} M, e) $2,5 \times 10^{-5}$ M, f) 4×10^{-5} M. $\lambda = 471$ nm. **129**

Figura 55. Espectros de absorción de DIA en micelas inversas de benceno/AOT. $W = 0$. [DIA] 1×10^{-6} M. **132**

Figura 56. Espectros de emisión de DIA en micelas inversas de benceno/AOT. $W = 0$. [DIA] 1×10^{-6} M. **132**

Figura 57. Corrimientos máximos de absorción (●) y de emisión (○) de DIA en micelas inversas de benceno/AOT. $W = 0$. [DIA] 1×10^{-6} M. **133**

Figura 58. Banda 00 (ν_{00}) en micelas inversas de Benceno/AOT. $W = 0$ (○). [DIA] 1×10^{-6} M. **134**

Figura 59. REES ($\lambda_{\text{max. emi}}$ a λ_{exc} 520 nm – $\lambda_{\text{max. emi}}$ a λ_{exc} 470 nm) de DIA variando la concentración de AOT. [DIA] = 1×10^{-6} M. $W = 0$ (○). AOT (a) 1×10^{-3} M, (b) 2×10^{-3} M, (c) 7×10^{-3} M, (d) $1,9 \times 10^{-2}$ M, (e) $7,4 \times 10^{-2}$ M, (f) 0,1 M, (g) 0,2 M, (h) 0,3 M. **135**

Figura 60. Espectros de absorción de DIA en micelas inversas de benceno/AOT/agua. $W = 10$. [DIA] 1×10^{-6} M. AOT (a) 1×10^{-3} M, (b) 2×10^{-3} M, (c) 7×10^{-3} M, (d) $1,9 \times 10^{-2}$ M, (e) $7,4 \times 10^{-2}$ M, (f) 0,1 M, (g) 0,2 M, (h) 0,3 M. **137**

Figura 61. Espectros de emisión de DIA en micelas inversas AOT / Benceno / Agua. $W = 10$. [DIA] 1×10^{-6} M. AOT (a) 1×10^{-3} M, (b) 2×10^{-3} M, (c) 7×10^{-3} M, (d) $1,9 \times 10^{-2}$ M, (e) $7,4 \times 10^{-2}$ M, (f) 0,1 M, (g) 0,2 M, (h) 0,3 M. **138**

Figura 62. Corrimientos máximos de absorción (●) y de emisión (○) de DIA en micelas inversas de Benceno/AOT/agua. $W = 10$. [DIA] 1×10^{-6} M. **138**

Figura 63. Banda 00 (ν_{00}) en micelas inversas de benceno/AOT/agua. $W = 10$ (○). [DIA] 1×10^{-6} M. **139**

- Figura 64.** REES ($\lambda_{\text{max. emi}}$ a λ_{exc} 520 nm – $\lambda_{\text{max. emi}}$ a λ_{exc} 470 nm) de DIA variando la concentración de AOT. [DIA] = 1×10^{-6} M. W = 10 (●). AOT/ M: (a) 1×10^{-3} ; (b) 2×10^{-3} ; (c) 7×10^{-3} ; (d) $1,9 \times 10^{-2}$; (e) $7,4 \times 10^{-2}$; (f) 0,1; (g) 0,2; (h) 0,3. **140**
- Figura 65.** Espectros de absorción de HC en micelas inversas de benceno/AOT. W = 0. [HC] = 2×10^{-5} M. **142**
- Figura 66.** Espectros de emisión de HC en micelas inversas de benceno/AOT. W = 0. [HC] = 2×10^{-5} M. **143**
- Figura 67.** Corrimientos máximos de absorción (●) y de emisión (○) de HC en micelas inversas de benceno/AOT. W = 0. [HC] = 2×10^{-5} M. **144**
- Figura 68.** Variación de la absorción a $\lambda_{\text{Observado}} = 590$ nm en micelas inversas de benceno/AOT. W = 0. [HC] = 2×10^{-5} M **145**
- Figura 69.** REES ($\lambda_{\text{max. emi}}$ a λ_{exc} 515 nm – $\lambda_{\text{max. emi}}$ a λ_{exc} 450 nm) de HC variando la concentración de AOT. [HC] = 2×10^{-5} M. W = 0 (●). AOT (a) 0 M, (b) 1×10^{-3} M, (c) 5×10^{-3} M, (d) 1×10^{-2} M, (e) 5×10^{-2} M, (f) 0,1 M, (g) 0,2 M, (h) 0,3 M. **148**
- Figura 70.** Espectros de absorción de HC en micelas inversas de Benceno/AOT/agua. W = 10. [HC] 2×10^{-5} M. **149**
- Figura 71.** Espectros de emisión de HC en micelas inversas benceno/AOT/agua. W = 10. [HC] 2×10^{-5} M. **149**
- Figura 72.** Corrimientos máximos de absorción (●) y de emisión (○) de HC en micelas inversas de Benceno/AOT/agua. W = 10. [HC] 2×10^{-5} M. **150**
- Figura 73.** Variación de la absorción a $\lambda_{\text{Observado}} = 590$ nm en micelas inversas de benceno/AOT/agua. W = 10. [HC] = 2×10^{-5} M **151**
- Figura 74.** REES ($\lambda_{\text{max. emi}}$ a λ_{exc} 515 nm – $\lambda_{\text{max. emi}}$ a λ_{exc} 450 nm) de HC variando la concentración de AOT. [HC] = 2×10^{-5} M. W = 10. AOT (a) 0 M, (b) 1×10^{-3} M, (c) 5×10^{-3} M, (d) 1×10^{-2} M, (e) 5×10^{-2} M, (f) 0,1 M, (g) 0,2 M, (h) 0,3 M. **153**
- Figura 75.** Banda 00 (ν_{00}) en micelas inversas de Benceno/AOT/agua y en medio homogéneo. (◆) W = 10, **154**

AÑO: 2008

(◇) $W = 0$ y (-) medio homogéneo. $[HC] 2 \times 10^{-5} M$.

Figura 76. Espectro de absorción de PRODAN variando $[AOT]$ a $W_s = 2$ en micelas inversas no acuosas de heptano/AOT/DMF. $[AOT]$ a) $0M$, b) $5,1 \times 10^{-3}M$, c) $1,1 \times 10^{-2}M$, d) $2,9 \times 10^{-2}M$, e) $4,6 \times 10^{-2}M$, f) $0,1M$ **156**

Figura 77. Absorción de PRODAN en micelas inversas no acuosas a $\lambda = 342$ nm, en función de la $[AOT]$. **158**

Figura 78. Espectro de emisión de PRODAN variando la $[AOT]$ a $W_s = 2$ en micelas inversas no acuosas de heptano/AOT/DMF o DMA. λ_{exc} : 343 nm. $[AOT]$ a) $0M$, b) $5,1 \times 10^{-3}M$, c) $1,1 \times 10^{-2}M$, d) $2,9 \times 10^{-2}M$, e) $4,6 \times 10^{-2}M$, f) $0,1M$ **159**

Figura 79. Variación de la intensidad de PRODAN en micelas inversas no acuosas mirando a $\lambda = 440$ nm, en función de la $[AOT]$. **160**

Figura 80. Corrimientos en el máximo de absorción UV-Visible de PRODAN en vesículas unilaminares de DOPC. $[PRODAN] = 5 \times 10^{-6} M$ **164**

Figura 81. Espectros de emisión variando $[DOPC]$. $[PRODAN] = 5 \times 10^{-6} M$. $\lambda_{exc} = 319$ nm **165**

Figura 82. Corrimientos en el máximo de emisión de PRODAN en vesículas unilaminares de DOPC. $[PRODAN] = 5 \times 10^{-6} M$. $\lambda_{exc} = 319$ nm. **165**

Figura 83. Variación $\langle r \rangle$ de PRODAN en LUV de DOPC al variar la concentración de DOPC. $[PRODAN] = 1 \times 10^{-6} M$. $\lambda_{exc} = 319$ nm, $\lambda_{emi} = 490$ nm. **166**

Figura 84. Espectros de absorción UV-Visible de la molécula de PRODAN, variando su concentración, en vesículas unilaminares de DOPC. $[DOPC] = 1$ mg/ml. **168**

Figura 85. Absorbancia vs. concentración de la molécula de PRODAN en vesículas unilaminares grandes de DOPC. **168**

Figura 86. REES de la molécula PRODAN al variar la $[DOPC]$. $[PRODAN] = 5 \times 10^{-6} M$. $\Delta\lambda_{emi} = (\lambda_{emi} (exc 410nm) - (\lambda_{emi} (exc 319nm)))$. **169**

Figura 87. PRODAN totalmente incorporado, ubicado en diferentes entornos. Adaptación de la referencia 173. **170**

AÑO: 2008

- Figura 88.** Voltagramas cíclicos de la PRODAN a diferentes concentraciones de DOPC. Intervalo de potencial barrido 0,1 V- 0,6 V. $v = 50\text{mV Seg}^{-1}$. $[\text{PRODAN}] = 2 \times 10^{-4}$ M. $[\text{DOPC}]$: a) 0,25mg/ml, b) 0,5mg/ml, c) 1mg/ml, a) 1,5mg/ml. **174**
- Figura 89.** Variación de la ip en función de $v^{1/2}$. $[\text{PRODAN}] = 2 \times 10^{-4}$ M. $[\text{LiClO}_4] = 0,1$ M. $[\text{DOPC}]$: ■) 0,25mg/ml, ●) 0,5mg/ml, ▲) 1mg/ml, ▼) 1,5mg/ml ♦) 2mg/ml. **174**
- Figura 90.** Variación de la pendiente en función de la $[\text{PRODAN}]$. $[\text{PRODAN}] = 2 \times 10^{-4}$ M. $[\text{LiClO}_4] = 0,1$ M **175**
- Figura 91.** Variación de la pendiente de la Figura 89 en función de la $[\text{PRODAN}]$. $[\text{PRODAN}] = 2 \times 10^{-4}$ M. $[\text{LiClO}_4] = 0,1$ M **178**
- Figura 92.** Espectros de absorción de HC variando $[\text{DOPC}]$. $[\text{HC}] = 1 \times 10^{-5}$ M. **180**
- Figura 93.** Espectros de emisión de HC variando $[\text{DOPC}]$. $[\text{HC}] = 1 \times 10^{-5}$ M. $\lambda_{\text{exc}} = 450\text{nm}$. **181**
- Figura 94.** Variación del máximo de emisión de HC variando $[\text{DOPC}]$. $[\text{HC}] = 1 \times 10^{-5}$ M. **181**
- Figura 95.** Variación de la intensidad máxima de emisión de HC al variar $[\text{DOPC}]$. $\lambda_{\text{emi}} = 500$ nm. $[\text{HC}] = 1 \times 10^{-5}$ M. **182**
- Figura 96.** Ley de Lambert y Beer de: (○) HC, (●) DIA, $\lambda_{\text{abs}} = 450$ nm en vesículas de DOPC. $[\text{DOPC}] = 1$ mg/ml. **184**
- Figura 97.** REES, $\Delta\lambda_{\text{emi}} (\lambda_{\text{emi}} (\text{exc } 510\text{nm}) - (\lambda_{\text{emi}} (\text{exc } 400\text{nm})))$ para HC, $[\text{HC}] = 5 \times 10^{-6}$ M. **185**
- Figura 98.** Diferentes regiones de la bicapa. Región A: agua libre, relajación rápida del solvente. Región B: Interfase, relajación lenta y/o esta restringida por las uniones puentes de hidrogenos existente y la capacidad donora de dar electrones del medio. Región C: Región lipofílica, rápida relajación del solvente. Adaptado de la referencia 134 **186**

AÑO: 2008

- Figura 99.** Tiempo de vida de fluorescencia en función de la longitud de onda de emisión para (●) HC, (■) DIA, $\lambda_{exc} = 450$ nm en vesículas de DOPC. [DOPC] = 1 mg/ml; [HC] = 1×10^{-5} M; [DIA] = 1×10^{-6} M. **187**
- Figura 100.** Polarización de fluorescencia ($\langle r \rangle$) en función de la longitud de onda de emisión para (●) HC, (■) DIA, $\lambda_{exc} = 450$ nm en las vesículas de DOPC. [DOPC] = 1 mg/ml; [HC] = 1×10^{-5} M; [DIA] = 1×10^{-6} M. **188**
- Figura 101.** Espectros de absorción UV-Visible en vesícula. [DOPC] = 1mg/ml. **189**
- Figura 102.** Efecto de concentración de DPH en vesículas de DOPC. $\lambda_{Observado} = 341$ nm. [DOPC] = 1 mg / ml. **190**
- Figura 103.** Espectro de emisión de DPH en vesículas de DOPC. [DPH] = 5×10^{-6} M. $\lambda_{exc} = 357$ nm. **191**
- Figura 104.** Anisotropía en estado estacionario $\langle r \rangle$ en función de la [DOPC]. [DPH] = 5×10^{-6} M. $\lambda_{exc} = 357$ nm. $\lambda_{emi} = 430$ nm. **191**
- Figura 105.** Espectros de emisión de DPH a distintas λ de excitación. [DOPC] = 1 mg/ml [DPH] = 5×10^{-6} M **192**

Índice de Tablas

Tabla 1. Solubilidad y Polaridad	30
Tabla 2. Modelo geométrico de empaquetamiento de varios surfactantes. Adaptado de referencia 28.	39
Tabla 3. Concentración micelar crítica y número de agregación de algunos surfactantes. Valores de <i>cmc</i> obtenido de referencia 24 y 37 a 25°C.	41
Tabla 4. Algunos fosfolípidos fosfatídicos más empleados.	51
Tabla 5. Número de onda de absorción (ν_{abs}) y emisión (ν_{emi}) de PRODAN en diferentes solventes. [PRODAN] = 1×10^{-6} M. π^* , α y β parámetros obtenidos de referencia 154.	95
Tabla 6. Tiempos de vida de fluorescencia de PRODAN en agua. $\langle r_m \rangle$ and $\langle r_{ag} \rangle$ son los valores de anisotropía en estado estacionario del monómero y agregado respectivamente.	101
Tabla 7. Número de onda de absorción (ν_{abs}) y emisión (ν_{emi}) de la banda B ₁ de DPH en diferentes solventes. [DPH] = $2,5 \times 10^{-6}$ M. π^* y β parámetros obtenidos de referencia 154.	1098
Tabla 8. Frecuencia de absorción (ν_{abs}), emisión (ν_{emi}), corrimiento de stokes (ν_{stokes}) y banda cero – cero (ν_{00}) en diferentes solventes. [DIA] = 1×10^{-6} M. π^* y β parámetros del solventes obtenidos de referencia 154.	112
Tabla 9. Frecuencia de absorción (ν_{abs}), emisión (ν_{emi}), corrimiento de stokes (ν_{Stokes}) y banda 00 (ν_{00}) x (10^{-3} cm^{-1}) en diferentes solventes. [HC] = 1×10^{-5} M.	122
Tabla 10. Resumen de las correlaciones de las frecuencias máximas de absorción, emisión y corrimiento de stokes en	127

AÑO: 2008

(10^{-3} cm^{-1}) para HC y DIA.

Tabla 11. Tiempos de vida de HC a diferentes concentraciones en benceno. $\lambda_{\text{exc}} = 450 \text{ nm}$. **130**

Tabla 12. Tiempos de vida de DIA en micelas inversas de Benceno/AOT. $W = 0$. $[\text{DIA}] 1 \times 10^{-6} \text{ M}$. $\lambda_{\text{exc}} = 450 \text{ nm}$. **136**

Tabla 13. Tiempos de vida de DIA en benceno y en micelas inversas de benceno/AOT/agua a $W = 10$. $[\text{DIA}] 1 \times 10^{-6} \text{ M}$. $\lambda_{\text{exc}} = 450 \text{ nm}$. **141**

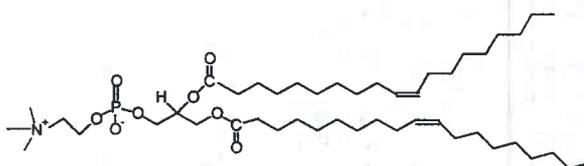
Tabla 14. Tiempos de vida de HC en micelas inversas de Benceno/AOT a $W = 0$. $[\text{HC}] 2 \times 10^{-5} \text{ M}$. $\lambda_{\text{exc}} = 450 \text{ nm}$. **146**

Tabla 15. Tiempos de vida de HC en micelas inversas de benceno/AOT/agua a $W = 10$. $[\text{HC}] 2 \times 10^{-5} \text{ M}$. $\lambda_{\text{exc}} = 450 \text{ nm}$. **152**

Tabla 16. Tiempo de vida de fluorescencia de PRODAN en LUV de DOPC. $[\text{PRODAN}] = 3 \times 10^{-5} \text{ M}$ **171**

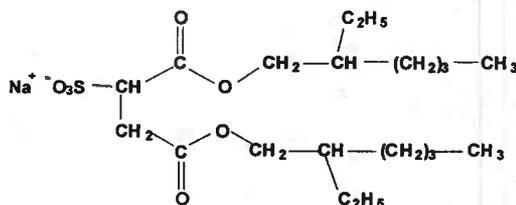
Glosario de moléculas

DOPC Di oleil fosfatidil colina.



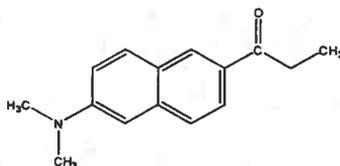
DOPC

AOT Dioctil sulfosuccinato de sodio.



AOT

PRODAN Propionil-2-dimetilamino naftaleno.



PRODAN

Objetivos

El objetivo principal de este trabajo de tesis es caracterizar las propiedades fisicoquímicas de micelas inversas acuosas y no acuosas formadas por el surfactante AOT y vesículas unilaminares grandes formadas por el fosfolípido DOPC, mediante el empleo de diferentes moléculas prueba. Para cumplimentar tales propósitos se propuso diferentes objetivos parciales que se detallan a continuación:

- a) Estudiar las interacciones generales y específicas existentes entre las moléculas prueba y el solvente, como así también las propiedades fisicoquímicas de moléculas prueba en el medio homogéneo. De las propiedades a estudiar se destaca el solvatocromismo de las moléculas prueba.
- b) Estudiar las propiedades fisicoquímicas, empleando diferentes solutos orgánicos micelas inversas de AOT/benceno/agua y micelas inversas no acuosas de AOT/heptano/dimetilformamida. Se enfatiza el estudio de las interacciones específicas, zonas dadoras de electrones y rigidez de los distintos microentornos de la interfaz donde se puede localizar la molécula prueba.
- d) Caracterizar mediante técnicas espectrofotométricas las vesículas unilaminares grandes de DOPC empleando diferentes solutos orgánicos. De esta manera, se pretende determinar las interacciones existentes entre el soluto y las vesículas de DOPC, como así también la rigidez del microentorno que esta sensado. Se destaca la polaridad de las diferentes regiones e interacciones específicas en los distintos sitios del medio microheterogéneo.

AÑO: 2008

e) Estudiar el comportamiento electroquímico de la molécula PRODAN en agua y en vesículas unilaminares grandes de DOPC, a fin de caracterizar la influencia que ejerce el medio en el proceso de transferencia de carga de la molécula. Además comparar las diferentes técnicas, espectrofotometría y electroanalíticas, mediante el cual se pudo caracterizar las vesículas unilaminares grandes de DOPC.

Para cumplir estos objetivos se investigaron, las propiedades de micelas inversas acuosas y no acuosas formadas por el surfactante dioctil sulfosuccinato de sodio (AOT). En micelas inversas acuosas el solvente externo empleado fue benceno mientras que, en micelas inversas no acuosas el solvente externo fue heptano y en este caso el solvente incorporado al corazón polar fue dimetilformamida. Las vesículas unilaminares grandes se formaron por el fosfolípido dioleilfosfatidil colina (DOPC).

Se usaron moléculas prueba tales como propionil-2-dimetilamino naftaleno (PRODAN), ioduro de trans-4-[4-(dihexadecil amino)-estiril]-1-metil piridinio (DIA), ioduro de trans-4-[4-(dimetilamino)-estiril]-1-metilpiridinio (HC) y 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH).

Con los estudios realizados en esta tesis doctoral se explicaron las diferencias entre las propiedades físicas y químicas de las moléculas prueba en medio homogéneo y en los sistemas organizados estudiados: micelas inversas y vesículas. Además, dependiendo del lugar donde estén localizadas en los sistemas organizados, fue posible inferir diferentes propiedades tales como: la micropolaridad, la viscosidad, las interacciones específicas, determinar constantes de partición, coeficientes difusionales, entre otros.

1

Sistemas Organizados

Micelas Inversas

Vesículas

Fundamentos Teóricos

A. SISTEMAS ORGANIZADOS

1. A-1. Reseña histórica

En los últimos cincuenta años, los estudios de los sistemas coloidales han sufrido una verdadera revolución¹, dejando de ser una colección de observaciones cualitativas del comportamiento macroscópico de algunos sistemas complejos, para llegar a convertirse en una disciplina poseedora de fundamentos teóricos sólidos. Todas las técnicas experimentales y los procedimientos teóricos, tanto de la física como de la química, se han aplicado al estudio de tales sistemas.

Los sistemas coloidales tienen la particularidad de poseer dos fases o componentes inmiscibles en un sistema, lo cual implica la existencia de una interfaz.¹ El impacto que tiene la ciencia en el estudio de interfaz en general y en particular en nuestra existencia día a día, revela la gran extensión en la cual estas áreas de la química y la tecnología química tienen sobre nuestras vidas. En efecto, es extremadamente difícil visualizar una situación cotidiana en donde no esté rodeada por gran número de interfaces, sean naturales o artificiales.¹ Desde los aspectos fundamentales de

la formación de la membrana biológica y función en células vivas hasta la fisicoquímica de las interacciones entre varias fases en interfaz.

Muchos de los fenómenos físicos y químicos encontrados en sistemas homogéneos tienen diferentes comportamientos en interfaz. Por ejemplo, las reacciones que ocurren en sistemas biológicos no pueden ser igualadas en velocidad y especificidad a las que ocurren en solución homogénea, al menos bajo condiciones ordinarias de presión y temperatura.² Por ende, su importancia ha crecido en muchas ramas de la química, incluyendo catálisis, química biológica y biomédica. El estudio formal de estos eventos ha sido y es aún, en algunos casos, una subdisciplina científica todavía poco explorada.¹

Por estas razones, la interdisciplinidad en ciencias químicas y biológicas en los últimos años ha crecido y hoy en día, es de gran interés en lo referido a la investigación. Sin embargo, la complejidad de los sistemas vivos a veces impide obtener la información suficiente sobre los eventos que en ellos ocurren, debido a que se tienen que considerar demasiados factores en un sistema "*in vivo*" (es decir, estudios llevados a cabo dentro de un organismo vivo o célula). En los enfoques tradicionales, para encontrar los factores importantes implicados en los procesos celulares, se aísla un factor de los otros componentes de la célula y es reconstituido "*in vitro*" (es decir, fuera de un organismo vivo, tal como en un laboratorio). Así, para entender el mecanismo catalítico y regulativo de una enzima, se purifica la enzima del extracto de la célula y se examina sus propiedades "*in vitro*". Si las propiedades de la enzima observadas en estos sistemas reconstituidos "*in vitro*" representan aquellas en el sistema "*in vivo*", es una pregunta que todavía intriga. Siempre es necesario un sistema sencillo con parámetros controlables para manipular y deducir los factores que gobiernan varios fenómenos. En otras palabras, un sistema "*in vitro*" que imite las condiciones "*in vivo*" ha sido siempre un tema de constante búsqueda para el mundo científico.

Una de las primeras metas dentro de dicha búsqueda debe ser la de determinar los diferentes tipos de interacciones moleculares responsables del comportamiento fisicoquímico de los sistemas a estudiar. Por ende, a continuación se resumen los diferentes tipos de interacciones moleculares, las cuales son la base de la formación de los sistemas organizados.

1. A-2. Interacciones Moleculares y Solubilidad

En forma simple, se pueden definir a las *soluciones* como fases líquidas homogéneas conteniendo una o más sustancias, las que se hallan en distintas proporciones. Generalmente al componente que se encuentra en exceso se lo llama *solvente* y al ó los que se encuentran en menor proporción se los llama *solutos*. El solvente no puede ser considerado como un continuo macroscópico caracterizado sólo por constantes físicas como son la densidad (δ), la constante dieléctrica (D) o el índice de refracción (η), sino como un medio discontinuo formado por moléculas individuales que interactúan mutuamente. De acuerdo a la magnitud de estas interacciones, existen solventes con una pronunciada estructura interna (como el agua) y otros donde las interacciones entre sus moléculas son débiles (como los hidrocarburos). Las interacciones entre las especies en un solvente (y en una solución) son, por un lado, demasiado fuertes como para ser tratadas por las leyes de la teoría cinética de los gases y, por el otro son demasiado débiles como para ser tratadas por las leyes del estado sólido. Por lo tanto ninguno de los dos modelos -el de los gases y el del cristal sólido- puede ser aplicado directamente para el tratamiento de las soluciones.³⁻⁷

Cuando un soluto se disuelve en un solvente, las moléculas de éste también interactúan con las moléculas del soluto. De hecho, estas interacciones entre las moléculas del soluto y las del solvente son las responsables de la solubilidad mutua. En la Tabla 1 se muestran cuatro casos para predecir en forma cualitativa la solubilidad.

Un compuesto A se va a disolver en el solvente B sólo si las fuerzas intermoleculares de atracción entre A-A y entre B-B pueden ser suplantadas, en la solución, por las fuerzas A-B.⁸ Las sumas de las fuerzas de interacción entre las moléculas de solvente y de soluto, pueden ser relacionadas a la llamada *polaridad* de A y de B. Compuestos capaces de interacciones fuertes A--A o B--B son casi siempre polares mientras que aquellos que tienen interacciones débiles son en general no polares.

Tabla 1. Solubilidad y Polaridad⁹

Soluta A	Solvente B	Interacciones			Solubilidad de A en B
		A---A	B---B	A---B	
No polar	No polar	débil	débil	débil	Alta ^a
No polar	Polar	débil	fuerte	débil	Baja ^b
Polar	No polar	fuerte	débil	débil	Baja ^c
Polar	Polar	fuerte	fuerte	fuerte	Alta ^a

^a No hay cambios significativos para el soluto o el solvente. ^b Difícil romper B---B. ^c Difícil romper A---A.

Las fuerzas intermoleculares pueden ser clasificadas en tres categorías diferentes:

a) Interacciones no específicas: son interacciones atractivas entre moléculas, que operan a distancias “grandes”, de varios radios de Van Der Waals. Estas interacciones intermoleculares pueden ser clasificadas en cuatro categorías distintas.^{10,11}

i) *Interacción ión-dipolo:*^{10,12}

Este tipo de interacciones se da entre iones y moléculas polares. Una molécula es *polar* si su centro de carga negativa (-q), no coincide con su centro de carga positiva (+q), es decir, si tiene un momento dipolar (μ) distinto de cero. Esta propiedad se define por la ecuación $\mu = q \times d$, donde d es la distancia de separación entre ambas cargas. Si la molécula contiene varios dipolos, entonces el momento dipolar neto estará dado por el vector suma de los momentos de cada uno.

Cuando estos dipolos se encuentran dentro del campo eléctrico que genera el ión, se orientan de manera tal que su carga atractiva respecto del ión (es decir el dipolo con carga opuesta), queda cerca de éste en tanto que la carga repulsiva queda alejada. Este tipo de interacciones son importantes en soluciones de compuestos iónicos, en solventes dipolares.

ii) *Interacción dipolo-dipolo*^{10,11}

Son las que aparecen entre moléculas polares. La energía potencial de interacción mínima entre dos dipolos, es atractiva y ocurre cuando los mismos están

orientados cabeza a cola, es decir, los centros de carga se ubican sobre la misma línea, tal cual lo muestra la Figura 1:



Figura 1. Arreglo cabeza cola de dos moléculas dipolares.

iii) *Interacción dipolo-dipolo inducido*^{10,11}

Aquí, el campo eléctrico de una molécula A con un momento dipolar permanente μ puede inducir un momento dipolar en una molécula B vecina no polar. Así, el dipolo inducido se encuentra siempre en la dirección del vector μ_A y, por lo tanto, siempre existe atracción entre las dos moléculas. El momento dipolar inducido será mayor cuanto mayor sea la polarizabilidad α_B (capacidad de distorsionar sus orbitales moleculares) de la molécula no polar. De la misma manera, una partícula cargada puede inducir un momento dipolar en una molécula vecina. En este caso, la fuerza de la interacción, ión-dipolo inducido, dependerá de la polarizabilidad de la molécula no polar y del campo polarizante ejercido por la carga del ión.

iv) *Interacción dipolo instantáneo-dipolo inducido. Interacciones dispersivas o fuerzas de interacción de London.*^{10,11,13}

Estas fuerzas de dispersión son de corto alcance y son las responsables de la agregación de moléculas que no poseen cargas ni momentos dipolares permanentes. El continuo movimiento de los electrones puede resultar, en un dado instante, en un momento dipolar pequeño que puede polarizar, o inducir, otro momento dipolar en una molécula vecina. Este acoplamiento sincronizado de los movimientos electrónicos resulta en una atracción neta de las moléculas. En moléculas con electrones π , las fuerzas dispersivas son bastante fuertes. Es interesante comparar la magnitud de las interacciones dispersivas con las dipolo-dipolo. Para dos moléculas de HCl, separadas por una distancia de sólo 0,3 nm, la interacción dispersiva es de $-1,13$ kJ/mol, mientras que la interacción dipolar es de $-4,6$ kJ/mol. Por lo tanto, las fuerzas dispersivas pueden ser considerablemente más importantes que las dipolares, aunque a grandes distancias la energía

dispersiva cae rápidamente con la distancia (r) debido a que la magnitud de la interacción depende de $1/r^6$.

b) Interacciones específicas: Incluyen puente de hidrógeno y complejos electrón - dador - aceptor (EDA). Son efectivas únicamente cuando las moléculas interactuantes tienen sitios específicos que pueden ponerse en contacto, es decir, a diferencia de las interacciones no específicas, requieren una aproximación mucho mayor entre las moléculas. Son direccionales y conducen a compuestos moleculares con estequiometría definida.

i) El puente de hidrógeno

Estas interacciones existen en moléculas que poseen grupos hidroxilos u otros grupos con un átomo de hidrógeno unido, covalentemente, a un átomo electronegativo. Una descripción general del puente o enlace de hidrógeno es: cuando un hidrógeno enlazado covalentemente a un átomo forma un segundo enlace no covalente con otro átomo, a este se lo denomina enlace por puente de hidrógeno. Entonces el puente de hidrógeno se forma por la interacción entre la molécula R-X-H (el *dador* de protón) y una 'Y-R' (el *aceptor*, que comúnmente posee un par de electrones disponibles para establecer el enlace coordinado), de acuerdo a la ecuación (1):



Donde X e Y son átomos más electronegativos que el H (ej., N, P, O, S, F, Cl, Br). El puente de hidrógeno puede ser *intermolecular* o *intramolecular*. Ambos tipos de puente de hidrógeno se pueden encontrar simultáneamente en un dado sistema, dependiendo de las características del soluto y del solvente.¹⁴⁻¹⁶ La energía del enlace oscila entre 12 y 42 kJ/mol, es decir que es diez veces más débil que un enlace covalente simple pero diez veces más fuerte que cualquiera de las interacciones intermoleculares no específicas.¹⁰ Los dadores del par de electrones (o aceptores de hidrógeno) más importantes son los átomos de oxígeno en alcoholes, éteres y compuestos carbonílicos; como así también los átomos de nitrógeno en las aminas alifáticas y heterocíclos. Por otra parte, los dadores de

hidrógeno más importantes son los grupos hidroxilo, amino, carboxilo y amida. Los electrones π de los compuestos aromáticos, alquenos y alquinos, también pueden actuar como aceptores de hidrógenos débiles.¹⁰

Los solventes dadores de puente de hidrógeno típicos son: el agua, los alcoholes, los ácidos carboxílicos y las amidas no sustituidas. Los solventes aceptores de puente de hidrógeno típicos son: aminas, éteres, cetonas y sulfóxidos. Se denominan compuestos anfipróticos a aquellos que pueden actuar como dadores o aceptores de puente de hidrógeno simultáneamente (por ejemplo el agua, los alcoholes, aminas y las amidas).

El puente de hidrógeno es de primordial importancia en la estabilización y estructura tridimensional de moléculas biológicas grandes en los organismos vivos (por ejemplo: celulosa, proteínas, ácidos nucleicos).

ii) *Complejos electrón - dador - aceptor (EDA)*

Los complejos EDA se establecen entre una molécula dadora de electrones, es decir, con potencial de ionización bajo, y otra molécula aceptora de electrones, es decir, con afinidad electrónica alta. Generalmente es aceptado que las características de la banda de absorción de mayor longitud de onda (banda de transferencia de carga) de esos complejos está asociada a la transferencia de electrones desde la molécula dadora hacia la aceptora.¹⁰

Los complejos EDA tienen una estequiometría y geometría definida. Su formación es un proceso de equilibrio y el complejo formado se disocia reversiblemente en sus componentes.^{17,18}

c) Interacciones hidrofóbicas: Este tipo de interacciones ocurren en sistemas donde los componentes tienen muy poca tendencia a interactuar físicamente y por lo tanto la disolución de uno en el otro es desfavorable. Cuando uno de los componentes es el agua, a este tipo de efecto se lo denomina *hidrofóbico* (repele el agua). Un ejemplo típico es la disolución de hidrocarburos en agua donde son extremadamente poco solubles. El proceso es exotérmico¹⁰ ($\Delta H < 0$) y como la energía libre del sistema aumenta ($\Delta G > 0$) la entropía debe disminuir ($\Delta G = \Delta H - T\Delta S$). Esto puede interpretarse como debido a un alto ordenamiento de las moléculas de agua alrededor del

hidrocarburo. Como consecuencia, el número de coordinación de las moléculas de agua aumenta de 3 o 3,5, en agua pura a 4 cuando se encuentran solvatando al hidrocarburo. Las moléculas de agua, gracias a su capacidad para coordinarse tetrahedricamente alrededor de un soluto, formarían estructuras no rígidas o “clatratos” alrededor del hidrocarburo. Aparentemente, en estas estructuras los enlaces puente de hidrógeno no son más fuertes que en el seno del agua líquida, pero sí hay un mayor ordenamiento de las moléculas.^{5,19} En otras palabras, se ha propuesto²⁰ que la insolubilidad de los hidrocarburos en agua no es debida a la necesidad de romper puentes de hidrógeno del solvente, sino que es un factor puramente entrópico. La entropía disminuye debido a un ordenamiento del solvente alrededor del soluto. Hasta el presente no existe una teoría simple que explique el origen de estos efectos hidrofóbicos y hay divergencia sobre su naturaleza.²¹ Cuando moléculas no polares se disuelven en agua tienden a agregarse, una forma gráfica de ver este efecto se muestra en la Figura 2. Al ponerse en contacto las moléculas de hidrocarburo A y B, disminuye el número de moléculas de agua que están en contacto directo con aquellas.

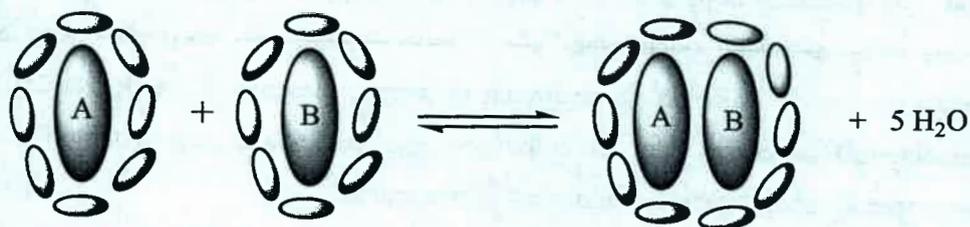


Figura 2. Agregación entre dos moléculas de hidrocarburo A y B en agua. Los óvalos sombreados representan moléculas de agua. Adaptado de referencia 10.

Por lo tanto, la entropía aumenta y aunque se requiere energía para destruir las capas de hidratación alrededor de A y de B ($\Delta H > 0$), la energía libre disminuye luego de la agregación ($\Delta G < 0$). Por esta razón, es energéticamente ventajoso para las moléculas no polares o grupos no polares en moléculas polares grandes, agregarse expulsando moléculas de agua de sus capas de hidratación. Este fenómeno se suele llamar *interacción hidrofóbica* y refleja la desventaja termodinámica de poner en contacto grupos hidrofílicos con grupos hidrofóbicos.¹⁰ Este efecto juega un rol muy importante en la estabilización de conformaciones particulares de polipéptidos y proteínas en agua, en la complejación bioquímica entre enzima y sustrato y en la

formación de agregados micelares en agua.¹ Este tipo de interacción no está limitada a sistemas acuosos, sino que se las ha observado en solución de etanol, glicerol, nitrato de etil amonio y otros solventes polares no próticos de modo que se sugiere la utilización del término *efecto (interacción) solvofóbico*.

1. A-3. Sistemas organizados

Para soluciones homogéneas regulares, es adecuada la idealización de un modelo teórico de mezclado al azar,²² sin embargo este no es útil para explicar el poder solvatante de las membranas biológicas. Esto se logra mediante el entendimiento de las *soluciones organizadas*. Las membranas biológicas, proveen compartimentos de tamaño, forma y microentorno definidos. En estos sistemas hay un alto grado de orden, resultado de las grandes y diversas áreas de interfaz que están concentradas en pequeños volúmenes.² La mayor parte del conocimiento de la estructura de la membrana biológica, se obtuvo a través de la investigación utilizando modelos de sistemas relativamente más simples tales como: micelas, microemulsiones, monocapas, bicapas, vesículas y liposomas. Estos modelos de organización son llamados en su conjunto *agentes imitadores de membrana* o *sistemas organizados*. Generalmente, estos sistemas son formados por moléculas que poseen propiedades y características anfifílicas. Una molécula anfifílica está caracterizada por poseer dos grupos que difieren marcadamente en la propiedad de solubilizarse en diferentes solventes. Estos compuestos fueron llamados en un principio, anfipáticos para denotar la presencia de un grupo lipofílico que tiene preferencia (simpatía) por medios no polares y un segundo grupo denominado lipofóbico, el cual no tiene preferencia (antipatía) por los mismos. También reciben comúnmente el nombre de *cola* y *cabeza polar*, respectivamente,² si el solvente es agua entonces los dos grupos reciben el nombre de *hidrofóbico* e *hidrofilico* respectivamente. En la literatura, los términos *lipofílicos*, *hidrófobos* y *cola*, son utilizados para describir, indistintamente, la misma parte del compuesto anfifílico. De manera similar, los términos *hidrofilico* y *cabeza polar* se refieren a la parte polar de la molécula.²³ Las investigaciones sobre la agregación de moléculas anfifílicas y formación de estructuras definidas en solventes no polares, datan desde hace aproximadamente cincuenta años.^{2,24} Sin embargo el interés de estos sistemas como medio de reacción y como sistemas modelos para llevar a cabo reacciones de interés biológico han surgido, a partir del final de los años setenta.²⁴⁻²⁶ La mayoría de las moléculas anfifílicas son llamadas

surfactantes, del inglés *surfactant* (*surface active agent*), porque se ubican preferentemente en una superficie o una interfase y juega un papel principal en los diferentes sistemas organizados. En la Figura 3 se muestra un esquema de un surfactante tipo.

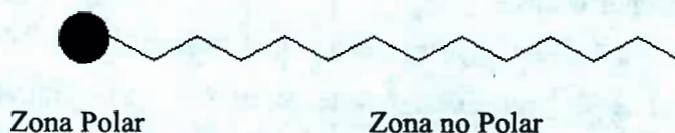


Figura 3. Diferentes zonas de un surfactante anfifílico tipo.

Aunque estos sistemas parecen diferir notablemente unos de otros tienen en común lo concerniente a la orientación, agregación y formación de estructuras entre las moléculas que las forman.² También pueden formarse por el agregado de un tercer o cuarto componente, resultando en sistemas binarios, terciarios o cuaternarios, respectivamente. A estos sistemas se los conoce como “microheterogéneos”, ya que a simple vista presentan una sola fase, como si fuese una solución homogénea. Sin embargo, estos sistemas son heterogéneos si son observados a escalas microscópicas ya que poseen dos o más de lo que se conoce con el nombre de “pseudofases” y por lo tanto algunas de sus propiedades no son uniformes en todo el seno de la solución. Este hecho tiene implicancias relevantes.¹ La distribución de un soluto en una solución de este tipo puede ser inhomogénea; pudiendo existir cavidades o cajas microscópicas con propiedades hidrofílicas o hidrofóbicas, que pueden disolver o no un soluto; o pueden existir superficies cargadas que afecten la distribución de solutos y la reactividad de éstos frente a otras moléculas. Es importante destacar que la mayoría de los sistemas microheterogéneos proveen soluciones ópticamente transparentes, isotrópicas y termodinámicamente estables,² requerimientos necesarios para los estudios espectroscópicos.

Las moléculas anfifílicas permiten controlar las propiedades del sistema y, según el caso y el uso, se califican como jabón, detergente, tensoactivo, emulsionante, dispersante, espumante, humectante, inhibidor de corrosión, etc. El surfactante juega un papel de primera importancia en los sistemas que poseen una fase continua líquida, en la cual el surfactante puede migrar por convección o difusión, tales como las espumas, las

emulsiones y las suspensiones.¹ Por eso se prefiere el neologismo *surfactante* a la palabra castellana tradicional *tensoactivo*, porque esta última implica una acción sobre la tensión superficial, lo que es sólo una de las propiedades de los surfactantes. Muchos científicos utilizan la palabra *surfactante* para denotar una sustancia que posee una actividad superficial o interfacial. Es necesario resaltar que no todos los anfífilos poseen tal actividad. Para que esto suceda es necesario que la molécula posea propiedades relativamente equilibradas, es decir, que no sea ni demasiado hidrófila ni demasiado hidrófoba.¹

Dependiendo del tipo de grupo polar los surfactantes se pueden clasificar en:^{27,28}
Aniónicos: carboxilatos, sulfonatos, entre otros, con contraiones tales como Na⁺, K⁺, etc. *Catiónicos*: sales de amonio o amonio cuaternario y contraiones como Cl⁻, Br⁻ etc.
Zwiteriónicos: ambas cargas presentes en el grupo como por ej. aminoácido de cadena larga, sulfobetaina. *No-iónicos*: mono glicérido de un ácido graso, polioxietilalquifenol.
Gemini (Gemelos): dos colas y dos cabezas polares.

Las interacciones existentes para un grupo polar iónico son típicamente diez veces más intensas que las interacciones apolares de la molécula anfifílica.¹ Es por ello que un balance de interacciones polares y apolares implica que un surfactante común posea un grupo apolar netamente más grande que su grupo polar iónico (carboxilato, sulfonato, sulfato, amonio, fosfato), además es común esquematizar al surfactante con una pequeña *cabeza* polar y una larga *cola* apolar tal como se muestra en la Figura 3. Ciertos anfífilos, como por ejemplo los sulfonatos de tolueno o de isopropil benceno, no son surfactantes porque su grupo apolar es demasiado pequeño y son sustancias esencialmente solubles en agua. El grupo polar en los surfactantes es, en general, un grupo funcional que contiene heteroátomos como O, S, N o P. Los grupos polares más comunes son: carboxilato, sulfonato, sulfato, amonio y fosfato, mientras que los grupos tales como hidroxilo y éter deben tener un cierto orden de multiplicidad para producir un grupo polar apropiado (poliol, poliéter). En cuanto al grupo apolar es, en general, una cadena hidrocarbonada de tipo alquilo ó alquil – arilo con típicamente 12 a 20 átomos de carbonos.²⁸

La propiedad fundamental de los surfactantes es la capacidad de auto – asociación tanto en agua como en solventes no polares.^{1,10,24}

En solución acuosa, las primeras moléculas de surfactante tienen una fuerte tendencia a migrar hacia una interfase y adsorberse en ella, y la fuerza motriz de tal adsorción es el efecto hidrófobo. La formación de una monocapa más o menos densa de surfactante en una interfase es la primera manifestación de la tendencia a asociarse.

1. A-4. Parámetro de empaquetamiento

Es posible asignarle al surfactante una estructura geométrica el cual se denomina parámetro de empaquetamiento (p), el cual determinara que sistema organizado es propenso a formarse. El parámetro de empaquetamiento²⁸ es un concepto que define la geometría molecular de un surfactante en función de las tres propiedades siguientes (Figura 4):

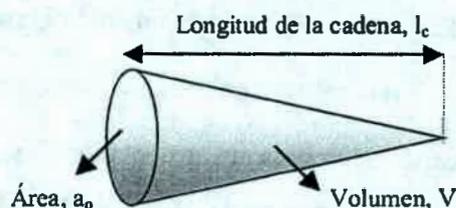


Figura 4. Propiedades que definen el parámetro de empaquetamiento de un surfactante.

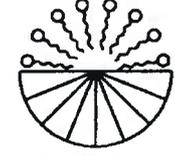
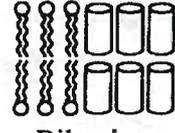
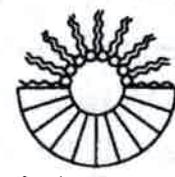
El valor de a_0 está regido por interacciones repulsivas entre las cabezas polares y fuerzas hidrófobas atractivas entre la interfase hidrocarburo-solvente polar. Los valores de V y l_c están determinados por la interacción estérica entre las cadenas y por la penetración del solvente no polar en la región hidrófoba del surfactante.

Matemáticamente p está definido como:²⁸

$$p = \frac{V}{a_0 l_c} \quad (2)$$

Cuando se trabaja con agregados formados por surfactantes, la forma geométrica que posean estas moléculas determinadas por el valor de p pueden influir en el tipo de agregado que se forme en un solvente dado (Tabla 2).

Tabla 2. Modelo geométrico de empaquetamiento de varios surfactantes. Adaptado de referencia 28.

Forma	Organización	Fase
 Cono invertido $p < 1/3-2/3$	 Micelas	Isotrópico Hexagonal I
 Cilindro $p \sim 1$	 Bilaminar	Laminar (Cúbico)
 Cono truncado $p > 1$	 Micelas Inversas	Hexagonal
 $p \sim 1$	 Bilaminar	Laminar

Así podemos observar que para: $p < 1/3$ se forman micelas esféricas en agua, $1/3 < p < 1/2$ se forman micelas cilíndricas en agua, $p \sim 1$ se forman fases laminares en agua o en hidrocarburos no polares (notar que esta geometría se puede lograr con una mezcla de surfactante) y $p > 1$ se forman micelas esféricas en hidrocarburos no polares. Cada una de estas estructuras corresponde al tamaño mínimo de agregado en el cual el surfactante alcanza un mínimo de energía libre.

Varios de estos sistemas microheterogéneos²⁹ fueron extensivamente estudiados desde diversos puntos de vista. En particular, es importante destacar el creciente interés en el estudios de *vesículas* o *liposoma*, como agentes imitadores de membrana,³⁰⁻³⁴

debido a que estos sistemas poseen en la interfase una bicapa lipídica, la cual es en principio idéntica a las membranas celulares naturales. Sin embargo, por su simplicidad los que recibieron más la atención respecto a la caracterización fueron los sistemas micelares.^{4,5,35,36}

B. MICELAS.

1. B-1. Introducción

Las micelas directas están formadas por surfactantes que se autoagregan espontáneamente en agua. En dicha estructura los surfactantes están asociados físicamente y no químicamente.²⁹ En micelas directas, los grupos polares, se orientan hacia el agua mientras que las cadenas hidrocarbonadas lo hacen hacia el interior de la micela (ver Figura 5). Su formación es un proceso de asociación cooperativa donde, a partir de una cierta concentración, llamada concentración micelar crítica (*cmc*), experimentalmente accesible y detectable por diferentes técnicas, se produce la formación del agregado. Las técnicas empleadas para determinar la *cmc* experimentalmente se basan en los cambios de las propiedades fisicoquímicas del medio al formarse las micelas.^{31,32} Estos cambios pueden ser en la presión osmótica (PO), turbidez (T), solubilización (S), tensión superficial (TS), conductancia equivalente (CE).

En este tipo de sistema organizado, micelas directas, es posible conocer el número de moléculas de surfactante que la forman el cual es conocido como “número de agregación”, N_{ag} , el mismo determina el tamaño y estructura del agregado^{1,23,24,37} (ver Tabla 3). En las micelas directas los valores de la *cmc* dependen fundamentalmente del tipo de surfactante.

Tabla 3. Concentración micelar crítica y número de agregación de algunos surfactantes. Valores de *cmc* obtenido de referencia 24 y 37 a 25°C.

Surfactante	Abreviatura	<i>cmc</i> (M)	N_{ag}
Decil sulfato de sodio	SDeS	$3,3 \times 10^{-2}$ M	50
Docecil sulfato de sodio	SDS	$8,1 \times 10^{-3}$ M	62
Hexadecil sulfato de sodio	SHS	$5,2 \times 10^{-4}$ M	100
Bromuro de dodecil trimetil amonio	DTAB	$1,5 \times 10^{-2}$ M	50
Bromuro de hexadecil trimetil amonio	HTAB	$9,0 \times 10^{-4}$ M	61
Cloruro de hexadecil trimetil amonio	HTAC	$1,3 \times 10^{-3}$ M	78
Cloruro de hexadecil piridinio	HPC	$9,0 \times 10^{-4}$ M	95
Polioxietilen Octil fenil eter	Triton X-100	$2,3 \times 10^{-4}$ M	140
Polioxietilenglicol dodecil eter	Brij-35	$1,0 \times 10^{-4}$ M	40
Polioxietilenglicol Hexadecil eter	Brij-56	$6,0 \times 10^{-7}$ M	620
n-Decil betaina	DeDAA	$1,5 \times 10^{-2}$ M	34
n-Dodecil betaina	DDAA	$1,5 \times 10^{-3}$ M	73

1. B-2. Micelas inversas

La asociación de surfactantes en solventes no polares es consecuencia predominantemente de interacciones dipolo-dipolo y de par iónico entre las moléculas anfifílicas. Esto es bastante diferente a las repulsiones electrostáticas, las cuales junto con las interacciones hidrofóbicas son una de las interacciones responsables de la micelización en agua. El proceso de agregación en solventes orgánicos es mucho más complejo que en agua y depende de la naturaleza y concentración del surfactante, del parámetro de empaquetamiento, de la naturaleza del contra-ión³⁸⁻⁴², de la temperatura, como también de las propiedades del solvente orgánico externo.^{28,43} En las micelas inversas, las moléculas de surfactante poseen sus grupo cabeza polares orientados hacia el interior, mientras que sus colas hidrocarbonadas se orientan hacia afuera donde se encuentra el solvente no polar. Estructuralmente, las micelas inversas son justamente lo opuesto a las micelas directas. Ver Figura 5.

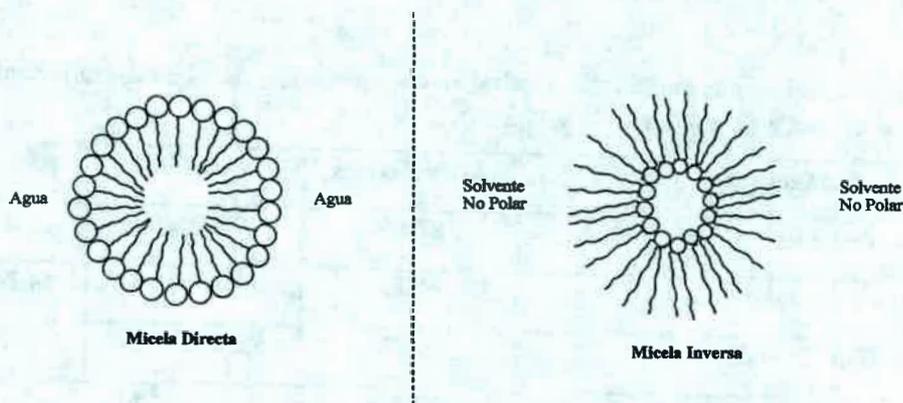


Figura 5. Estructura de la micela directa e inversa.

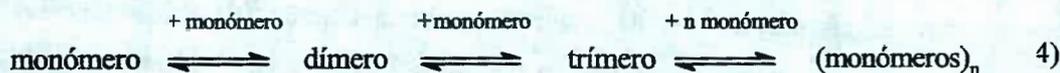
En ellas se pueden diferenciar al menos tres regiones: una región acuosa interna la cual también es conocida como “laguna o corazón polar acuoso” (water pool); la interfase (que es la región donde se ubican los grupos cabeza polares y contraiones del surfactante) y la fase orgánica externa.⁴⁴

Dentro de los surfactantes capaces de formar micelas inversas, hay ciertos surfactantes, que sufren un proceso de auto asociación del tipo mostrado en la ecuación (3):



donde el número “n” de moléculas de surfactante (monómero) que forman el agregado.

Sin embargo, existe otro tipo de surfactantes para los cuales el proceso de agregación ocurre en forma secuencial ecuación (4):



El concepto de *cmc*, en micelas inversas, es aceptado para sistemas que cumplen con el primer tipo de modelo de agregación (ecuación 3). El número de monómeros en cada agregado, N_{ag} , depende de la cantidad de agua que posea la micela.^{38,45}

Las micelas inversas se pueden formar en principio, en presencia o en ausencia de agua solubilizada.³⁸ Sin embargo, generalmente se propone que si el medio está completamente libre de agua, no se puede definir con exactitud una *cmc*, y en este caso los agregados formados son muy pequeños y polidispersos, indicando un mínimo de cooperatividad en la asociación del surfactante. Esto ha sido particularmente establecido para el dioctil sulfosuccinato de sodio (AOT) en diferentes solventes orgánico.^{38,46-48}

El empaquetamiento cercano de las cabezas polares del surfactante en un volumen vacío en el centro del corazón micelar, que sólo puede llenarse por agua de hidratación (o unida), explica por qué la presencia de agua es necesaria para formar un agregado grande de surfactante.⁴⁶⁻⁴⁸

Las micelas inversas pueden permitir la incorporación de cantidades sustanciales de agua en muchos solventes no polares, tales como los hidrocarburos.⁴⁸ Así, la presencia de surfactante y agua permite la solubilización de un amplio rango de solutos polares dentro del solvente orgánico.

Por otro lado, el agua solubilizada en el corazón acuoso exhibe propiedades fisicoquímicas que difieren de aquellas que se presentan en agua pura, que incluye la micropolaridad, la constante dieléctrica, la actividad, el punto de congelación, la eficiencia de la transferencia del protón, y las interacciones puente de hidrógeno, entre otros. El contenido acuoso en micelas inversas está definido como³⁷:

$$W = [\text{Agua}] / [\text{Surfactante}] \quad (5)$$

y el mismo se puede variar experimentalmente al cambiar la relación molar de agua a surfactante. Es por ello que el *W*, da idea de la cantidad de agua dispersa en una solución de micelas inversas y del tamaño de la misma.

Desde hace unos años⁴⁹⁻⁵⁵ se ha comenzado el estudio en este tipo de micelas reemplazando al agua por algún solvente polar tal como el etilen glicol (EG), formamida (FA), glicerol (Gly), propilen glicol (PG), dimetilformamida (DMF), dimetilacetamida (DMA). Estos sistemas organizados son llamados "micelas inversas no acuosas" (o sin agua). Un solvente sustituto del agua que forme microemulsiones fuertemente estructuradas, debe ser un solvente orgánico polar que sea insoluble en el

solvente orgánico no polar, que el surfactante posea una solubilidad muy baja en dicho solvente y que posea una constante dieléctrica relativamente elevada.⁵³⁻⁵⁵ Haciendo analogía con la ecuación (5), la relación molar entre el solvente polar y el surfactante se define como:

$$W_s = [\text{solvente polar}]/[\text{Surfactante}] \quad (6)$$

Estas micelas no han sido aún completamente exploradas y presentan un campo importante de investigación.⁵⁶⁻⁶¹ El interés por este tipo de microemulsiones radica en el estudio termodinámico de la formación de las microemulsiones, de las interacciones entre las partículas y debido a que son un medio novedoso para las reacciones químicas.^{49,51,52,62} Estos sistemas ofrecen algunas ventajas que los distinguen de los acuosos tales como: a) ofrecen mayores regiones de estabilidad; b) existe una gran variedad de surfactantes que pueden ser utilizados para formar las microemulsiones no acuosas; c) pueden ser empleadas como un muy buen medio de reacción para aquellos reactivos que reaccionan con el agua.^{49,62}

Es importante destacar que las micelas inversas son capaces de solubilizar moléculas biológicas hidrofílicas, como por ejemplo enzimas,⁶³ en solventes orgánicos donde no serían solubles sin la presencia del surfactante.

El tamaño de las micelas inversas puede ser de unos pocos diámetros de moléculas de surfactantes a muchos centenares. El tamaño general de la cavidad interior es obviamente un factor importante en la reactividad micelar, el cual controla factores tales como las concentraciones de reactivos, la ubicación de los mismos dentro de la cavidad, y el tamaño de partículas de producto. En cuanto a la reactividad en estos sistemas, la curvatura de la interfase es una propiedad importante pero, probablemente más importantes para la reactividad, son los cambios en las concentraciones de los grupos polares de los surfactantes en la interfase. Este parámetro que tiene un gran efecto en la estructura de la capa de surfactante y el solvente interfacial. Un motivo fundamental para estudiar las micelas inversas es que ellas proporcionan un sistema bien controlado para observar los efectos de la variación de la carga en una interfase, un problema de amplio interés para la química y la biología.^{64,65}

Las micelas inversas han sido aplicadas a la catálisis química, a la liberación de drogas, a la síntesis de nanoestructuras, y al desarrollo de materiales y ellas han sido

descriptas con frecuencia como “nanoreactores” (reactores de muy pequeñas dimensiones).^{44,48} Un motivo principal para que las micelas inversas sean tan útiles para la química, es que ellas crean una gran interfase entre las fases acuosa y no polar, permitiendo que se reúnan reactivos que prefieren fases diferentes.⁶⁶⁻⁷¹

Por otro lado, se han encontrado un número creciente de aplicaciones científicas y tecnológicas, tales como:^{64,65} proporcionar el control sobre el tamaño de micropartículas sintetizadas; tienen numerosas aplicaciones en los campos de solubilización y extracción; cambian mecanismos de reacción.^{44,66-71}

1. B-3. Micelas inversas de AOT. Estructura y propiedades

El AOT es uno de los surfactantes que se asocia según el modelo de la ecuación 3, por lo que el mismo es ampliamente utilizado en la formación de micelas inversas que son termodinámicamente estables. En la Figura 6 se muestra la estructura de una micela inversa de dicho surfactante. A causa de que dos cadenas de hidrocarburo ramificadas, AOT posee una alta relación de volumen de cola hidrofóbica a área superficial de cabeza de grupo, que es un factor importante en la posibilidad de formar micelas inversas.⁷²⁻⁷⁴ AOT es atractivo como surfactante modelo porque no requiere cosurfactantes para formar micelas inversas.

Varios grupos de trabajo han determinado el tamaño de micelas inversas de AOT/agua/hidrocarburos, utilizando diversas técnicas como son: ultracentrifugación^{80,32} técnicas estáticas⁸⁰ y dinámicas^{46,75,76} de dispersión de la luz, y por métodos de luminiscencia resueltos en el tiempo.⁷⁷⁻⁷⁹

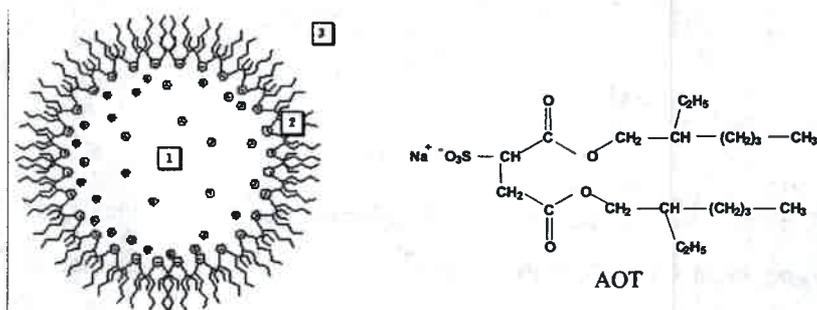


Figura 6. Representación esquemática de una micela inversa de AOT. (1) Laguna acuosa; (2) Interfase micelar; (3) Fase orgánica.

Estos agregados son relativamente monodispersos en solución y esféricos a bajas concentraciones de surfactante. Los agregados esféricos, que son el foco de este estudio, presentan una gama en el diámetro del corazón acuoso de aproximadamente 0,5 nm a más de 10,0 nm, el cual depende de la cantidad de agua solubilizada.⁴⁸

La máxima cantidad de agua que pueden disolver estos sistemas depende, en principio, de la temperatura; de la naturaleza química del medio dispersante. Por ejemplo, en benceno se puede llegar a $W = 12$ mientras que en n-heptano se alcanza un valor cercano a 50. En algunos sistemas y en ciertas condiciones es posible dispersar fácilmente 50 o más moles de agua por mol de surfactante solubilizado.⁸⁰

Suponiendo que la distribución de tamaño de las micelas inversas es homogénea, a un dado W y, además, teniendo en cuenta que la *cmc* de AOT es mucho más baja que la concentración de trabajo (para AOT la *cmc* varía entre 10^{-3} - 10^{-4} M),⁸¹ puede considerarse que prácticamente todas las moléculas de AOT se encuentran formando micelas inversas. Con estas consideraciones, el volumen total de agua (V) disuelto en un litro de solución de micelas inversas puede calcularse como sigue:⁴³

$$V = \frac{4}{3} \pi R_w^3 N_M \quad (7)$$

Donde R_w es el radio de la laguna acuosa y N_M es el número de micelas inversas. Además, dicho volumen de agua puede calcularse teniendo en cuenta la concentración molar de agua en el sistema dada por $[H_2O]$:

$$V = v N_A [H_2O] \quad (8)$$

Donde N_A es el número de Avogadro y v es el volumen por molécula de agua. De la misma forma el área superficial A , ocupada por la laguna acuosa en la micela inversa puede escribirse como:

$$A = 4\pi R_w^2 N_M \quad (9)$$

Si σ_{AOT} es el área ocupada por la cabeza polar de AOT en la interfase micelar, y teniendo en cuenta que todas las moléculas de AOT están formando micelas inversas, tenemos la siguiente expresión equivalente del área:

$$A = \sigma_{AOT} N_A [AOT] \quad (10)$$

dividiendo la ecuación (7) por la (8) y la (9) por la (10) se obtiene la siguiente ecuación:

$$\frac{4\pi R_w^3 N_M}{3v N_A [H_2O]} = \frac{4\pi R_w^2 N_M}{\sigma_{AOT} N_A [AOT]} \quad (11)$$

Tomando $v = 0,03 \text{ nm}^3$ y $\sigma_{AOT} = 0,6 \text{ nm}^2$, la ecuación 11 se transforma en:

$$R_w = 3 \frac{v}{\sigma_{AOT}} W = 0,15W \text{ (nm)} \quad (12)$$

donde $W = [\text{Agua}] / [\text{AOT}]$.

Esta última ecuación predice una dependencia lineal entre el radio de la laguna acuosa y la relación molar W , siempre que el área superficial por molécula de AOT no se modifique con W .⁸² Si, además, se incluye en la ecuación anterior la longitud de las cabezas polares del surfactante, se obtiene el llamado radio hidrodinámico (R_H) de las de micelas de AOT el cual resulta aproximadamente igual a:⁸²

$$R_H \text{ (nm)} = 1,7 + 0,15 W \quad (13)$$

Estos resultados se corroboraron con diferentes técnicas, también, para AOT utilizando los métodos antes mencionados^{76,79} y coinciden con el modelo de esfera para la estructura de los agregados micelares de AOT en solventes orgánicos.

1. B-4. Estructura del agua incorporada en micelas inversas de AOT

Existe una disputa fundamental acerca de la estructura del agua en el interior micelar. Es común suponer que el agua adopta dos o más estructuras en el interior micelar.⁴⁴ La aproximación más sencilla postula dos estructuras diferentes de agua, “unida” y “libre”, correspondiendo la primera, al agua que está cercana a los iones de la cabeza de grupo del surfactante en la interfase y agua que tiene más características de agua lejos de la interfase, respectivamente, tal cual se mencionó anteriormente. El agua unida tiene en comparación al agua neta, una movilidad mucho más restringida y mayor viscosidad, una red de puente de hidrógeno disminuida, menos polaridad o constante dieléctrica más pequeña. La transición del comportamiento sumamente rígido de micelas inversas más pequeñas a las propiedades más fluidas que se acercan al agua neta en las micelas inversas grandes, a menudo, ha sido modelada por una disminución en la proporción de moléculas de agua unida a libre. No hay, sin embargo, caracterización experimental directa de la estructura molecular de agua en la interfase.

Otros investigadores⁸³ han sugerido que el agua tiene una estructura uniforme dentro del interior, que es afectado sólo por la concentración general de iones y no por efectos locales. Ellos discuten que los experimentos previos, que fueron modelados por aproximaciones de múltiples estados⁸³, donde cada estado ha fijado las propiedades como una función del tamaño de la micela, pueden ser modelados también por un solo estado cuyas propiedades varían con el tamaño.⁸⁴

En cualquiera de los casos las características de las moléculas de agua incorporadas en las micelas inversas, dependen fuertemente de los valores de W ⁸⁵ y de la naturaleza de los grupos cabeza (polares) del surfactante. Cuando el contenido acuoso es bajo, todas las moléculas de agua interactúan con las cabezas del surfactante y contraiones y no se puede definir una laguna acuosa.^{46,85-87} Para el AOT, se ha demostrado que el agua está altamente estructurada hasta $W \cong 10$, lo cual se interpreta en términos de las interacciones entre las moléculas de agua y los grupos polares y contraiones del surfactante. El agua libre o “normal” predomina para $W > 20$, mientras que para $10 < W < 20$, se presentan situaciones intermedias en cuanto al comportamiento de las moléculas de agua.⁸⁷⁻⁹¹ Cabe aclarar que aún a W altos, el agua nunca tiene las propiedades del *agua normal*.⁹²⁻⁹⁴

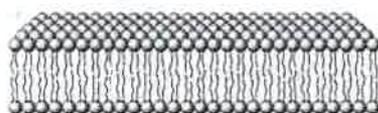
De esta manera, las micelas inversas representan un tipo de sistema organizado, que ofrece la ventaja extraordinaria de ofrecer moléculas de agua con diferentes estructura dependiendo del grado de hidratación, W; tal cual lo que ocurre con el agua solvatando la membrana biológica.

C. VÉSICULAS

1. C-1. Generalidades

Los mejores agentes imitadores de membrana son las *vesículas* o *liposoma*, debido a que estos sistemas poseen en la interfase una bicapa lipídica, la cual es en principio idéntica a las membranas celulares naturales. Es por ello que existe un creciente interés en el estudio fisicoquímico de *vesículas* o *liposomas*.³⁰⁻³⁴

Los surfactantes más utilizados en la preparación de vesículas son los fosfolípidos. Cuando moléculas de fosfolípidos son disueltas en agua, forman espontáneamente una bicapa lipídica, la cual queda completamente cerrada al suministrar energía al sistema.^{1,28} De esta manera se obtiene un sistema esférico, cerrado, selectivamente permeable constituido por una bicapa lipídica que atrapa parte del solvente en el que se encuentran dispersas libremente, tal sistema es denominado vesícula o liposoma. Cabe aclarar que, en esta tesis doctoral se habla de vesícula o liposoma de modo indistinto, sin embargo una clasificación más rigurosa denomina liposomas a aquellos sistemas organizados en el cual el surfactante es de origen natural, mientras que si el surfactante es sintético se denomina vesícula. En la Figura 7 se observa una bicapa lipídica y una vesícula típica.



Bicapa Lipídica



Vesícula

Figura 7. Bicapa lipídica y corte transversal de una vesícula tipo.

Una característica básica de los fosfolípidos, y de la que derivan sus principales propiedades como agentes imitadores de membranas biológicas, es su propiedad anfifílica. Es por ello que son ampliamente usados en la formación de vesículas de diferentes tamaño y forma.

1. C-2. Estructura química de los fosfolípidos

En los fosfolípidos⁹⁵ podemos distinguir químicamente tres grandes grupos: alcohol, ácido fosfórico y ácido graso. Dependiendo del alcohol que posea, se los subdivide en: glicerofosfolípidos (cuando el alcohol es glicerol) y en esfingofosfolípidos (cuando el alcohol es esfingosina):

Los glicerofosfolípidos son los fosfolípidos más abundantes y el principal constituyente estructural de las membranas biológicas y es por ello que son los surfactantes más empleados para formar vesículas. Los fosfolípidos son un tipo de lípidos polares compuestos por un glicerol, al que se le unen dos ácidos grasos (R_1 , R_2) por convención los ácidos grasos se consideran que ocupan la posición 1 y 2 del glicerol (1,2-diacilglicerol) y un grupo fosfato. El fosfato se une mediante un enlace fosfodiéster a otro grupo de átomos (G), que frecuentemente contienen nitrógeno, como colina, serina o etanolamina y muchas veces posee una carga (ver Figura 8).

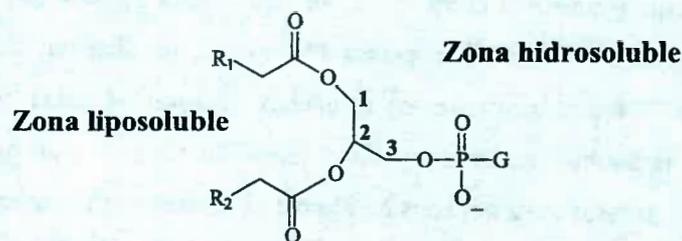
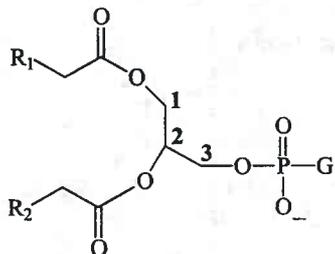
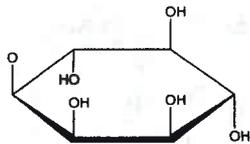


Figura 8. Diferentes zonas de solubilidad de un fosfolípido tipo.

En la Tabla 4 a modo de ejemplo, se muestra los diferentes grupos polares (G) que puede contener un glicerofosfolípido, de la misma se desprende que el fosfolípido puede ser: zwitteriónico, aniónico, catiónico o neutro.

Los fosfolípidos naturales y/o sintéticos pueden tener diferentes cadenas de ácidos grasos, la misma puede estar referida tanto a su longitud como a su insaturación. Los ácidos grasos de fuentes naturales poseen números pares de átomos de carbonos, debido a que en su biosíntesis las cadenas se construyen cada dos unidades de átomos de carbono. Además, en este proceso la primera insaturación ocurre a partir del carbono 9 y es de forma *cis*.²⁸ Puede haber posteriores insaturaciones que estén separadas por un grupo metileno, pero siempre es conservada la configuración *cis*.

Tabla 4. Algunos fosfolípidos fosfatídicos más empleados.

Cuerpo fosfatidil	Cabeza Polar (-G)	Nombre común	Abreviatura
	$\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	<i>Fosfatidilcolina</i>	PC
	$\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_3^+$	<i>Fosfatidiletanolamina</i>	PE
	$\text{O}-\text{CH}(\text{NH}_3^+)(\text{COO}^-)$	<i>Fosfatidiserina</i>	PS
	$\text{O}-\text{CH}_2-\underset{\text{OH}}{\text{CH}}-\underset{\text{OH}}{\text{CH}_2}$	<i>Fosfatidilglicerol</i>	PG
	OH	<i>Ácido</i>	PA
		<i>Fosfatidilinositol</i>	PI

En la mayoría de los fosfolípidos naturales las cadenas de los ácidos grasos esterificados son diferentes, estando a menudo el ácido graso saturado esterificado en el carbono 1 del glicerol, mientras que el ácido graso insaturado se encuentra en el carbono 2 y generalmente es más largo. Los ácidos grasos naturales insaturados más abundantes son el palmítoleico (C16:1), oleico (18:1), linoleico (18:2), no obstante la abundancia puede variar dependiendo de cuál es la fuente de extracción. Los ácidos grasos independientemente de su longitud, ya sean saturados o insaturados forman la zona liposoluble de la molécula del glicerofosfolípido (anfifílica). La parte hidrofílica

del liposoma está compuesta por el ácido fosfórico que a su vez se encuentra esterificado con diferentes grupos (G).

1. C-3. Inclinación de los ácidos grasos

En lo referido a la ubicación de los ácidos grasos en la bicapa lipídica podemos decir que, los mismos están perpendicular a la superficie con una ligera inclinación de 58° , de esa forma ocupan la mayor superficie posible de los intersticios vacíos originados por las cabezas polares (mayor volumen), de esa manera se maximiza las interacciones hidrófobas. Por lo tanto el balance de interacciones polares y apolares es completo. Tal como puede observarse en la Figura 9 el glicerol queda aproximadamente paralelo a la superficie de la membrana.

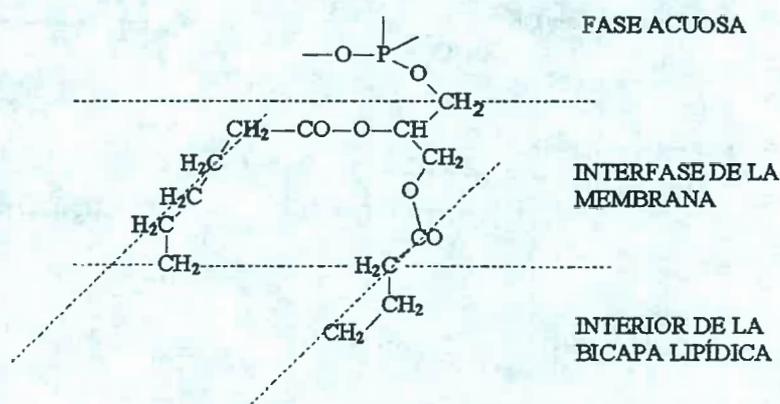


Figura 9. Ubicación del fosfolípido en la bicapa lipídica.

1. C-4. Estructura de las vesículas.

Las vesículas pueden ser clasificadas por su tamaño y forma.^{31,32} El rango del tamaño que pueden presentar es amplio. Las vesículas más pequeñas (~ 20 nm) que se pueden obtener están determinadas por la máxima proximidad que pueden soportar las cabezas polares de las moléculas anfifílicas, por el aumento de la curvatura especialmente de la monocapa interna y por el empaquetamiento que las moléculas anfifílicas. Las vesículas más grandes son visibles bajo microscopio con un diámetro próximo a las dimensiones de las células vivientes (~ 10 μm). Las vesículas independientemente de su tamaño pueden estar formadas por una única bicapa (unilaminares) o por múltiple bicapas concéntricas (multilaminares). Los métodos para formarlas son importantes ya que determinan el tamaño y forma de vesícula se obtiene. Entre los más conocidos podemos nombrar la sonicación, extrusión, prensa francesa,

desmulsificación, doble emulsión evaporación en fase reversa, etc. Así es común encontrar en la literatura.^{31,32}

- *Vesículas multilaminares grandes* (M.L.V.) Usualmente consisten en una población de vesículas en un amplio rango de tamaño (100 - 1000 nm), generalmente formadas por cinco o más bicapas concéntricas.

- *Vesículas unilaminares pequeñas* (S.U.V.) Éstas son las que se encuentran en el límite de menor tamaño posible. Este límite varía con las condiciones del medio de fuerza iónica y con la composición del lípido de la molécula anfipática. Para las vesículas de fosfatidilcolinas el tamaño está comprendido entre 20 a 50 nm. Estas poblaciones son altamente homogéneas en términos de tamaños. La distribución de los fosfolípidos en estas organizaciones es de 1/3 en la parte interna y 2/3 en la monocapa externa por razones geométricas.

- *Vesículas unilaminares grandes* (L.U.V.) El diámetro de éstas está comprendido entre 50 a 500 nm. La distribución de los fosfolípidos aquí es tal que la mitad de las moléculas se distribuyen en cada monocapa.

- *Vesículas unilaminares gigantes* (G.U.V.) El diámetro de éstas está comprendido entre 10 a 500 μm .

Anteriormente se mencionó que los fosfolípidos debido su propiedad anfifílica son los surfactantes por excelencia en la formación de vesículas. Es por ello que se ve la necesidad de comenzar a detallar los conocimientos en cuanto a su estructura y diferentes propiedades fisicoquímica que estos poseen.

1. C-5. Fluidez de la bicapa

Los fosfolípidos que forman las vesículas pueden encontrarse, en función de la temperatura, en dos estados o fases diferentes: fase de *gel* (las cadenas hidrocarbonadas del fosfolípido están rígidas), y fase de *crystal-líquido* o *fluida* (las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos están móviles). La temperatura a la cual se produce el cambio de estado de gel a crystal-líquido se denomina *temperatura de transición* (T_T) (Figura 10). A valores de temperatura inferiores a la T_T , el fosfolípido se encuentra en fase gel y a valores superiores, se encuentra en fase de crystal-líquido.^{28,31,32}

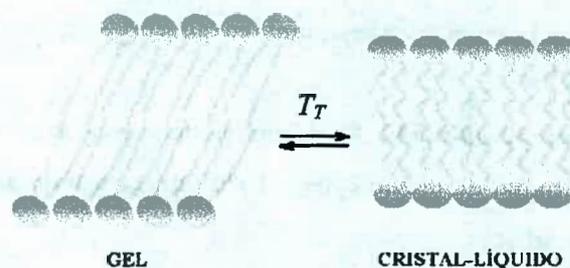


Figura 10. Transición de estado en una bicapa lipídica entre la fase de gel y la de cristal-líquido.

En el caso de que las vesículas estén formadas por una clase de fosfolípidos, la T_T está bien definida y la transición se produce de forma altamente cooperativa. Sin embargo, en los sistemas más complejos en donde existe la posibilidad de formar vesículas empleando mezclas de fosfolípidos, la transición de fase se produce en un intervalo de temperatura, denominada *temperatura de pre-transición* y es allí donde existe una baja cooperatividad.^{96,97}

El valor de T_T depende de las propiedades de los fosfolípidos que constituyen la bicapa, es decir, depende de la longitud de la cadena hidrocarbonada, del grado de insaturación, de la cabeza polar y de factores externos. La presencia de fosfolípidos de cadena corta o con insaturaciones en sus cadenas hidrocarbonadas produce un descenso de T_T , debido a que una menor longitud de las cadenas reduce la tendencia de las colas a interactuar entre ellas, y la presencia de dobles enlaces producen torsiones en las colas apolares que pueden facilitar su movilidad. Por otra parte, la presencia de fosfolípidos saturados en la bicapa, aumenta el valor de la T_T debido a que estos fosfolípidos presentan una elevada capacidad de agrupación y baja movilidad.⁹⁸

En la Figura 11 se muestra a modo de ejemplo, diferentes temperaturas de transición en función de la cadena hidrocarbonada de los fosfolípidos, grados de insaturación y grupos polares.

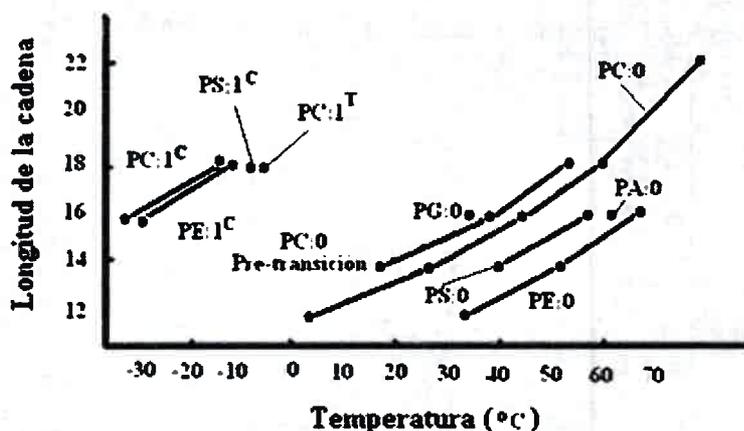


Figura 11. Temperatura de transición de fase para fosfolípidos de diferentes grupos polares en función de la longitud de la cadena hidrocarbonada. Todos los ácidos grasos insaturados tienen su insaturación (cis (C) o trans(T)) en la posición 9. Adaptado Referencia 28

Si se compara el fosfolípido PC:0 con aquellos que poseen insaturación cis o trans en la cadena hidrocarbonada, PC:1^C y PC:1^T respectivamente, se observa que la T_T es mayor para el fosfolípido que posee la cadena saturada. Con lo cual, si uno quisiera trabajar en la fase-cristal líquido con el fosfolípido PC:0, se debería trabajar a una temperatura superior de 60 °C; mientras que trabajando a temperatura ambiente, los fosfolípidos de cadena insaturada se encontrarían en la fase-cristal líquido. Además se puede observar, la T_T para PC:1^C < PC:1^T. Esto se debe a que si bien ambos presentan insaturación, la conformación cis del fosfolípido en la bicapa, presenta un quiebre que origina mayor torción en las colas apolares, aumentando la movilidad de las cadenas y disminuye por lo tanto la T_T .

Las técnicas microcalorimétricas, constituyen el método preferencialmente empleado para determinar los valores de T_T , así como los parámetros termodinámicos asociados al cambio de fase de los lípidos. No obstante, el cálculo de la T_T puede realizarse también por otras técnicas, como la resonancia magnética nuclear (RMN), la resonancia de spin electrónico o la fluorescencia. En la Figura 12 se muestra un ejemplo de determinación de T_T por fluorescencia. El cálculo se realiza a partir de las variaciones de la anisotropía de una sonda fluorescente frente a los cambios de temperatura. El punto de inflexión de la curva obtenido en la Figura 12 corresponde a la

temperatura de transición. El cálculo de T_T proporciona información relativa a la movilidad de la bicapa y a la posible localización de moléculas en la misma.

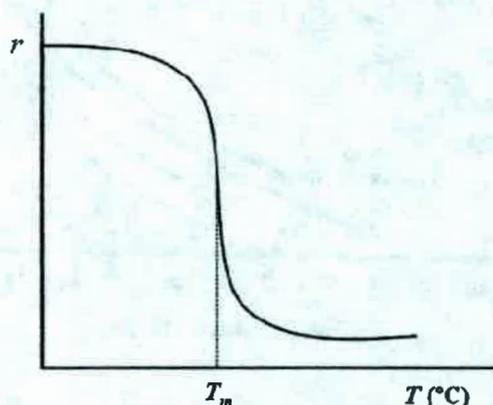


Figura 12. Ejemplo del cálculo de la temperatura de transición a partir de los valores de anisotropía de la fluorescencia (r). Adaptado Referencia 28

Al pasar de una fase a otra, existen diferentes procesos dinámicos de los fosfolípidos en la bicapa lipídica. Los principales procesos dinámicos que ocurren en una la interfaz lipídica de las vesículas se definen a continuación²⁸.

-*Rotación de los enlaces C-C*: Movimiento de rotación alrededor de las uniones C-C a lo largo de las cadenas hidrocarbonadas de los ácidos grasos (Figura 13a).

-*Flexibilidad de la cadena hidrocarbonada*: Las cadenas hidrocarbonadas de ácido graso presentan un alto grado de movilidad, sobretodo en el caso de cadenas que presenten dobles enlaces en su estructura (Figura 13b).

-*Fluctuaciones*: Movimientos de la bicapa similares a ondulaciones de la misma (Figura 13c). Las máximas fluctuaciones de las membranas suelen presentarse en las proximidades de la fase de transición de los lípidos que constituyen la bicapa.

-*Difusión transmembrana*: La difusión transmembrana o *flip-flop*⁹⁹ es un movimiento de translocación de una molécula (generalmente de fosfolípido) de una mitad a otra de la bicapa (Figura 13d).

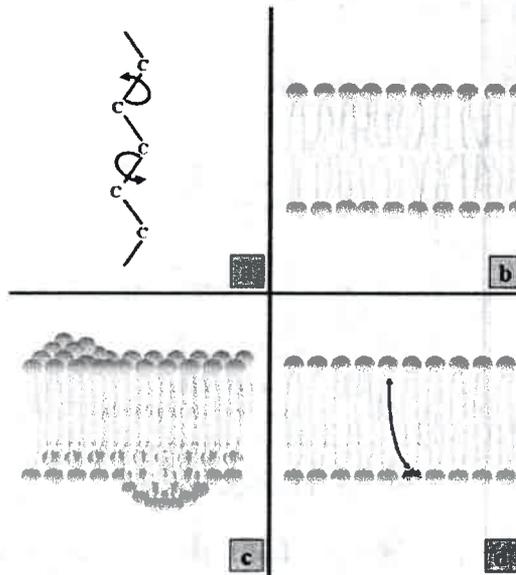


Figura 13. Efectos dinámicos de la bicapa lipídica: (a) rotación de los enlaces de carbono, (b) flexibilidad de la cadena hidrocarbonada, (c) fluctuación de la bicapa, (d) difusión transmembrana.

1. C-6. Permeabilidad de la membrana

La membrana regula la difusión de diferentes moléculas a través de la bicapa, permitiendo la entrada de unas y restringiendo el paso a otras. Esta propiedad se llama permeabilidad. La permeabilidad de la bicapa en las vesículas está dada por la dinámica y comportamiento de la fase de la membrana. En general, los máximos desordenes estructurales en las membranas está dado a la T_T^{100} y es allí donde generalmente se encuentra la máxima permeabilidad de diferentes solutos (Figura 14).

Moléculas polares y de peso molecular alto, atraviesan la membrana lentamente ($\sim 10^{-8}$ cm/seg para glucosa); mientras que moléculas pequeñas con carga neutra (agua y urea) difunden a través de la misma con mayor rapidez (10^{-4} - 10^{-5} cm/seg para el agua).

El estudio de diferentes iones cargados muestra que existen diferencias significativas en cuanto a la permeabilidad en la bicapa de las vesículas. Por ejemplo: para un mismo tipo de fosfolípido, los iones monovalentes como H^+ y OH^- atraviesan la membrana bastante rápido (10^{-3} - 10^{-6} cm/seg), en comparación con los de Na^+ y K^+ (10^{-12} - 10^{-14} cm/seg). Estos iones, no solo atraviesan lentamente la bicapa lipídica en comparación con H^+ , sino que también difunden más lentamente si se los compara con iones monovalentes cargados negativamente, NO_3^- y Cl^- ($\sim 10^{-10}$ cm/seg).

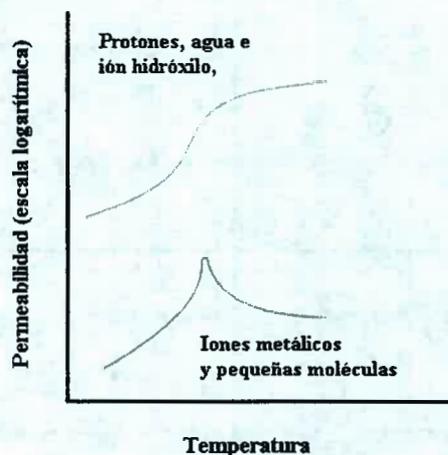


Figura 14. Gráfico típico de permeabilidad de la membrana en función de la temperatura. Figura adaptada a referencia 31.

Al parecer, el mecanismo de difusión de iones metálicos a través de la membrana lipídica es diferente a otras especies moleculares. Un ejemplo de ello es que la permeabilidad de los iones Na^+ disminuye con el incremento en la insaturación de las cadenas hidrocarbonadas de los ácidos grasos, mientras que la permeabilidad para la glucosa aumenta. La explicación reside en que los iones metálicos atraviesan el espesor de la bicapa lipídica como resultados de una simple rotación de enlaces C-C. Al incrementar la insaturación en la bicapa, los enlaces no pueden rotar libremente y tienden a impedir el progreso de estos iones. En tanto que, para la glucosa el comportamiento es diferente. La glucosa aumenta la difusión en la membrana debido a los cambios conformacionales de la bicapa originados por el incremento en la insaturación.

Para iones divalentes y otros polivalentes la permeabilidad es menor que si se la compara con los iones monovalentes, esto es debido al aumento en la esfera de hidratación que solvata tales iones.

D. TÉCNICAS Y FUNDAMENTOS

1. D-1. Procesos primarios de espectrofotometría molecular

Los procesos en los cuales ocurre la absorción y emisión de la luz son usualmente ilustrados por un diagrama de Jablonski.¹⁰¹⁻¹⁰² Un diagrama típico del mismo se muestra en la Figura 15. A temperatura ambiente, la energía térmica no es

suficiente para poblar significativamente los estados vibracionales superiores del estado fundamental y por lo tanto, la absorción generalmente ocurre para moléculas con energía vibracional más baja. Normalmente las moléculas son excitadas a algún nivel rotacional de un estado vibracional de un estado electrónico singulete superior (S_1 , S_2), luego las mismas se relajan al nivel vibracional más bajo de S_1 . Este proceso es llamado conversión interna y generalmente ocurre a los 10^{-12} seg o menos. Debido a que el tiempo en que la molécula permanece en estado excitado está cercano a 10^{-8} seg, la conversión interna se completa generalmente previa a la emisión.

Por lo tanto, la emisión de fluorescencia generalmente proviene desde un estado excitado equilibrado térmicamente, es decir, del estado vibracional de energía más baja de S_1 . El retorno al estado fundamental típicamente ocurre hacia un nivel vibracional de energía superior de dicho estado, luego rápidamente (10^{-12} seg) se alcanza el equilibrio térmico. Una consecuencia interesante de la emisión a altos niveles vibracionales del estado fundamental, es que el espectro de emisión es generalmente la imagen especular del espectro de absorción de la transición $S_0 \rightarrow S_1$.^{101,102} Además, el proceso de fluorescencia muestra algunas características generales:

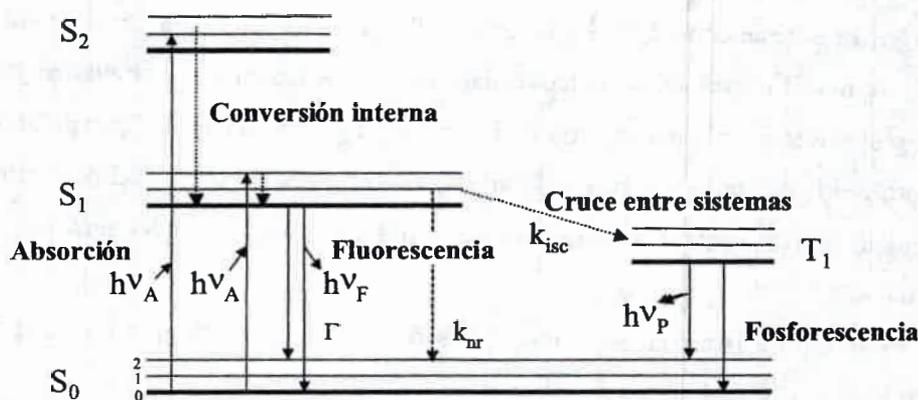


Figura 15. Diagrama de Jablonski. Gráfico adaptado de referencia 101.

i) Corrimiento de Stokes: examinando el diagrama de Jablonski, es posible observar que la energía de la emisión es generalmente menor que la de absorción. Por lo tanto, la fluorescencia siempre ocurre a menores energías o mayores longitudes de onda que la absorción. Esta pérdida de energía se debe a una variedad de procesos dinámicos, que

ocurren luego de la absorción de luz y se denomina corrimiento de Stokes.^{101,102}

Matemáticamente se lo expresa como $v_{\text{Stokes}} = v_{\text{abs}} - v_{\text{emi}}$

ii) Los espectros de emisión son típicamente independientes de la longitud de onda de excitación y se conoce como la regla de Kasha. Tras la excitación a niveles vibracionales y electrónicos altos, el exceso de energía desaparece rápidamente conduciendo al fluoróforo al nivel vibracional más bajo de S_1 . Esta relajación ocurre a los 10^{-12} seg y es, probablemente, resultado de un fuerte solapamiento de numerosos estados de similar energía. Debido a esta rápida relajación, los espectros de emisión son usualmente independientes de la longitud de onda de excitación, λ_{exc} .^{101,102}

iii) Excepción a la regla de la imagen especular: el hecho de que el espectro de emisión no sea la imagen especular del espectro de absorción, usualmente indica un diferente arreglo geométrico del núcleo en el estado excitado comparado con el estado fundamental. Los desplazamientos nucleares pueden ocurrir previo a la emisión permitiendo el movimiento seguido al proceso instantáneo de la absorción. Como resultado, el espectro de emisión es menos estructurado que el de absorción.^{101,102}

Por otro lado, las moléculas que se encuentran en el estado S_1 equilibradas térmicamente pueden sufrir un proceso denominado cruce de sistemas, es decir las moléculas que se encontraban en el estado S_1 pasan a un estado triplete de menor energía T_1 modificando su spin electrónico. Luego, la emisión puede ocurrir desde tal estado y el proceso es conocido con el nombre de fosforescencia. La transición de T_1 a S_0 es prohibida por spin y como resultado, las constantes de velocidad para la emisión del triplete son de varios órdenes de magnitud más pequeña que para aquellas de fluorescencia.^{101,102}

A modo de resumen se enumera los diferentes procesos que puede sufrir una molécula:

1. Absorción : $S_0 + h\nu_A \longrightarrow S_1^v$, $S_0 + h\nu_A \longrightarrow S_2^v$
2. Equilibrio térmico: $S_1^v \longrightarrow S_1$, $T_2^v \longrightarrow T_2$, etc.
3. Conversión interna: $S_2 \longrightarrow S_1^v$, $T_2 \longrightarrow T_1^v$
4. Desactivación sin radiación: $S_1 \longrightarrow S_0$, $T_1 \longrightarrow S_0$
5. Cruce intersistemas: $S_1 \longrightarrow T^v$
6. Fluorescencia: $S_1 \longrightarrow S_0^v + h\nu_F$
7. Fosforescencia: $T_1 \longrightarrow S_0^v + h\nu_P$

1. D-2. Tiempos de vida de fluorescencia

El tiempo de vida del estado excitado está definido por el tiempo promedio que la molécula permanece en el estado excitado previo a retornar al estado fundamental. Por lo tanto, el tiempo de vida de fluorescencia determina el tiempo disponible para que el fluoróforo interactúe o difunda en su entorno. Para el fluoróforo que realiza solo procesos como lo ilustrado en la Figura 15 (sin reacciones fotoquímicas acopladas), el tiempo de vida es:

$$\tau = 1 / (\Gamma + k_{nr} + k_{isc}) \quad (14)$$

donde Γ es la velocidad emisiva del fluoróforo, k_{nr} es su velocidad de decaimiento no radiativo a S_0 y k_{isc} es la velocidad del cruce entre sistemas. Es sabido que la emisión de fluorescencia es un proceso al azar, y solo unas pocas moléculas emiten sus fotones precisamente a $t = \tau$.^{101,102} El tiempo de vida del fluoróforo, en ausencia de procesos no radiativos, es llamado tiempo de vida intrínseco o natural y está dado por:

$$\tau_n = 1 / \Gamma \quad (15)$$

El tiempo de vida puede ser modificado por factores que afectan sus constantes de velocidad (Γ , k_{nr} o k_{isc}). Por ejemplo, una molécula puede ser no fluorescente como resultado de una rápida velocidad de conversión interna, una rápida velocidad de cruce entre sistemas o una lenta velocidad de emisión.

1. D-3. Fluorescencia en estado estacionario y resuelta en el tiempo

Las medidas de fluorescencia pueden ser clasificadas en: estado estacionario y resueltas en el tiempo. Las medidas en estado estacionario son aquellas realizadas con intensidad de iluminación y observación constante. Este es el tipo más común de medida. La muestra es iluminada con un haz de luz de intensidad continua y se registra la intensidad o espectro de emisión.¹⁰¹

El segundo tipo de medida, las resueltas en el tiempo es usado para medir los decaimientos de la intensidad. Para estas medidas, la muestra es expuesta a un pulso de luz, donde el ancho del pulso es típicamente más corto que el tiempo de decaimiento de la muestra. Este decaimiento de la intensidad es registrado con un sistema de detección

de alta velocidad que permite a la intensidad ser medida en la escala de tiempo de hasta los femtosegundos. Es importante entender que existe una simple relación entre ambas medidas. La observación en estado estacionario es, simplemente, un promedio del fenómeno resuelto en el tiempo sobre el decaimiento de intensidad de la muestra.¹⁰¹

1. D-4. Efecto de solvente sobre los espectros de absorción y de emisión

Cuando se miden los espectros de absorción o de emisión de un compuesto en solventes de distinta polaridad se encuentra que pueden ser modificadas la posición, la forma y/o la intensidad de las bandas. Esos cambios son el resultado de las fuerzas de interacción intermoleculares soluto - solvente (tanto específicas como no específicas), las cuales tienden a modificar la diferencia de energía entre el estado fundamental y el estado excitado de la molécula que absorbe o emite.¹⁰³ La influencia del medio sobre el espectro de absorción puede ser tratada de diferentes puntos de vista: a) comparando el cambio espectral observado en el solvente en estudio con el obtenido en fase gaseosa o, b) con el observado en otro solvente. Como en la mayoría de los casos no es posible obtener el espectro de las sustancias en fase gaseosa, la influencia de un solvente dado se hace comparando el espectro obtenido con el registrado en un solvente de referencia, tal como ciclohexano, debido a que sus interacciones con el soluto sólo son dispersivas.¹⁰²⁻¹⁰⁴ No se consideran aquellos cambios espectrales que provienen de alteraciones de naturaleza química llevadas a cabo por el medio, tales como las transferencias de protón o de electrón entre el solvente y el soluto; la ionización; la formación de complejos, o los equilibrios de isomerización. Las teorías de efecto de solvente sobre el espectro de absorción suponen que el estado químico del soluto aislado y solvatado son los mismos, y se consideran a estos efectos sólo como una perturbación física de los estados moleculares más importantes de la especie que absorbe. De este modo, el efecto de solvente puede ser utilizado para obtener información sobre las interacciones soluto - solvente.¹⁰⁵⁻¹⁰⁶

El término *solvatocromismo* es utilizado para describir los cambios producidos en la posición (y a veces en la intensidad) de la banda de absorción y de emisión cuando se cambia la polaridad del solvente. Cuando ocurren corrimientos hacia menores longitudes de onda o *hipsocrómicos*, el fenómeno es llamado *solvatocromismo negativo*. Cuando los corrimientos son a mayores longitudes de onda o *batocrómicos*, el fenómeno es llamado *solvatocromismo positivo*.¹⁰⁷

El efecto de solvente sobre el espectro de absorción, depende fundamentalmente de la naturaleza de la transición. En este sentido, las transiciones electrónicas de mayor interés corresponden a las $n \rightarrow \pi^*$; $\pi \rightarrow \pi^*$ y las absorciones de transferencia de carga. Se ha establecido experimentalmente que las moléculas que exhiben un pronunciado corrimiento solvatocrómico son aquellas cuya distribución de cargas en el estado fundamental difiere considerablemente de la distribución en el estado excitado. En otras palabras, aquéllas cuyo momento dipolar μ en el estado excitado (μ_e) es diferente del μ en el estado fundamental (μ_g).¹⁰⁴ A medida que el estado excitado es más polar que el estado fundamental ($\mu_g < \mu_e$), se produce un corrimiento batocrómico del máximo de la banda de absorción cuando se incrementa la polaridad del solvente. En cambio, si el estado fundamental es más polar que el excitado ($\mu_g > \mu_e$), se produce un corrimiento hipsocrómico.

Del mismo modo que para la absorción, la polaridad del solvente y el microentorno local tienen profundos efectos sobre los espectros de emisión de fluoróforos polares. Estos efectos son el origen del corrimiento de Stokes, el cual es una de las observaciones más comunes en la fluorescencia. Un uso muy común del efecto de solvente (debido a su mayor sensibilidad respecto de la absorción) es para determinar la polaridad de sondas unidas a macromoléculas.¹⁰¹ Esto se logra por comparación de los espectros de emisión y/o rendimiento cuántico del fluoróforo cuando está unido a la macromolécula y cuando se disuelve en solventes de diferente polaridad.

Generalmente, el fluoróforo tiene un momento dipolar más grande en el estado excitado (μ_e) que en el estado fundamental (μ_g). El efecto de solvente corre la emisión hasta energías más bajas, debiendo estabilizar los estados excitados por las moléculas polares de solvente.

Las interacciones específicas fluoróforo – solvente pueden ocurrir en ambos, el estado fundamental o el estado excitado. Si la interacción sólo ocurre en el estado excitado, entonces el cambio en la polaridad del solvente podría no afectar los espectros de absorción. Si la interacción ocurre en el estado fundamental, entonces algunos cambios son esperados en el espectro de absorción. Una ausencia de cambios en los espectros de absorción podría indicar que no ocurren interacciones en el estado fundamental. Alternativamente, puente de hidrógeno débil puede ocurrir en el estado fundamental, y la fuerza de esta interacción puede incrementarse luego de la



excitación.^{101,104} La presencia de interacciones específicas, en el estado fundamental o solamente en el estado excitado, determina la escala de tiempo de estas interacciones. Si el fluoróforo y el solvente polar están ya asociados en el estado fundamental, entonces se espera un inmediato corrimiento espectral en la excitación. Si el fluoróforo y el solvente polar solo se asocian en el estado excitado, entonces la apariencia del efecto específico de solvente, dependería de la velocidad de difusión del fluoróforo y el solvente polar. En este caso, la dependencia en la concentración del solvente polar sería similar a las reacciones de inhibición de la fluorescencia.¹⁰¹

1. D-5. Parámetros del solvente

El estudio en medio homogéneo puede plantearse teniendo en cuenta todas las posibles interacciones (específicas y no específicas) soluto-solvente existentes en un dado sistema. Usualmente dichas interacciones están basadas en modelos clásicos o mecanocuánticos, que consideran al solvente como un continuo macroscópico caracterizado sólo por constantes físicas como son la densidad (δ), la constante dieléctrica (D) o el índice de refracción (η). En general, los resultados obtenidos mediante estos cálculos teóricos, no tienen en cuenta interacciones específicas como son las de tipo puente hidrógeno o complejos electrón donador-aceptor. La falta de expresiones teórica sencillas derivan en el uso de escalas empíricas de polaridad de solvente. Desde los comienzos de los años sesenta se empezaron a utilizar los parámetros de polaridad de solvente denominado $E_{T(30)}$ ¹⁰⁸ y el parámetro Z de Kosower.¹⁰⁹ A pesar de que los parámetros empíricos pueden servir como una buena aproximación de las distintas propiedades del medio, hay muchos procesos sensibles al solvente que no dependen de una única propiedad de éste sino de varias a la vez. Es por eso la necesidad del uso de ecuaciones multiparamétricas que relacionan alguna propiedad fisicoquímica con todas las posibles interacciones soluto - solvente presentes en un sistema.

Las ecuaciones multiparamétricas tienen la forma general dada por la ecuación (16) y relaciona: la propiedad fisicoquímica en estudio con los diferentes parámetros empíricos del solvente.¹¹⁰

$$A = A_0 + bB + cC + dD + \dots \quad (16)$$

Donde A es la propiedad fisicoquímica en estudio dependiente del solvente, como puede ser una constante de equilibrio, una constante cinética, la frecuencia del máximo de una banda de absorción o emisión, la solubilidad de un dado soluto. A_0 es la propiedad estadística correspondiente en fase gaseosa o en un dado solvente de referencia, B, C, D , representan distintos parámetros de solvente, los que tienen en cuenta las diferentes interacciones soluto - solvente y b, c, d , son los respectivos coeficientes que miden la sensibilidad de A , a los diferentes parámetros. La separación de los distintos mecanismos de interacción soluto - solvente es puramente formal y puede que no tenga validez teórica, debido a que dichas interacciones podrían estar acopladas actuando en forma dependiente, sin embargo, es necesaria su independencia para tener validez matemática. De todas maneras, si la separación de los distintos mecanismos que intervienen se hace adecuadamente, es posible que los parámetros obtenidos con estas correlaciones múltiples puedan utilizarse para interpretar el efecto de solvente, con información del tipo y de la magnitud de las interacciones. Para la resolución matemática de las ecuaciones multiparamétricas, se emplean regresiones múltiples o el análisis factorial, que provee un criterio menos arbitrario en la selección de la cantidad y la naturaleza de las posibles causas de variación en la serie de datos.¹¹¹ Sobre la base de la ecuación (16), se han hecho numerosos estudios de procesos físicos y químicos, como los de Kamlet y Taft,¹¹²⁻¹¹⁴ Krygowski y Fawcet,¹¹⁵ Dougherty,¹¹⁶ Koppel y Palm,¹¹⁷ Swain y col.¹¹⁸

Una de las aproximaciones más utilizadas para dilucidar y cuantificar las distintas interacciones soluto-solvente es el método de comparación solvatocrómica de Kamlet y Taft.¹¹²⁻¹¹⁴ Según este método, se toman los espectros de absorción y/o de emisión de la molécula a estudiar en varios solventes orgánicos con distintas características fisicoquímicas (polaridad, capacidad dadora y aceptora de puente de hidrógeno) y luego se realiza una regresión lineal múltiple (MLR) entre la frecuencia del máximo de absorción o emisión con parámetros de solventes utilizando la ecuación (17):

$$\nu = \nu_0 + s(\pi^* + d\delta) + a\alpha + b\beta + e\xi \quad (17)$$

donde π^* es el índice de polaridad polarizabilidad, α y β miden la habilidad del solvente de donar o aceptar hidrógeno en una interacción del tipo puente de hidrógeno. La escala

π^* debe ser modificada cuando los corrimientos son hipsocrómicos, incluyendo un parámetro de corrección δ , que corrige por polarizabilidad, y cuyo valor es 0 para solventes alifáticos no halogenados, 0,5 para solventes alifáticos polihalogenados y 1 para aromáticos. El parámetro ξ , es un parámetro adicional al β . Se usa en correlaciones realizadas para ciertos tipos de familias de solventes. Los valores de ξ son -0,2 para bases P=O, 0 para bases C=O y S=O, 0,1 para nitrilo, 0,6 para bases con nitrógeno con hibridización sp^2 (piridina), 1 para bases con nitrógeno sp^3 (aminas). Dicho parámetro es interpretado como una medida de la valencia coordinada de la unión entre el soluto y el solvente. Por lo general se lo utiliza en el caso de que se emplee grupos de solventes con capacidades muy diferentes para aceptar puente de hidrógeno. Los factores s , d , a , b y e son los coeficientes de sensibilidad de la banda en estudio a los correspondientes parámetros de solvente. Además, d depende de la polarizabilidad del soluto, a , de la capacidad para aceptar puente de hidrógeno, b y e , de la capacidad de donar puente de hidrógeno. Como las escalas de π^* , α y β están normalizadas, los cocientes entre los distintos coeficientes: a/s , b/s y a/b dan una medida cuantitativa de la contribución relativa del parámetro escogido. Se debe tener en cuenta que el término δ se debe incluir cuando se emplean familias diferentes de solvente, cualquiera sea la propiedad medida. Para el caso de absorción espectroscópica, este factor se incluirá solamente en el caso de corrimientos hipsocrómicos.

Para poder utilizar los datos de emisión en las correlaciones multiparamétricas, es necesario presentar los espectros en la escala de número de onda (cm^{-1}) más que en la escala de longitudes de onda. Las longitudes de onda son fácilmente convertidas a número de onda tomando su recíproca. Sin embargo, un $\Delta\nu$, en cm^{-1} , no es igual a $\Delta\lambda$, es decir:

$$\Delta\nu = \nu_2 - \nu_1 = \left(\frac{1}{\lambda_2} - \frac{1}{\lambda_1} \right) = \left(\frac{\lambda_1 - \lambda_2}{\lambda_2 \lambda_1} \right) \cong \frac{\Delta\lambda}{\lambda^2} \quad (18)$$

Por lo tanto, si los espectros son obtenidos en la forma usual de intensidad por intervalo de longitud de onda ($I(\lambda)$) cuando se convierte a la escala de número de onda se requiere que cada intensidad sea multiplicada por λ^2 , es decir, $I(cm^{-1}) = I(\lambda) \lambda^2$.¹⁰¹

2

Materiales y Métodos Técnicas experimentales

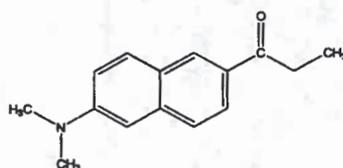
A. MATERIALES Y MÉTODOS

2. A-1. Reactivos

Todos los solventes utilizados son de calidad HPLC (Sintorgan y/o Merck). El agua utilizada es ultrapura y se la obtuvo de un equipo Labonco 90901-01.

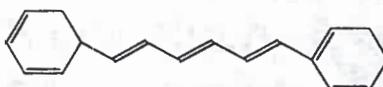
Las moléculas sondas a utilizadas fueron: propionil-2-dimetilamino naftaleno (PRODAN), 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH), ioduro de trans-4-[4-(dihexadecil amino)-estiril]-1-metil piridinio (DIA), todas compradas en Molecular Probes y con más del 99% de pureza. También se empleo el ioduro de trans-4-[4-(dimetilamino)-estiril]-1-metilpiridinio (HC) (no accesible comercialmente), la misma fue sintetizada en nuestro laboratorio. Se prepararon soluciones Stock de PRODAN, DPH, DIA y HC en metanol, diclorometano, acetronitrilo y metanol respectivamente.

PRODAN Propionil-2-dimetilamino naftaleno.



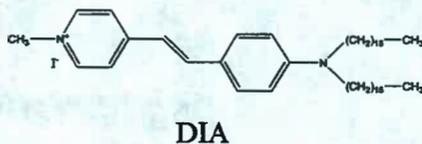
PRODAN

DPH 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno.

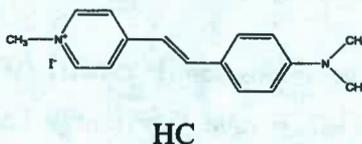


DPH

DIA Ioduro de 4-(4-(dihexadecil amino) estiril)-N-metil piridinio.

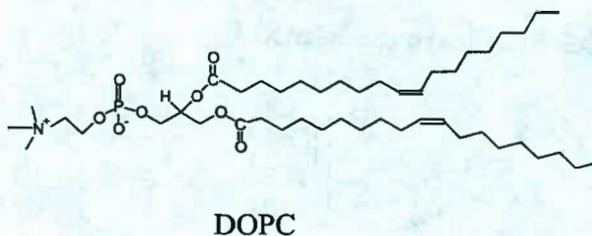


HC Ioduro de trans-4-[4-(dimetilamino)-estiril]-1-metilpiridinio



El fosfolípido utilizado fue el dioleoil fosfatidil colina (DOPC) comprado en Avanti Polar Lipids. Su pureza es mayor al 99% y el mismo fue utilizado tal cual se lo recibió. Solución Stock (40 mg/ml) en Cloroformo (Sintorgan HPLC) y fue guardado a -22°C en ausencia de O_2 .

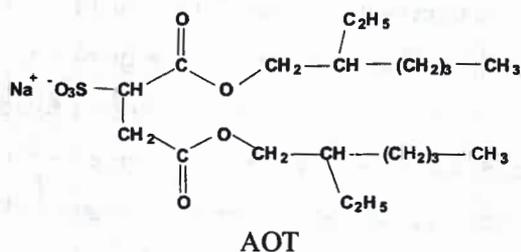
DOPC Di oleil fosfatidil colina.



El surfactante utilizado para preparar las micelas inversas no acuosas fue el 1,4-bis (2-etilexil) sulfosuccinato de sodio, AOT Sigma > 99 % de pureza y se lo utilizó como se recibió comercialmente. El mismo fue mantenido bajo vacío, utilizando como

agente desecador P_2O_5 . Como solvente polar se empleó, agua ultra pura, dimetil formamida (DMF) y dimetil acetamida (DMA).

AOT Dioctil sulfosuccinato de sodio.



2. A-2. Materiales

Las experiencias de absorción fueron realizadas en un equipo Shimadzu 2401 a $25,0 \pm 0,1$ °C. Las de emisión fueron realizadas en un equipo Spex Fluoromax a la misma temperatura. El paso óptico utilizado en las experiencias de absorción y emisión fue de 1 cm. Las medidas de depolarización se realizaron en un equipo spectrophotometer F – 2500 Hitachi con polarizadores Glam-Thomson.

Los tiempos de vida de fluorescencia fueron medidos a través de la técnica de conteo de fotón único (single photon counting, SPC) utilizando un equipo Edinburg FL-9000. La calidad del fito fue determinada a través de los valores de χ^2 .

La medición del coeficiente de difusión, diámetro y distribución de tamaño de las LUV de DOPC, fueron realizadas en un equipo de dispersión dinámica de luz (Ligth Scattering Malvern 4700), colectando los fotones a un ángulo de 90° a una temperatura de 25 °C y a $\lambda = 488\text{nm}$, láser Ion Argón.

Los voltagramas fueron tomados con un potenciostato AUTOLAB PGSTAT30, utilizando una celda de tres electrodos. Electrodo de trabajo: alambre Pt A= 0,251 cm²; referencia: Ag/ClAg; contraelectrodo: Pt de gran área. Electrolito soporte: 0,1 M de LiClO₄.

2. A-3. Preparación de vesícula unilaminares grandes de DOPC. Extruder

Las vesículas unilaminares fueron preparadas por el método del extruder.^{31,32} Se tomó la cantidad necesaria de la solución stock de DOPC para preparar una solución de una concentración aproximadamente de 4 mg/mL. Dicha cantidad fue transferida a un balón y el cloroformo evaporado en un evaporador rotatorio a presión reducida. El fosfolípido se dejó secar bajo vacío por un tiempo de 2 horas. Finalizado el mismo, se le agregó la solución acuosa de la molécula prueba a utilizar y se lo llevó a un equipo Vortex (Vortex Genie 2) donde se lo agito vigorosamente por espacio de 5 minutos. De esta manera se obtuvieron vesículas multilaminares de DOPC. La Figura 16 muestra la representación de la hidratación y formación de las vesículas multilaminares de DOPC.

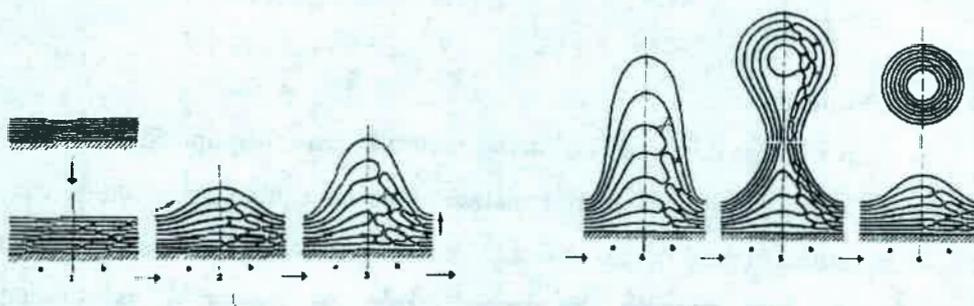


Figura 16. Representación esquemática de la hidratación de los fosfolípidos.

Posteriormente, se pasó dicha solución a través de un equipo Extruder (Lipex Biomembrane) equipado con dos membranas de policarbonato con poros de 200 nm de diámetro bajo la acción de una presión moderada de Nitrógeno. Se repitió el procedimiento 10 veces y, de esta manera se obtuvieron las vesículas unilaminares de DOPC con la molécula prueba a trabajar.

Si la molécula prueba es insoluble en agua tal es el caso de DIA, se toma la cantidad necesaria de la solución stock de DIA y se evapora el solvente con nitrógeno. Luego se le agrega las vesículas de DOPC formadas tal como se describió anteriormente usando agua en vez de la solución de molécula prueba.

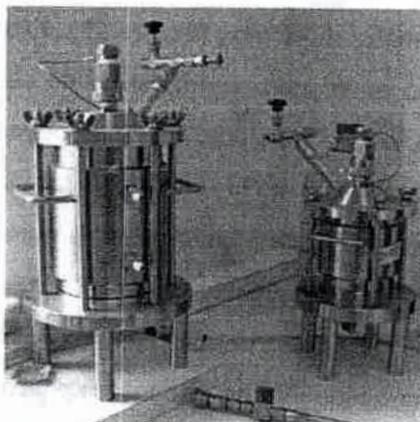


Figura 17. Extruder utilizado para la formación de vesículas unilaminares grandes de DOPC.

Debido a que la solución de fosfolípido presenta turbidez, para las experiencias espectroscópicas es necesario preparar una solución del mismo de, exactamente la misma concentración pero sin la molécula prueba a utilizar. Este blanco, fue preparado de la misma manera descrita anteriormente utilizando solamente agua en vez de la solución de molécula prueba. Este blanco se lo utiliza para contrarrestar el efecto de la turbidez. La preparación de LUV por este método presenta varias ventajas: las vesículas están libre de solvente orgánico, son de tamaño y estructura relativamente homogéneo y son capaces de contener grandes volúmenes.

B. TÉCNICAS

2. B-1. Conteo de fotón único (Single Photon Counting, SPC)

La técnica de conteo de fotón único es una técnica digital, donde los fotones son correlacionados en tiempo con relación al pulso de excitación.¹⁰¹ La parte principal del método está en el convertidor tiempo – amplitud (TAC). La muestra se excita repetidamente usando una fuente de luz pulsada, frecuentemente de un láser o lámpara flash. Cada pulso es monitoreado ópticamente, por un fotodiodo de alta velocidad o fotomultiplicador, para producir una señal inicial utilizada para comenzar la rampa de voltaje del TAC. La rampa de voltaje es detenida cuando se detecta el primer fotón fluorescente de la muestra. El TAC provee un pulso de salida cuyo voltaje es proporcional al tiempo entre las señales de inicio y detención. Un analizador multicanal (MCA) convierte este voltaje en un canal de tiempo mediante un convertidor análogo-digital (ADC). Sumando sobre muchos pulsos, el MCA construye un probable

histograma de cuentas vs canales de tiempo (Figura 18). Este experimento se continúa hasta que se tiene colectado un número significativo de cuentas en el canal de pico (5000-10000 cuentas). Bajo estas condiciones, el histograma del fotón que arriba en el tiempo, representa el decaimiento de la intensidad de la muestra. Aunque estas observaciones referidas al principio de funcionamiento son complicadas a primera vista, son muy eficientes y exactas por la siguiente razón: la certeza de la medida del tiempo no está limitada por el ancho del pulso del detector. Así, entonces, la resolución en el tiempo es mejor que el utilizado en un osciloscopio u otro dispositivo lineal de adquisición de la señal.¹⁰¹ Hay típicamente tres curvas asociadas con el decaimiento de la intensidad. Éstas son: los datos medidos $N(t_k)$, la función respuesta del instrumento $L(t_k)$ y el decaimiento calculado $N_c(t_k)$.¹⁰¹ Estas funciones están en términos de tiempos discretos (t_k) porque el conteo de fotones es colectado en canales, cada uno con un tiempo (t_k) y ancho (Δt) conocidos. La función respuesta del equipo, algunas veces llamada función de la lámpara, es la respuesta del equipo a una muestra de tiempo de vida cero. Esta curva se obtiene generalmente, usando una solución diluida de dispersante, tal como silica coloidal (Iudox). Este decaimiento representa el perfil de tiempo más corto que puede ser medido por el instrumento. La curva que se mide a continuación es el decaimiento de intensidad de la misma muestra [$N(t_k)$]. La última curva es el dato calculado [$N_c(t_k)$], que es la función ajustada. Esta función es el perfil de tiempo esperado para una dada ley de decaimiento, cuando se considera la forma de la función respuesta del instrumento. El tiempo de decaimiento τ , se obtiene del mejor ajuste entre los datos medidos $N(t_k)$ y las intensidades dependientes del tiempo calculadas $N_c(t_k)$.¹⁰¹



Figura 18. Representación del probable histograma de cuentas vs canales de tiempo en un experimento de conteo de fotón único. Adaptado de referencial 19.

SPC es una técnica para registrar bajos niveles de señales de luz con resolución de tiempo del orden de femtosegundo. Las aplicaciones típicas son:

- Medidas de tiempos de vida de fluorescencia.
- Descubrimiento e identificación de moléculas aisladas.
- Secuencia del ADN.
- Tomografía óptica.

El método tiene algunos beneficios llamativos:

- Alta resolución en el tiempo.
- Alta sensibilidad, debajo del nivel del fotón único.
- Tiempos cortos de medida.
- Alta linealidad.
- Excelente proporción de señal a ruido.
- Alta estabilidad de ganancia

Así, entonces, la resolución en el tiempo es mejor que el utilizado en un osciloscopio u otro dispositivo lineal de adquisición de la señal.¹⁰¹ Hay típicamente tres curvas asociadas con el decaimiento de la intensidad. Éstas son: los datos medidos $N(t_k)$, la función respuesta del instrumento $L(t_k)$ y el decaimiento calculado $N_c(t_k)$.¹⁰¹ Estas funciones están en términos de tiempos discretos (t_k) porque el conteo de fotones es colectado en canales, cada uno con un tiempo (t_k) y ancho (Δt) conocidos. La función respuesta del equipo, algunas veces llamada función de la lámpara, es la respuesta del equipo a una muestra de tiempo de vida cero. Esta curva se obtiene generalmente, usando una solución diluida de dispersante, tal como silica coloidal (ludox). Este decaimiento representa el perfil de tiempo más corto que puede ser medido por el instrumento. La curva que se mide a continuación es el decaimiento de intensidad de la misma muestra $[N(t_k)]$. La última curva es el dato calculado $[N_c(t_k)]$, que es la función ajustada. Esta función es el perfil de tiempo esperado para una dada ley de decaimiento, cuando se considera la forma de la función respuesta del instrumento. El tiempo de decaimiento τ , se obtiene del mejor ajuste entre los datos medidos $N(t_k)$ y las intensidades dependientes del tiempo calculadas $N_c(t_k)$.¹⁰¹

2. B-2. Anisotropía de fluorescencia

Los fluoróforos absorben preferentemente fotones cuyos vectores eléctricos están paralelos al momento de transición del mismo, el cual tiene una orientación definida con respecto al eje molecular. En una solución isotrópica, los fluoróforos están orientados al azar. Cuando la excitación se realiza con luz polarizada, se excita selectivamente aquellos fluoróforos que tienen los dipolos de transición de absorción paralelos al vector eléctrico de la excitación. Esta excitación selectiva, origina una población de fluoróforos parcialmente orientados (fotoselección) y una probable emisión de fluorescencia polarizada. La magnitud de la polarización de la emisión está descrita en términos de la anisotropía de fluorescencia (r).¹⁰¹

El origen del fenómeno de la depolarización está basado en la existencia de momentos de transición para absorción y emisión, los cuales quedan a lo largo de direcciones específicas dentro de la estructura del fluoróforo. Cuando se expone a la luz polarizada, aquellos fluoróforos que tienen sus momentos de transición de absorción orientados a lo largo del vector eléctrico de la luz incidente se excitan. Así, hay un gran número de moléculas selectivas excitadas que poseen momentos de transición orientados a lo largo del vector eléctrico de la luz polarizada excitante.¹⁰¹ La difusión rotacional de fluoróforos es una causa común de depolarización. Dichos movimientos difusionales dependen, a su vez, de la viscosidad del solvente, el tamaño y forma de la molécula rotante.

La importancia de la depolarización de fluorescencia como una herramienta analítica radica en su sensibilidad a los cambios tanto en el tamaño efectivo de la molécula fluorescente como en la microviscosidad del entorno de la molécula fluorescente o fluoróforo. Las investigaciones utilizando esta técnica tienen importantes aplicaciones en sistemas biológicos, particularmente en conexión con la organización de lípidos en membranas naturales y membranas modelos.¹²⁰ Esta técnica es ampliamente utilizada en investigaciones bioquímicas, debido a que cualquier factor que afecte el tamaño, forma, o flexibilidad segmental de una macromolécula afectará la anisotropía observada. Estas propiedades de macromoléculas pueden ser afectadas por el pH, temperatura, viscosidad, agentes desnaturizantes, reacciones de asociación, etc. Para investigar la dinámica rotacional de biomoléculas (tales como proteínas, vesículas, membranas; etc.); dichas medidas se llevan a cabo "marcando" la biomolécula (la

aproximación general es que el fluoróforo se une covalentemente) con un fluoróforo que reúna ciertas condiciones, tales como por ejemplo que el τ del fluoróforo sea comparable con el tiempo de correlación rotacional esperado para la biomolécula.

Como se menciona anteriormente, la magnitud de la polarización de la emisión está descrita por la anisotropía, la cual provee una cantidad de información sobre los procesos fotofísicos que ocurren en moléculas complejas. Esta técnica ha sido aplicada en los últimos años al estudio de sistemas organizados tales como micelas inversas de AOT,¹²¹⁻¹²⁴ macromoléculas en general¹²⁰; como así también en la caracterización (en solución) de sustratos que forman cristales líquidos discóticos con la temperatura.¹²⁵ Además, han sido informadas numerosas aplicaciones de la anisotropía fluorescente resuelta en el tiempo, $r(t)$, a biopolímeros y proteínas marcados con un fluoróforo extrínseco.^{126,127} Asimismo, sigue siendo de gran importancia la aplicación de ésta técnica al estudio de membranas biológicas para cuantificar los cambios de fluidez y orden en la bicapa lipídica a partir de la variación de la anisotropía de fluorescencia (de una molécula prueba) con el tiempo.^{128,129} Por tal motivo se considera de gran importancia la utilización de la depolarización de fluorescencia, que permite obtener información sobre la estructura molecular y propiedades tales como la forma, dimensiones y cambios conformacionales,¹³⁰ dinámica interna de sistemas moleculares,¹³¹ microviscosidad de sistemas organizados en particular micelas inversas y liposomas.¹⁰¹

La anisotropía en estado estacionario ($\langle r \rangle$) fue determinada en un espectrofotómetro Hitachi 2500. En los diferentes sistemas organizados, la fluorescencia residual debido a la dispersión de luz que proviene de dicho sistema, fue removida por sustracción de un espectro tomado en una solución blanco. Los valores de anisotropía de fluorescencia fueron obtenidos a 25°C usando la expresión¹⁰¹:

$$\langle r \rangle = \frac{(I_{//} - G I_{\perp})}{(I_{//} + 2G I_{\perp})} \quad (19)$$

donde, $I_{//}$ y I_{\perp} son las componentes de la intensidad del fluoróforo polarizadas vertical y horizontalmente después de la excitación con luz polarizada verticalmente, y G es el

factor sensibilidad del sistema de detección del instrumento, para la luz polarizada verticalmente y horizontalmente, definido según la ecuación 20¹⁰¹:

$$G = \frac{S_V}{S_H} \quad (20)$$

Donde S_V y S_H son las sensibilidades de la emisión para las componentes polarizadas vertical y horizontalmente, respectivamente.¹⁰¹

Las medidas de anisotropía en estado estacionario fueron convertidas mediante la correlación con el tiempo de rotación (ϕ) usando la siguiente ecuación¹⁰¹:

$$\langle r \rangle = \frac{r_0}{1 + (\tau/\phi)} \quad (21)$$

donde r es la medida de anisotropía de fluorescencia, r_0 es la anisotropía en estado fundamental y τ es el correspondiente tiempo de vida de fluorescencia.

La correlación con el tiempo rotacional fueron usadas para determinar el volumen de la unidad rotante (V) en (ml mol^{-1}) mediante el uso de la ecuación de Perrin¹⁰¹:

$$\phi = \frac{\eta}{R} \frac{V}{T} \quad (22)$$

donde η es la viscosidad ($0,0010 \text{ Kg m}^{-1}$ para el agua a 293°K), R es la constante de los gases ($8,314 \text{ Kgm}^{-2} \text{ s}^{-2} \text{ K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$) y T es la temperatura en grados Kelvin.

2. B-3. Cambio en los espectros de emisión al excitar la molécula al rojo del máximo de la banda de absorción (REES). (Red-edge excitation shifts)

Como se mencionó anteriormente, los espectros de emisión son independientes de la longitud de onda de excitación.¹⁰¹ Esto es válido para fluoróforos en solventes fluidos. Sin embargo, no es del todo cierto en solventes viscosos o moderadamente viscosos. Para fluoróforos polares en condiciones donde la relajación de solvente no es completa, los espectros de emisión se corren a λ mayores cuando se excita al rojo del máximo de la banda de absorción. Esto es conocido como REES y ha sido observado

para una variedad de fluoróforos.¹⁰¹ El comportamiento de moléculas polares con REES puede ser entendido considerando la Figura 19. Suponiendo que el fluoróforo está en un solvente congelado (donde $k_s \ll 1/\tau$) y que la muestra puede ser excitada en el centro de la última banda de absorción (λ_C) o sobre el borde rojo (λ_R). Por excitación a λ_C , se observa la emisión usual del estado F (Figura 19 a).

Sin embargo, la excitación a λ_R selecciona a aquellos fluoróforos que tienen absorción a baja energía. En cualquier población de moléculas en solución congelada, hay algunos fluoróforos que tienen una configuración del solvente la cual es equivalente a la del estado relajado.¹⁰¹ Estos fluoróforos están más solvatados y, así, muestran una emisión corrida al rojo (Figura 19 b).

Es conocido que el efecto REES desaparece en solventes fluidos, y es debido a que hay rápida reorientación del solvente (Figura 19 c y d). Ahora, aun cuando los fluoróforos son inicialmente excitados al rojo, estos reaccionan equilibrándose con el solvente previo a la emisión, no observándose cambios en los máximos de emisión con el λ de excitación. Una situación intermedia se observa para el caso de $k_s \approx \tau$.

La excitación al rojo de la banda de absorción ha sido aplicada a fluoróforos bioquímicamente relevantes. Este fenómeno puede ser utilizado para estimar dinámica de biopolímeros,¹⁰¹ aunque es solo observado si la relajación no es completa y la magnitud del corrimiento al rojo depende de la velocidad de relajación del solvente (k_s). Para poder estimar la magnitud de REES, generalmente se realiza la diferencia entre el máximo de emisión al excitar al azul y el máximo correspondiente al excitar al rojo la banda de absorción. Dicha diferencia de máximos de emisión representa la magnitud del REES.¹³²

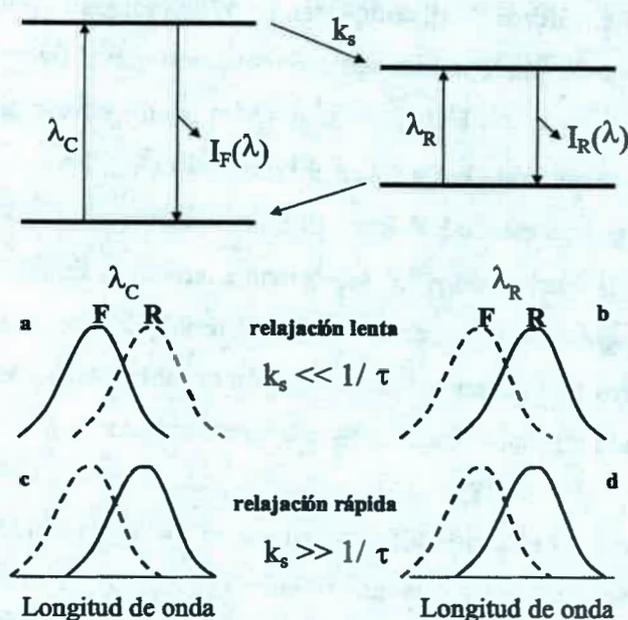


Figura 19. Efecto de excitación en el borde rojo sobre el espectro de emisión. La línea sólida representa el espectro observado, la línea cortada representa las emisiones desde los estados F (Franck – Condon) y R (relajado). Grafico adaptado de referencia101.

Se ha mostrado previamente,¹³² que el microentorno de moléculas unidas a sistemas organizados puede ser controlado convenientemente, usando esta técnica como un instrumento novedoso. Este efecto, se observa en su mayor parte con fluoróforos polares en medios con movilidad restringida tal como las soluciones muy viscosas o las fases condensadas, donde el tiempo de relajación para el solvente alrededor de un fluoróforo es comparable a o más largo que su tiempo de vida de fluorescencia. La característica extraordinaria acerca del REES es que, mientras todas las otras técnicas de fluorescencia (tal como inhibición de fluorescencia, transferencia de energía, y medidas de depolarización) informan del rendimiento acerca del fluoróforo (intrínseco o extrínseco) en sí mismo, REES proporciona información acerca de las velocidades relativas de dinámica de relajación del solvente, que no es posible obtener por otras técnicas.¹⁰¹ Esto hace el uso de REES muy útil ya que la solvatación juega un papel crucial modulante en muchos acontecimientos celulares importantes, tales como desdoblamiento de proteína, interacciones de proteína - lípido, y el transporte de iones. Se ha mostrado previamente¹⁰¹ que REES sirve como un instrumento poderoso para controlar la organización y dinámica de sondas y péptidos unidos a membranas y

medios imitadores de membrana tal como: micelas inversas y vesículas o fosfolípidos.¹³³

2. B-4. Procedimiento de Longitud de Onda Selectiva de Fluorescencia. (The Wavelength – Selective Fluorescence Approach)

La espectroscopia de fluorescencia es una de las principales técnicas para estudiar la organización y la dinámica de membranas biológicas. La misma posee una alta sensibilidad intrínseca ofreciendo una perturbación mínima y se adecua en la escala de tiempo para observar dichos efectos.¹³⁴

La longitud de onda selectiva de fluorescencia sirve como un instrumento poderoso para estudiar la organización y la dinámica de sondas unidas a membranas y medios imitadores de membranas tales como: vesículas, micelas directas e inversas. Tal como se mencionó anteriormente, los corrimientos en los máximos de emisión al variar la longitud de onda de excitación (REES), se deben a una incompleta relajación del solvente alrededor del fluoróforo. Los procesos de polarización y tiempos de vidas de fluorescencia de diferentes sondas también se ven afectados por la relajación incompleta del solvente. Es decir, ambos procesos dependen de la longitud de onda de excitación y emisión en soluciones viscosas o en medios de movilidad restringida.

Por ejemplo, Chattopadhyay y col.¹³³ observaron que los tiempos de vida de fluorescencia del fluoróforo N-(7-nitrobenzen-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamino (NBD-PE) incorporado en la interfase de micelas inversas de AOT/heptano dependen de la longitud de onda de excitación, λ_{exc} y emisión, λ_{emi} respectivamente.

Al excitar a un λ constante, se observa un aumento en el tiempo de vida del fluoróforo al aumentar λ_{emi} . Tal aumento en el tiempo de vida son interpretados en términos de la reorientación del solvente alrededor del estado excitado del fluoróforo. Además, observaron una disminución considerable en los valores de polarización con el aumento de λ_{exc} , que se explican en términos de una relajación incompleta del fluoróforo en el estado excitado. Observaron que cuando λ_{emi} es menor predomina el fluoróforo no relajado. Su tiempo de vida es corto y ambas poblaciones (relajada y no relajada) están decayendo. Una lo hace a un valor de emisión menor (población no relajada) y la otra a uno mayor (no observable).

A λ_{emi} mayor los fluoróforos emiten desde un estado más relajado, su tiempo de vida es mayor lo que da lugar a una mayor reorientación del solvente alrededor del mismo. Por otro lado, los fluoróforos que viven más en el estado excitado pueden pasar más tiempo rotando y esto se ve manifestado en una disminución en los valores de depolarización. Así, Chattopadhyay y col.¹³³ encontraron una disminución en la polarización de NBD-PE cuando está incorporado en las micelas al aumentar la longitud de onda de emisión. Los valores menores de depolarización fueron asignados a los fluoróforos que poseen un tiempo de vida mayor y por lo tanto una relajación mayor, en tanto que los valores de depolarización mayores son asignados a los fluoróforos que no están relajados totalmente y que viven menos.

En trabajos similares han informado,¹³⁵⁻¹³⁷ que el aumento en el tiempo de vida de fluorescencia se observa para fluoróforos que se encuentran en un microentorno de movilidad restringida.

2. B-5. Dispersión dinámica de luz (Dynamic light scattering)

Esta técnica está basada en la dispersión de luz y puede ser utilizada para la caracterización fisicoquímica de diferentes sistemas organizados estudiados (micelas inversas y vesículas). Utilizando esta técnica se pueden determinar varias propiedades entre las que podemos citar: masa molar media, radio de giro, radio hidrodinámico (que es el radio de una esfera rígida que difunde con la misma velocidad que la partícula en estudio), el coeficiente de difusión, etc. Las experiencias realizadas con la técnica de dispersión de luz son relativamente simples y el equipo, permite monitorear la intensidad de la luz difractada de la muestra en el tiempo. Las fluctuaciones en la intensidad de la luz dispersada por un pequeño volumen de solución pueden ser del orden de los microsegundos y está directamente relacionada con el movimiento browniano del soluto (dispersión dinámica de luz). Es por ello que realizando medidas de intensidad en esta escala de tiempo, se puede extraer una basta información de las propiedades dinámicas del soluto.

Generalidades.

En la técnica de dispersión de luz dinámica se miden fluctuaciones en el tiempo de la luz dispersada causada por los movimientos de los sistemas organizados o

partículas en solución, es decir cuando una onda electromagnética incide sobre un sistema organizado en solución, esta pasa a actuar como una fuente secundaria de emisión de radiación. Como el sistema se está moviendo en relación al observador, la frecuencia de la radiación emitida por las mismas cambia a valores mayores o menores dependiendo de su velocidad y dirección (Efecto Doppler).¹³⁸

El cambio en el espectro de luz emitido por estos sistemas está relacionado con el movimiento Browniano, y por lo tanto, con su coeficiente de difusión (D), que a su vez está relacionado con su tamaño y forma. El valor de D puede ser calculada empleando una función de autocorrelación G(t), que es la transformada de Fourier del espectro de energía de la luz dispersada.

$$G(\tau) = [i(t) \cdot i(t + \psi)] \quad (23)$$

Siendo i(t) la intensidad de luz dispersada en el tiempo t y ψ el tiempo de espera entre dos lecturas consecutivas que normalmente es de pocos microsegundos.

El coeficiente de difusión translacional está relacionado con G(τ) mediante la siguiente ecuación:

$$G(\tau) = C (1 + B e^{-2q^2 D \tau}) \quad (24)$$

Donde C corresponde al cuadrado de la media de la intensidad de la luz dispersada, B es un término empírico relacionado con el instrumental, q el vector de onda, determinado por la ecuación

$$q = \frac{4 \cdot \pi \cdot \gamma}{\lambda} \cdot \text{sen} \frac{\Theta}{2} \quad (25)$$

donde γ es el índice de refracción de la solución y Θ el ángulo de observación de la luz dispersada.

Para determinar D es necesario calcular la constante de decaimiento exponencial

$$D = \frac{1}{2.q^2.\tau_c} \quad (26)$$

Una muestra polidispersa hace que $G(\tau)$ sea una función exponencial. Para el análisis de esa función se utiliza por ejemplo el método de los cumulantes,¹³⁸ donde se ajusta el $\ln G(\tau)$ a una ecuación polinomial de segundo o tercer orden. El método de los cumulantes es inadecuado para analizar distribuciones polimodales, donde deben ser empleados otros métodos tal como el Contin.¹³⁸

Finalmente el radio hidrodinámico R_H , de las partículas en solución puede ser calculado utilizando el valor de D , según la ecuación de Stokes-Einstein, suponiendo partículas esféricas.

$$R_H = \frac{k_B.T}{6.\eta.\pi.D} \quad (27)$$

Siendo k_B es la constante de Boltzmann, T es la temperatura en grados Kelvin (K); η es la viscosidad del solvente.

La Figura 20 muestra una foto del equipo de dispersión de luz utilizado. Actualmente todos los equipos utilizan un láser como fuente de luz, la intensidad de la luz dispersada es inversamente proporcional a la longitud de onda de irradiación, siendo en este aspecto mejor las fuentes de láser que emitan a baja longitud de onda. El láser empleado es de ión Argon (488 nm).

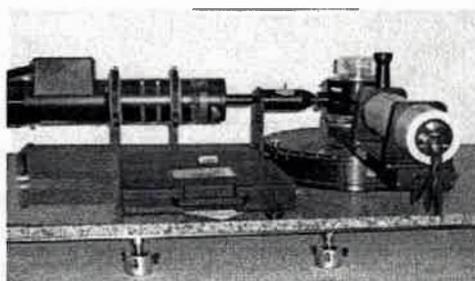


Figura 20. Foto del equipo de dispersión de luz utilizado en el laboratorio.

Normalmente los detectores presentan un conjunto de obturadores (*pin hole*) que dimensionan la ventana de la observación de la muestra. Cuando se realizan medidas

dinámicas, en donde generalmente la lectura de intensidad se realiza a 90° , la muestra se puede colocar en celdas de fluorescencia. La celda en algunos equipos se coloca inmersa en un líquido (cuyo índice de refracción es conocido, agua o decalina) contenido en una cuba, esto se realiza con el fin de termoestabilizar la muestra y ajustar el índice de refracción. Este líquido reduce la diferencia entre los índices de refracción entre el medio externo y las paredes de la celda. Como detectores se utilizan celdas fotomultiplicadoras de diodos fotosensitivos. Los correlacionadores son parte obligatoria de los equipos destinados a dispersión de luz, son unidades de hardware que implementan una función de autocorrelación. Dos ítems caracterizan los correlacionadores modernos; el número de canales (por ejemplo 256, 512, etc.) y el tiempo de espera entre dos lecturas consecutivas, que debe ser lo menor posible, también se conoce como tiempo de muestreo, muchas veces del orden de pocos microsegundos. Cuanto menor sea el tiempo de muestreo, menor será el tamaño de la partícula que ese equipo puede medir.

2. B-6. Técnicas Voltamétricas

1) Proceso de Electrodo

En la interfase entre un electrodo y una solución electrolítica ocurren diferentes tipos de procesos fisicoquímicos, cuando se aplica una diferencia de potencial externa.¹³⁹ Uno de éstos procesos es la transferencia de electrones a través de la interfase metal-solución, que causa la oxidación o reducción de alguna de las especies que componen la solución. Este tipo de proceso es llamado faradaico, puesto que está gobernado por la ley de Faraday, la cual establece que la extensión de la modificación química causada por el flujo de una corriente eléctrica es proporcional a la cantidad de carga eléctrica.

En cambio, existen otros procesos¹³⁹ cuando la interfase electrodo-solución se somete a un rango de potencial en el cual no ocurre reacción de transferencia neta de cargas, debido a condiciones termodinámicas y/o cinéticas desfavorables. Estos procesos, tales como la absorción y/o desorción de especies, formación de la doble capa cargada, solventes, etc. son conocidos como no faradaicos, debido a que ocurren sin transferencia de carga a través de la interfase y están asociados a corrientes capacitivas transitorias.

Cuando ocurre una transferencia de cargas en estas interfaz heterogéneas pueden presentarse simultáneamente ambos procesos, faradaicos y no faradaicos. En general, los primeros son los de mayor interés en estudios electroquímicos, pero los efectos de los procesos no faradaicos deben tenerse en cuenta en el análisis de los datos electroquímicos, si se desea obtener la información acerca de la transferencia heterogénea de cargas y de las reacciones asociadas.

Dado que los procesos reales ocurren a velocidades finitas, estos no pueden ser descritos como reversibles en el sentido estricto de la termodinámica¹³⁹. Sin embargo, los procesos electroquímicos pueden ocurrir con suficiente rapidez de manera que las ecuaciones termodinámicas puedan ser aplicadas con bastante exactitud; en estas circunstancias dichos procesos son llamados “reversibles” en un sentido práctico. Por lo tanto, un proceso general descrito por la siguiente ecuación



cumple con la ecuación de Nernst o alguna forma derivada de ella.

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \text{Ln} \frac{[a_{(R)}]^{v_R}}{[a_{(O)}]^{v_O}} \quad (29)$$

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \text{Ln} \frac{\gamma_{(R)} [R]^{v_R}}{\gamma_{(O)} [O]^{v_O}} \quad (30)$$

$$E^0 = E^0 + \frac{RT}{nF} \text{Ln} \frac{\gamma_{(R)}}{\gamma_{(O)}} \quad (31)$$

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \text{Ln} \frac{[R]^{v_R}}{[O]^{v_O}} \quad (32)$$

donde $a_{(O)}$ es la actividad de la forma oxidada y $a_{(R)}$ es de la forma reducida de la cupla redox, mientras v_O y v_R representa los coeficientes estequiométricos de la ecuación 28,

$\gamma_{(R)}$ y $\gamma_{(O)}$ son los coeficientes de actividad de la especie reducida y oxidada respectivamente. E^0 se designa con el nombre de potencial formal. Este parámetro toma el valor del potencial de media celda vs. NHE cuando las concentraciones de las especies R y O son tales que $[R]^{v_R}/[O]^{v_O}$ es la unidad. Además, deben ser especificadas las condiciones experimentales tales como la composición del medio. El potencial formal es de gran utilidad en la evaluación de potenciales de media celda debido a que los coeficientes de actividad en la mayoría de los sistemas son desconocidos.

II) Cinética de Reacción de Electrodo

La velocidad con que ocurre una reacción electroquímica es directamente proporcional a la corriente que circula por el circuito externo. Por lo tanto, tomando la ley de Faraday

$$\int_0^t i_{(t)} dt = Q = n \times F \times N \quad (33)$$

Donde: Q es la carga eléctrica intercambiada, n el número de electrones que se intercambia por mol electrolizado en el proceso global, F es la constante de Faraday, y N es el número de moles electrolizados. Derivando ambos miembros con respecto al tiempo se tiene que:

$$\frac{\partial Q}{\partial t} = i = nF \frac{\partial N}{\partial t} \quad (34)$$

La corriente eléctrica se designa como "i" y $\frac{\partial N}{\partial t}$ (moles por segundos) es la velocidad (v) que ocurre el proceso electroquímico.

$$v(\text{moles/segundo}) = \frac{\partial N}{\partial t} = \frac{i}{nF} \quad (35)$$

La interpretación de la velocidad de una reacción electroquímica es frecuentemente más compleja que aquella de una reacción homogénea, a causa que un

proceso sobre un electrodo es una reacción heterogénea. Una reacción electroquímica ocurre en la interfase electrodo electrolito y su velocidad depende de la transferencia de masa hacia el electrodo, varios efectos superficiales, además de las usuales variables cinéticas. Debido a la naturaleza heterogénea de las reacciones electroquímicas es común describir su velocidad de reacción en unidades de mol/seg por unidad de área:

$$v(\text{moles s}^{-1} \text{ cm}^{-2}) = \frac{i}{nFA} = \frac{j}{nF} \quad (36)$$

Donde A es el area del electrodo en cm^2 y j es la densidad de corriente (A/cm^2).

III) Cinética de Control Difusional

La cinética del proceso global de electrodo puede estar gobernada por la velocidad de transporte de material electroactivo a la superficie del mismo, siendo rápida la etapa de transferencia de cargas. En tal caso, se dice que la cinética electroquímica es de control difusional. Dado que en éste tipo de proceso el sistema obedece a las relaciones termodinámicas, se los conoce como sistemas reversibles o Nerstianos, debido que en todo momento se cumple la ley de Nersnt o una forma derivada de ella.

En el intercambio de sustancia electroactiva desde el seno de la solución hacia la superficie del electrodo (y viceversa), contribuyen procesos difusionales, migratorios y convectivos.¹⁴⁰ La contribución de cada uno de ellos al flujo total de la sustancia ($j_{i(x,t)}$) en función de la distancia del electrodo y el tiempo para una sustancia (i) con carga eléctrica Z_i presente en solución esta descripta por la ecuación de Nernst-Planck, que en una dimensión se puede expresar como:

$$J_{(x,t)} = -D_i \frac{\partial C_i(x,t)}{\partial x} - \frac{Z_i F}{RT} D_i C_i(x,t) \frac{\partial \phi(x,t)}{\partial x} + C_i(x,t) v(x,t) \quad (37)$$

Donde el primer termino de la derecha es la parte difusional, el segundo es el migratorio, y el ultimo la parte convectiva del flujo total $J_{i(x,t)}$. D_i es el coeficiente de

difusión, $C_{i(x,t)}$ es la concentración de la especie a una distancia x de la superficie del electrodo y a un tiempo t de electrólisis, $\frac{\partial \phi_{(x,t)}}{\partial x}$ es el gradiente de potencial eléctrico y $v_{(x,t)}$ es la velocidad con que un elemento de volumen se mueve a lo largo del eje x . En la bibliografía^{141,142} se describen trabajos detallados respecto al transporte de materia en sistemas electroquímicos. En general estos son diseñados de manera tal de eliminar algunos términos de la ecuación 37, con lo que se logra simplificar la solución de la misma.

A fin de eliminar el término migratorio en la ecuación 36 se agrega a la solución un exceso de electrolito soporte con lo que el número de transporte del mismo se aproxima a la unidad, y por lo tanto es el principal responsable de las corrientes migratorias.

Si la solución se mantiene sin agitar ($v = 0$) y no hay gradientes grandes de concentración en el fluido, la contribución del tercer término de la ecuación 36 también será despreciable. Por lo tanto, la ecuación 37 se reduce a:

$$j_{i(x,t)} \cong -D_i \frac{\partial C_{i(x,t)}}{\partial x} \quad (38)$$

Esta ecuación es la primera ley de Fick a partir de la que se puede deducir la segunda ley de Fick:¹³⁹

$$\frac{\partial C_{i(x,t)}}{\partial t} = D_i \frac{\partial^2 C_{i(x,t)}}{\partial^2 x} \quad (39)$$

Por lo general, las soluciones de este tipo de ecuaciones no presentan una relación funcional única, y para conseguirla se deben establecer condiciones iniciales y de contorno que son específicas de cada técnica electroquímica y de la geometría del electrodo. La solución de la ecuación 37 dará la dependencia funcional de la concentración de la especie electroactiva con la distancia al electrodo y el tiempo de electrólisis. El conocimiento de esta relación funcional es de importancia fundamental, ya que la corriente eléctrica que circula por el sistema electroquímico bajo análisis está relacionada con el flujo de sustancia electroactiva mediante la siguiente ecuación:

$$-J_{i(0,t)} = \frac{i(t)}{nFA} \quad (40)$$

Tal como se menciona anteriormente, las distintas técnicas electroquímicas determinan las condiciones de contorno necesarias para la solución de la ecuación 37, generando de este modo las ecuaciones que relacionan las distintas variables del sistema cuando este es perturbado por un tipo de señal determinado. En caso que el sistema este constituido por N componentes se deben escribir N ecuaciones.

IV) Voltametría de Barrido Lineal y Cíclico de Potencial

Se da el nombre general de voltametría, al estudio de las relaciones corriente potencial que pueden derivarse de la aplicación de un potencial controlado al electrodo de trabajo. Si dicho potencial es variado con el tiempo a una velocidad constante, la técnica se denomina cronoamperometría de barrido lineal de potencial o voltametría lineal.¹⁴³

En la Figura 21 se muestra un diagrama de bloque del circuito usado en esta técnica electroanalítica como así también la perturbación impuesta al electrodo de trabajo mediante un generador de funciones y la respuesta de corriente típica observada en el registrador X-Y. La relación área del electrodo/volumen de solución es pequeña, de manera que no se producen cambios apreciables en la composición del sistema bajo análisis durante el transcurso de la experiencia.

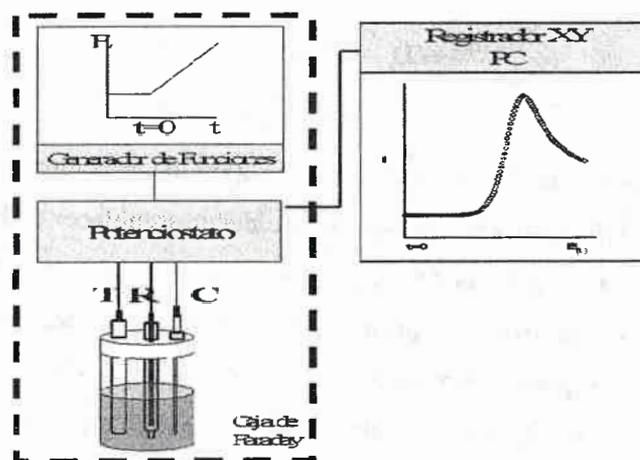


Figura 21: Esquema del circuito usado en esta técnica de barrido lineal de potencial y respuesta del sistema. Electrodo: (T) trabajo, (R) referencia y (C) contraelectrodo.

De manera cualitativa la forma de la onda de corriente puede explicarse mediante el análisis de un sistema reversible simple con un potencial estándar E^0 . A medida que el potencial del electrodo de trabajo se hace más positivo (comenzando desde un valor donde no se registra proceso faradaico), la concentración de la especie electroactiva R en la interfase comienza a disminuir, incrementándose su flujo hacia la superficie del electrodo y por lo tanto la corriente. Cuando el potencial del electrodo de trabajo es más positivo que E^0 la concentración de R sobre la superficie del electrodo tiende a cero, y la difusión de la especie electroactiva y la corriente alcanzan su valor máximo.

Por otra parte, si a un valor determinado de potencial E_λ (Figura 22) posterior al pico, se invierte el sentido del barrido de potencial, la técnica se denomina voltametría cíclica. La respuesta de este tipo de perturbación impuesta al electrodo de trabajo se muestra en la Figura 22. b, para el caso de un sistema reversible simple como el dado por la ecuación 27.

La existencia de la onda catódica se explica si se tiene en cuenta que al potencial E_λ existe un exceso de "O" sobre la superficie del electrodo. Por lo tanto, cuando el barrido de potencial cambia su dirección, el exceso de "O" comienza a reducirse dando lugar a una corriente catódica.

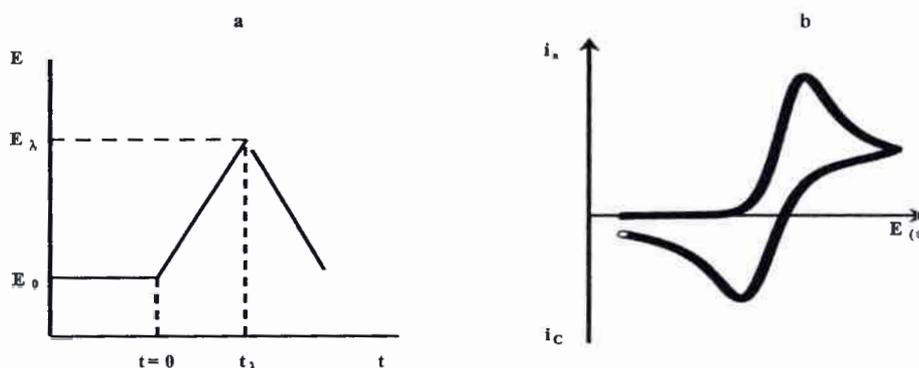


Figura 22: Voltametría cíclica. **a)** Perturbación potenciostática; **b)** Respuesta en corriente.

V) Solución de las ecuaciones difusionales

Dado el sistema electroquímico formado por dos especies representado por la ecuación 28, las ecuaciones difusionales que describen el sistema son del tipo de la ecuación 39

$$\frac{\partial C_{R(x,t)}}{\partial t} = D_R \frac{\partial^2 C_{R(x,t)}}{\partial^2 x} \quad (41)$$

$$\frac{\partial C_{O(x,t)}}{\partial t} = D_O \frac{\partial^2 C_{O(x,t)}}{\partial^2 x} \quad (42)$$

Las condiciones de contorno a $t=0$ y $t>0$ son:

$$t=0 \quad C_{O(x,0)} = C_O^* \quad (43)$$

$$C_{R(x,0)} = 0$$

$$t>0, \text{ si } x \text{ tiende a } \infty \quad C_{O(x,t)} = C_O^* \quad (44)$$

$$C_{R(x,t)} = 0$$

Por otra parte el balance de materia en la superficie del electrodo exige que los flujos cumplan con:

$$D_R \left(\frac{\partial C_{R(x,t)}}{\partial x} \right)_{x=0} + D_O \left(\frac{\partial C_{O(x,t)}}{\partial x} \right)_{x=0} = 0 \quad (45)$$

En la técnica de voltametría la variación de potencial con el tiempo es expresada por:

$$E_{(t)} = E_i - vt \quad (46)$$

Donde E_i es el potencial inicial y v es la velocidad de cambio de potencial (V/seg).

Cuando la velocidad de transferencia de carga heterogénea es alta, se cumple la ecuación de Nernst sobre la superficie del electrodo

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[C_{(O)(0,t)}]}{[C_{(R)(0,t)}]} \quad (47)$$

Dada la dependencia temporal del potencial del electrodo de trabajo, no puede ser extraído de la integral de Laplace, por lo que no es posible obtener una solución analítica del sistema de ecuaciones planteadas, por lo tanto, la resolución se obtiene por medio del uso de métodos numéricos.

La dependencia de la corriente con el potencial puede expresarse como¹⁴⁴

$$i = nFAC_0^* (\pi D_0 \sigma)^{1/2} \chi_{\sigma,t} \quad (48)$$

Donde $\chi_{\sigma,t}$ es una función adimensional del tiempo, definida como la ecuación integral:

$$\int_0^{\sigma} \frac{\chi(z)}{(\sigma - z)^{1/2}} dz = \frac{1}{1 + \xi \Theta S_{(\sigma)}} \quad (49)$$

En la que, $\xi = \left(\frac{D_R}{D_O}\right)^{1/2}$, $\Theta = \exp\left(\frac{nF}{RT}(E_i - E^0)\right)$, $S = \exp(-\sigma)$ y $\sigma = \frac{nF}{RT} v$.

La resolución numérica de la ecuación (49) da como resultada tablas de la función corriente adimensional ($\chi_{(\sigma)}$) en función del potencial a partir de estas tablas es posible reconstruir los voltogramas teóricos con el uso de los parámetros necesarios.

Para un sistema como el definido en la ecuación 28 la función $\chi_{(\sigma)}$ alcanza su valor máximo (a 25 °C) cuando $(E - E_{1/2}) = -28,5$ mV, siendo E igual al potencial de pico (E_p) del voltograma, $E_{1/2}$ es el potencial de media onda.

$$E_{1/2} = E^0 + \frac{RT}{nF} \text{Ln} \frac{[D_R^{1/2}]}{[D_O^{1/2}]} \quad (50)$$

El máximo de corriente (corriente de pico i_{pa}) es:

$$i_{pa} = \chi_{(E)} nF \left(\frac{nF}{RT}\right)^{1/2} \text{Area } D^{1/2} v^{1/2} C_0 \quad (51)$$

Por lo tanto para un pico reversible E_p es independiente de la velocidad de barrido e i_p es proporcional $v^{1/2}$.

En el caso de la voltimetría cíclica la resolución de las ecuaciones difusionales utiliza las mismas condiciones y de contorno, salvo para $t > \lambda$ (λ es el tiempo en que se invierte el sentido del barrido del potencial).

Cuando el potencial de inversión del barrido potencial es de por lo menos de 350 mV más positivo que el potencial de pico se cumple que¹⁴⁵:

$$\frac{i_{pc}}{i_{pa}} = 1 \quad (52)$$

Esta relación es un criterio muy valioso para detectar la presencia de reacciones químicas acopladas es la variación del cociente i_{pa}/i_{pc} en función de la velocidad de barrido.¹⁴⁶ Además, el análisis del valor de ΔE_p ($E_{pa} - E_{pc}$) permite el diagnóstico de un proceso reversible simple.¹⁴⁶

$$\Delta E_p = 2,303 \frac{RT}{nF}, T = 25 \text{ } ^\circ\text{C}, \Delta E_p = \frac{0.059}{n} \quad (53)$$

Por lo tanto, con el objetivo de emplear la voltimetría cíclica como técnica alternativa para caracterizar vesículas unilaminares de DOPC muchas veces se hará referencia a la ecuación 51.

3

Estudio en Medio Homogéneo PRODAN, DPH, DIA y HC

3. A-1. PRODAN

El comportamiento espectroscópico de PRODAN ha sido estudiado previamente determinando los máximos de absorción y emisión en diferentes solventes polares y no polares.¹⁴⁷⁻¹⁴⁹ Es más, el estudio ha sido extendido a una serie de alcoholes de diferente longitud en las cadenas hidrocarbonadas donde algunos autores demostraron que la molécula prueba es extremadamente sensible tanto a la polaridad como a la capacidad del solvente de formar puente hidrogeno.^{135,150}

Catalan y col.^{148,149} cuantificaron las interacciones específicas de PRODAN en diferentes solventes puros y mezcla de solventes y demostraron que la banda de emisión de la sonda es sensible a los parámetros SA (acidez solvente), SB (basicidad solvente) y SPP (polaridad / polarizabilidad del solvente). La banda de absorción fue correlacionada incluyendo el término SA en la ecuación de Lippert, observando que el grupo carbonilo y amino se comportan como aceptor y donador de puente hidrógeno respectivamente. Ellos concluyen que es incorrecto emplear a PRODAN como una sonda que sensa polaridad debido a las interacciones específicas existentes entre la molécula prueba y su microentorno.

Para entender un poco más esta molécula prueba se estudiaron las diferentes interacciones posibles de PRODAN mediante el método de comparación solvatocrómica de Kamlet y Taft (ecuación 17).¹¹²⁻¹¹⁴ Los espectros de absorción y/o de emisión de PRODAN fueron tomados en varios solventes orgánicos y se realizó una regresión lineal múltiple (MLR) entre la frecuencia del máximo de absorción o emisión con diferentes parámetros de solventes utilizando la ecuación (16). La Figura 23 muestra los espectros típicos de emisión en diferentes solventes, en tanto que, la Tabla 5 contiene la frecuencia de los máximos de absorción y emisión de los solventes empleados junto con los parámetros empíricos π^* , α y β del solvente.¹⁵⁴ Los resultados de las correlaciones se muestran en las ecuaciones (54) y (55)

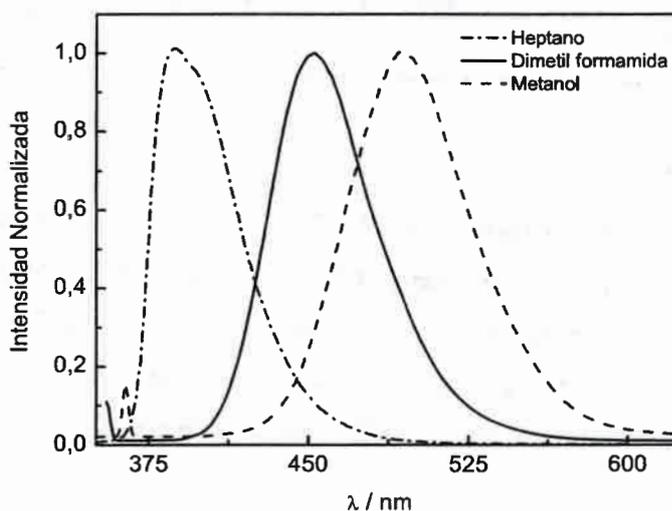


Figura 23. Espectros de emisión normalizados de PRODAN en medio homogéneo. [PRODAN] = 1×10^{-6} M. $\lambda_{exc} = 359$ nm.

De las correlaciones obtenidas en las ecuaciones (54) y (55) se observa que PRODAN sufre un corrimiento batocrómico con todos los parámetros usados, tanto en el estado fundamental (E.F) como en el estado excitado (E.E).

Tabla 5. Número de onda de absorción (ν_{abs}) y emisión (ν_{emi}) de PRODAN en diferentes solventes. $[\text{PRODAN}] = 1 \times 10^{-6}$ M. π^* , α y β parámetros obtenidos de referencia 154

Número	Solventes	ν_{abs} (cm^{-1})	ν_{emi} (cm^{-1})	π^*	α	β
1	1,2 propanodiol	27,18	20,02	0,92	0,90	0,52
2	Acetato de Etilo	28,60	22,84	0,45	0,00	0,45
3	Acetona	28,49	22,52	0,62	0,08	0,43
4	Ciclohexano	29,19	25,65	0,00	0,00	0,00
5	Decano	29,21	25,60	0,03	0,00	0,00
6	Etilenglicol	26,80	19,76	0,92	0,90	0,52
7	Metanol	27,52	19,92	0,60	0,98	0,66
8	Dimetil acetamina	28,03	22,07	0,85	0,00	0,76
9	Dimetilformamida	27,67	22,09	0,88	0,00	0,69
10	n-Butanol	27,38	20,73	0,47	0,84	0,84
11	n-Octanol	27,53	21,19	0,40	0,77	0,81
12	m-Xileno	28,59	24,15	0,45	0,00	0,12
13	Tetrahidrofurano	28,62	23,30	0,55	0,00	0,55
14	Tolueno	28,35	24,04	0,49	0,00	0,11
15	Benceno	28,39	23,99	0,55	0,00	0,10
16	Formamida	26,90	20,10	0,97	0,71	0,48
17	n-Heptano	29,09	25,65	-0,08	0,00	0,00
18	n-Hexano	29,18	25,63	-0,11	0,00	0,00
19	Glicerol	26,51	19,63	0,62	1,21	0,51
20	2-Propanol	27,68	21,07	0,48	0,76	0,84
21	Dicloroetano	27,39	23,11	0,73	0,00	0,10
22	Diclorometano	28,08	22,87	0,73	0,13	0,10
23	Dietil eter	28,95	24,30	0,24	0,00	0,47
24	Cloroformo	27,70	22,69	0,69	0,20	0,10
25	Cl ₄ C	28,72	24,65	0,21	0,00	0,10
26	Agua	28,07	19,03	1,09	1,17	0,47

$$v_{\text{abs.max}} = 29,13 \pm 0,09 - (1,4 \pm 0,2) \pi^* - (1,1 \pm 0,1) \alpha \quad (54)$$

$$n = 26, r = 0,97$$

$$v_{\text{emi.max}} = 25,2 \pm 0,20 - (2,6 \pm 0,2) \pi^* - (2,5 \pm 0,2) \alpha - (1,0 \pm 0,1) \beta \quad (55)$$

$$n = 26, r = 0,98$$

n = número de solventes utilizados, r = coeficiente de regresión

Mediante la ecuación (54) se determina que en el E.F la relación de $s/a \cong 1,3$, mostrando que PRODAN es ligeramente más sensible a la polaridad-polarizabilidad (π^*) que a la capacidad de donar puente hidrogeno del medio (α). Además se destaca la sensibilidad al parámetro α , dicha sensibilidad puede ser debida a la interacción puente hidrógeno entre los solventes capaces de donar hidrógenos y el grupo carbonilo de la molécula prueba.¹⁴⁸⁻¹⁵⁰

Por otro lado, la ecuación (55) muestra que en el E.E esta molécula, es aproximadamente dos veces más sensible a los mismos parámetros (π^* y α) que en el E.F. Debido a que en el E.E la interacción puente hidrogeno es más susceptible que en el E.F, los corrimientos de los espectros de emisión por polaridad-polarizabilidad son más notorios y por lo tanto el corrimiento de Stokes de la molécula es mayor en aquellos solventes que poseen π^* grande.¹⁴⁹ Como se observa la v de E.E PRODAN correlaciona con β y esto podría ser debido a la transferencia de carga que sufre la molécula con la excitación. Aquí el parámetro β indicaría que PRODAN en el E.E es capaz de recibir electrones del solvente. Así mismo, dicha transferencia de carga hace que PRODAN tenga un mayor momento dipolar en el estado excitado comparado con el E.F y por ende sea más sensible al parámetro π^* . Todas estas conclusiones están de acuerdo con las interacciones descritas previamente por Catalán y col. usando otros parámetros de solventes.^{148,149}

Por otro lado, se calculó la energía de la transición de las bandas de absorción y emisión (expresada en kcal mol^{-1}), $E_{\text{abs PRODAN}}$ y $E_{\text{emi PRODAN}}$ y se demostró que pueden correlacionar con la escala de polaridad $E_{T(30)}$, tal cual lo muestran las ecuaciones (56) y (57).

$$E_{T(30)} = 345 \pm 5 - (3,78 \pm 0,02) E_{\text{abs PRODAN}} \quad (56)$$

$$r = 0,95, \quad n = 26$$

$$E_{T(30)} = 147 \pm 5 - (1,62 \pm 0,02) E_{\text{emi PRODAN}} \quad (57)$$

$$r = 0,98, \quad n = 26$$

Otros autores, demostraron que la energía de la transición de la banda de absorción visible de 1-metilo-8-oxiquinolinio, una betaína (QB) que es sensible a los mismos parámetros que PRODAN, correlaciona con $E_{T(30)}$ y es empleada como sonda para sensar micropolaridad.^{92,151} Como se verá más adelante, se empleó PRODAN como sonda para determinar diferente micropolaridad en la interfaz de micelas inversas no acuosas y de vesículas unilaminares grandes de DOPC.

3. A-2. Estudio en agua

Con el fin de obtener información acerca del comportamiento fotofísico de la molécula PRODAN en agua, se realizaron experiencias de absorción y emisión. Es preciso aclarar, que la importancia del estudio fotofísico de PRODAN en agua es debido a que dicho solvente es el medio dispersante en donde se formaran las vesículas de DOPC.

La Figura 24 y Figura 25 muestran los espectros de absorción en ϵ (coeficiente de extinción molar) y los valores de absorbancia a $\lambda_{\text{max}} = 360 \text{ nm}$ variando la concentración de PRODAN en agua, respectivamente. Mientras que la Figura 26 y la Figura 27 se muestran los espectros de emisión y la relación de intensidades de las bandas de emisión ($I_{\lambda 430} / I_{\lambda 525}$) con la variación de la concentración.

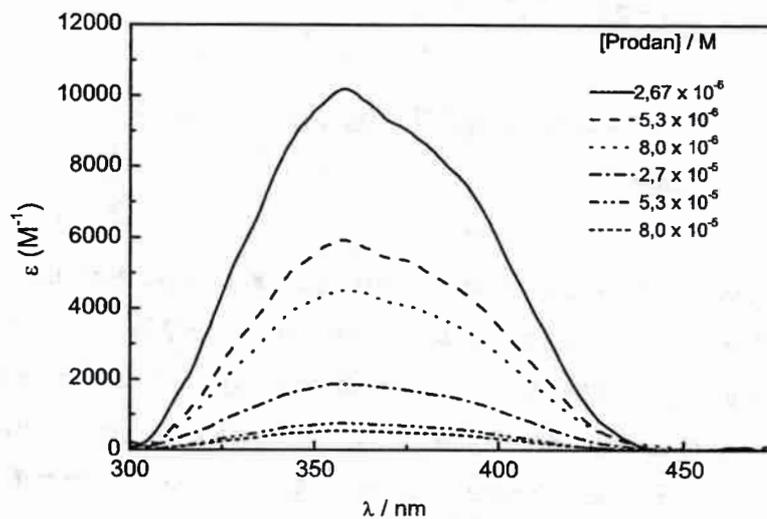


Figura 24. Espectros de absorción de PRODAN en agua variando la concentración.

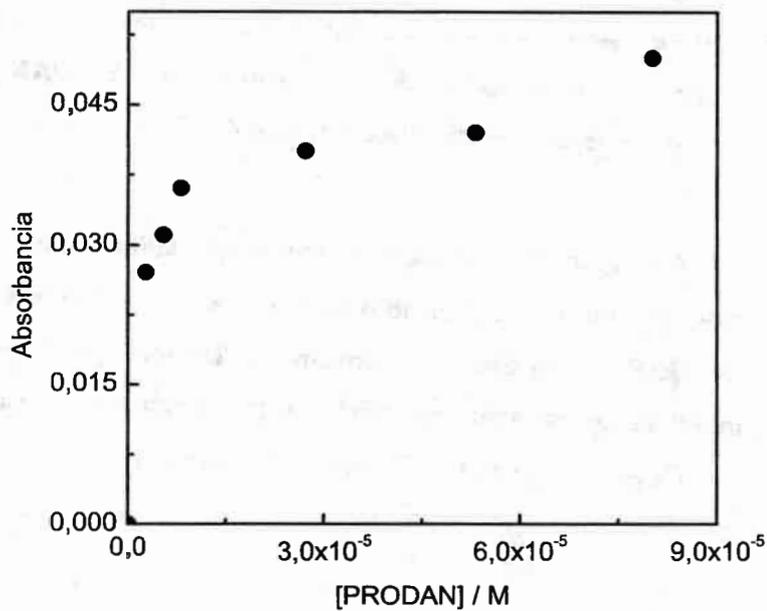


Figura 25. Absorbancia vs. concentración de PRODAN en agua. $\lambda_{max} = 360 \text{ nm}$.

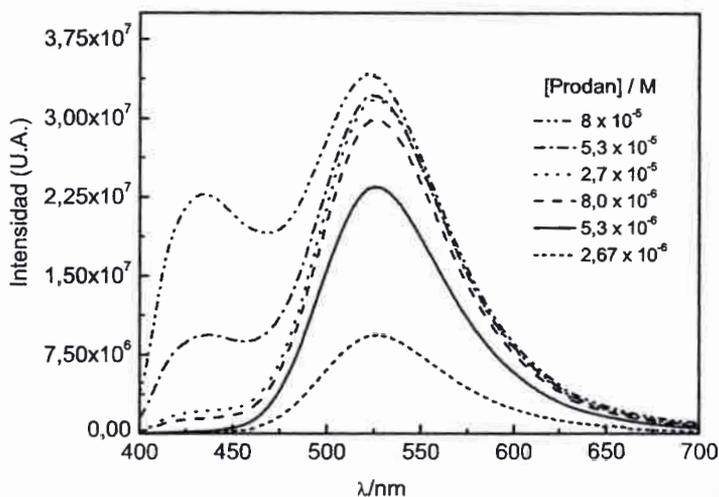


Figura 26. Espectros de emisión de la molécula de PRODAN en agua variando la concentración. $\lambda_{exc} = 389$ nm.

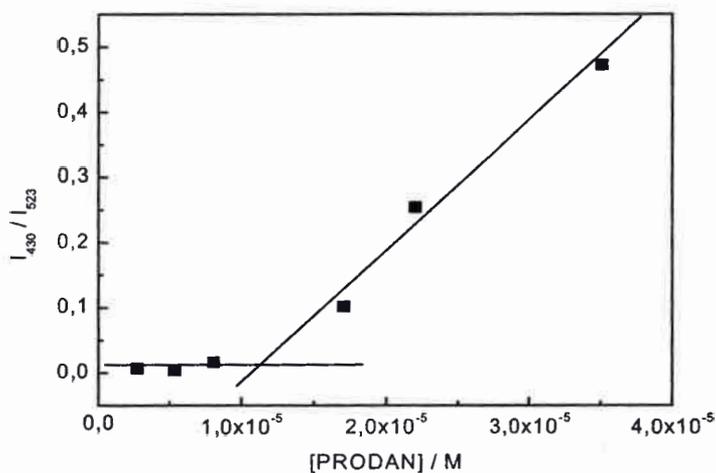


Figura 27. Relación de intensidad entre la banda a 430 nm y 525 nm. $\lambda_{exc} = 389$ nm

De los espectros de absorción y emisión se observa que existe una disminución en el coeficiente de extinción molar (Figura 24) y la aparición de una nueva banda de emisión centrada en 430 nm (Figura 26) en agua. En tanto que en la Figura 25, se observa que PRODAN no cumple con la ley de Lambert y Beer. Estos indicios sugieren

la posibilidad que PRODAN esté agregándose en agua cuando se aumenta su concentración. Es decir, a medida que la concentración de PRODAN aumenta el coeficiente de extinción molar disminuye (Figura 24); lo que estaría indicando que el proceso de transferencia de carga intramolecular es menos probable en el agregado de PRODAN. Es más, en los espectros de emisión claramente se ve que a bajas concentraciones solo existe una banda centrada alrededor de 525 nm, que es asignada a la especie monomérica. Cuando la concentración se incrementa, la banda nueva centrada en 430 nm aparece y se la asigna al agregado. Además, la relación de intensidad de ambas bandas muestra un quiebre alrededor de la concentración 1×10^{-5} M de la molécula prueba (Figura 27), el cual estaría indicando la concentración máxima en donde podemos encontrar a PRODAN como monómero, a mayores concentraciones empezaría a agregarse.

El comportamiento fotofísico de PRODAN en agua ha sido investigado por otros autores,¹⁵¹⁻¹⁵⁵ pero no ha sido entendido completamente. La aparición de una nueva banda hacia el azul de la banda de emisión (aproximadamente en 430 nm) ha sido interpretada de diferentes formas: i) formación de complejos soluto-solvente vía interacción puente hidrógeno,^{151,152} ii) trazas de impurezas solubles en agua¹⁵² y iii) asociación de n-monómeros que puede dar origen a eventuales microcristales.^{153,154}

Otros autores^{150,153,154} intentaron caracterizar el agregado usando técnicas espectrofotométricas pero hay alguna controversia en sus resultados, dejando inciertos algunos aspectos. Por ejemplo, Flora y col.¹⁵⁴ encontraron un valor de anisotropía en estado estacionario significativamente mayor a la longitud de onda de emisión del agregado ($\lambda = 430$ nm), mientras que, a la longitud de onda de emisión del monómero ($\lambda = 595$ nm), la anisotropía es menor. Luego calcularon el volumen de unidad rotante mediante la ecuación de Perrin (ecuación 21) utilizando tiempos de vida de 2,07 ns para el agregado y 1,45 ns para el monómeros. Los valores que encontraron fueron $V_{430} = 730$ ml mol⁻¹ y $V_{595} = 284$ ml mol⁻¹. Sin embargo, Balter y col.¹⁵⁰ encontraron otros valores para los tiempos de vida de fluorescencia. A la longitud de onda de emisión del monómero encontró que la molécula PRODAN posee una componente biexponencial ($\tau_1 \cong 0,5$ ns, $\tau_2 \cong 1,9$ ns) y a la longitud de onda del agregado la aparición de un tiempo de vida mayor (13 ns). Sin embargo, el origen de esta

componente no fue comprendido, ni estudiado. Sun y col.¹⁵³ sugieren que esta componente de tiempo de vida tan grande se debe a la formación del agregado que estaría emitiendo a una longitud de onda menor que la del monómero. Es preciso hacer notar que Flora y col.,¹⁵⁴ aparentemente calcularon erróneamente el volumen de la unidad rotante del agregado debido a una incorrecta asignación del tiempo de vida del mismo. Estos autores consideraron el tiempo de vida del agregado con un valor de 2,07 ns, cuando realmente el valor es aproximadamente siete veces mayor ($\tau \cong 13$ ns).

Debido a estas controversias y para entender el proceso de agregación de PRODAN, se decidió reinvestigar los tiempos de vida de fluorescencia y los valores de depolarización en estado estacionario. En la Tabla 6 se informan los tiempos de vida y los valores de $\langle r \rangle$ obtenidos a diferentes concentraciones de PRODAN. Como puede observarse, a bajas concentraciones la molécula desagregada posee dos tiempos de vida (τ_1 y τ_2), mientras que, a alta concentración, donde está agregada, aparece un nuevo tiempo de vida más grande (τ_3) el cual es asignado al agregado.

Tabla 6. Tiempos de vida de fluorescencia de PRODAN en agua. $\langle r_m \rangle$ and $\langle r_{ag} \rangle$ son los valores de anisotropía en estado estacionario del monómero y agregado respectivamente.

[PRODAN]	$\lambda_{exc}:360nm$ $\lambda_{emi}:430nm$	$\lambda_{exc}:360nm$ $\lambda_{emi}:525nm$
1×10^{-6} M		$\tau_1 = 2,27 \text{ ns} \pm 0,01$ (43,5%) $\tau_2 = 0,65 \text{ ns} \pm 0,03$ (56,5%) $\chi^2 = 1,16$ $\langle r_m \rangle = 0,018 \pm 0,005$
3×10^{-5} M	$\tau_1 = 2,69 \text{ ns} \pm 0,09$ (44,6%) $\tau_2 = 0,30 \text{ ns} \pm 0,04$ (30,2%) $\tau_3 = 14,6 \text{ ns} \pm 0,03$ (25,2%) $\chi^2 = 1,11$ $\langle r_{ag} \rangle = 0,045 \pm 0,005$	$\tau_1 = 2,58 \text{ ns} \pm 0,06$ (36,1%) $\tau_2 = 0,81 \text{ ns} \pm 0,03$ (63,9%) $\chi^2 = 1,39$

χ^2 es la suma de las desviaciones estándares y los valores en paréntesis es la contribución de la especie obtenida desde el fito.

El origen de los dos tiempos de vida a bajas concentraciones de PRODAN fue

explicado por Ilch y col.¹⁵⁵ teniendo en cuenta que la molécula emite desde dos estados diferentes, un estado localmente excitado y otro de transferencia de carga.

Se recalculó el volumen de la unidad rotante del agregado usando los valores de anisotropía en estado estacionario calculados (Tabla 6) y la ecuación (21), ecuación de Perrin y los volúmenes de la unidad rotante obtenidos a 25 °C son $V_{430} = 5590 \text{ mL mol}^{-1}$ y $V_{525} = 222 \text{ mL mol}^{-1}$ para el agregado y monómero respectivamente. De esta manera se comprobó que el volumen de la unidad rotante calculado para el monómero es similar al informado por Flora y col.,¹⁵⁴ pero muy diferente el encontrado para el agregado.

3. A-3. Estudio electroquímico de la molécula PRODAN en agua

Debido a que no se ha empleado técnicas electroquímicas como herramienta para ver si PRODAN en agua es electroactivo, sólo su mecanismo electroquímico en acetonitrilo se ha informado,¹⁵⁶ se procedió a investigar su comportamiento en dicho solvente ya que el mismo es el solvente empleado en la formación de vesículas unilaminares grandes de DOPC. Se realizaron estudios electroquímicos de la molécula de PRODAN en medio acuoso mediante la técnica de voltametría cíclica. Dicha técnica, fue elegida debido a que posee un amplio desarrollo matemático, el cual favorece los diferentes análisis a realizar.

Se comenzó el estudio empleando diferentes concentraciones de PRODAN en agua y se utilizó como electrolito soporte LiClO_4 0,1 M. Se muestra en la Figura 28 un voltograma típico obtenido de PRODAN en agua. Del mismo se puede observar un pico de oxidación a 0,32 V y no se observa el pico de reducción en el barrido inverso, el cual es típico de un proceso de transferencia de carga reversible, lo que indicaría que el proceso de transferencia de carga corresponde a un mecanismo complicado con reacciones químicas acopladas a la transferencia de carga.¹⁵⁷

Se comenzó a estudiar el mecanismo mediante el programa Digi-Sim para diferentes voltagramas y se encontró que el mecanismo que mejor ajusta a los datos experimentales es un mecanismo Electroquímico-Químico de primer orden tal cual se observa en el esquema 1:

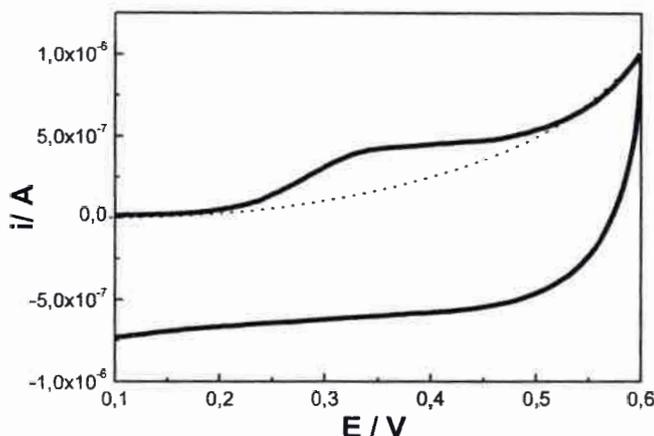
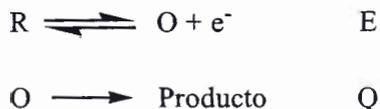


Figura 28. Voltagramas cíclicos de la PRODAN. Intervalo de potencial barrido 0 V- 0,6 V. $v = 50 \text{ mV seg}^{-1}$. [PRODAN] $6 \times 10^{-6} \text{ M}$. Electrodo de trabajo: alambre de Pt, electrodo de referencia: Ag/ClAg.



Esquema 1. Mecanismo electroquímico-químico (E-Q), de primer orden simulado con el programa Digi-Sim.

Es necesario aclarar que, no es necesario estudiar el mecanismo detallado porque solo se empleará la electroquímica de PRODAN como herramienta para caracterizar vesículas de DOPC. Solo se hará incapie en el estudio de los voltagramas mediante el uso de la ecuación (51) detallada en el Capítulo 2. Así, la corriente de pico (i_p), después de ser corregida por línea de base, se puede expresar como:

$$i_p = \chi_{(E)} nF (nF/RT)^{1/2} \text{Area} D_w^{1/2} v^{1/2} [C^{\text{electroactiva}}] \quad (58)$$

donde n es el número de electrones, y para el proceso electroquímico de PRODAN le corresponde un valor de 1; F es la constante de Faraday, A es el área del electrodo; D_w es el coeficiente de difusión de de PRODAN en agua, $C^{\text{electroactiva}}$ es la concentración de la especie electroactiva en mol cm^{-3} , v es la velocidad de barrido en Volt seg^{-1} , $\chi_{(E)}$ es la función corriente y es adimensional.

Para poder estimar el valor de la $\chi_{(E)}$ es necesario realizar un ajuste experimental de los voltogramas obtenidos en la Figura 28 y conocer el valor del coeficiente de difusión de PRODAN en agua (D_w). Un valor de $\chi_{(E)} = 0,44113$ fue obtenido del ajuste experimental. El valor empleado de D_w fue $7 \times 10^{-6} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$. Dicho valor se obtuvo relacionando el coeficiente de difusión de PRODAN en ACN¹⁵⁶ con la ecuación de Einstein-Stokes.

$$D \eta = \frac{KT}{6\pi R_{\text{sol}}} \quad (59)$$

donde D el coeficiente de difusión de la molécula, η es la viscosidad del solvente, K es la constante de Boltzmann's, T es la temperatura en °K y R_{sol} es el radio de la molécula de soluto.

Es preciso aclarar que a diferencia de lo que le ocurre en agua (Cap 3.A-2.), PRODAN no se agrega en ACN¹⁵⁶. Por lo que, el valor obtenido de D_w corresponde al monómero de PRODAN en agua.

Al estudiar la variación de i_p con $v^{1/2}$ se observó una dependencia lineal para cada una de las concentraciones de trabajo de PRODAN, ver Figura 29 y Figura 30. Tal dependencia indica que el proceso de transferencia de carga está gobernado, en el intervalo de concentraciones estudiado, por la difusión, es decir, no existe adsorción sobre la superficie del electrodo.¹³⁹

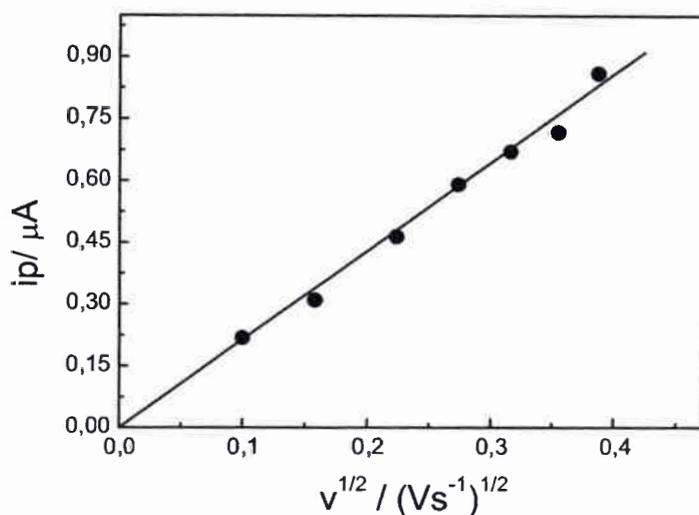


Figura 29. Variación de la i_p en función de $v^{1/2}$. $[PRODAN] = 6 \times 10^{-6}$ M. $[LiClO_4] = 0,1$ M

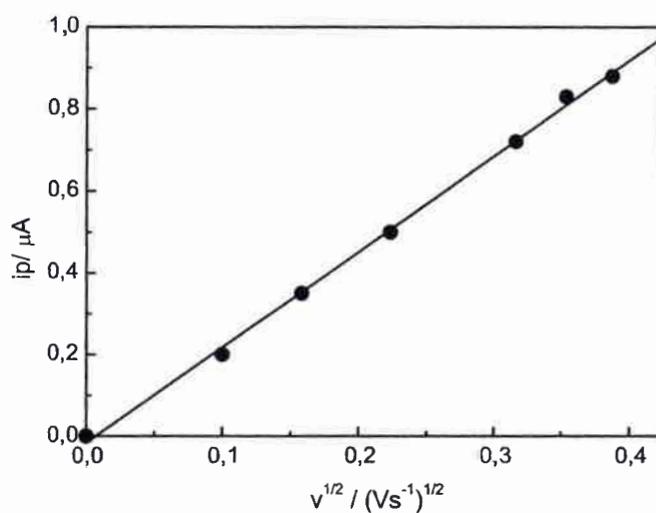


Figura 30. Variación de la i_p en función de $v^{1/2}$. $[PRODAN] = 2 \times 10^{-5}$ M. $[LiClO_4] = 0,1$ M.

En el Figura 31 se gráfica la variación de i_p a diferentes concentraciones de PRODAN a 50 mV seg^{-1} . En la misma se observa que no existe una dependencia lineal en el intervalo de concentraciones estudiadas tal cual lo predice la ecuación (58); a $[PRODAN] > 1,5 \times 10^{-5}$ M la i_p prácticamente se mantiene constante. Este resultado concuerda con los resultados obtenidos espectrofotométricamente (Cap 3.A-2.) y

estarían indicando que la concentración analítica de la molécula PRODAN, no es la concentración real que esta involucrada en el proceso de oxidación. Como vimos en los estudios realizados en medio homogéneo es conocido que en agua $[\text{PRODAN}] > 1 \times 10^{-5}$ M, la molécula sufre un proceso de agregación el cual ha sido estudiado por espectrofotometría (Cap 3.A-2.). En presencia del agregado, el coeficiente de extinción molar de PRODAN disminuye drásticamente (Figura 24) poniendo en evidencia que el proceso de transferencia de carga esta siendo perturbado. Es decir, la transferencia de carga desde el grupo carbonilo al grupo amino de la molécula se ve impedido.

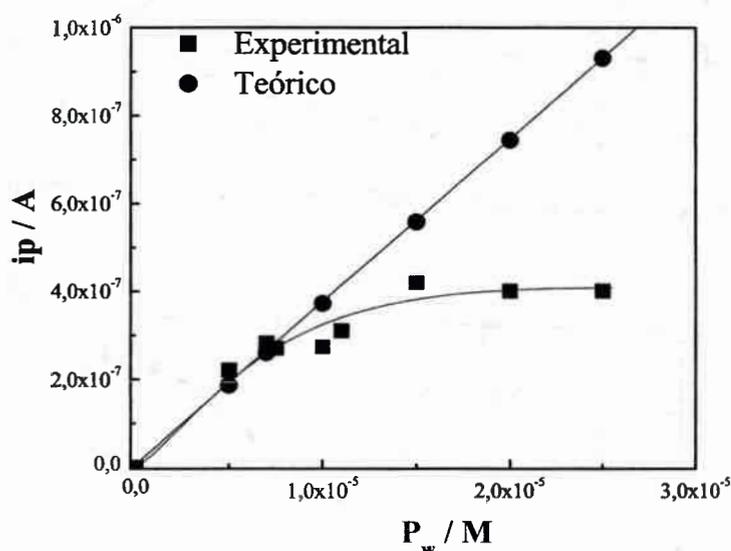


Figura 31. Variación de la i_p en función de $[\text{PRODAN}]$. $[\text{LiClO}_4] = 0,1 \text{ M}$. $v = 50 \text{ mV seg}^{-1}$

De esta manera, es posible suponer que cuando en condiciones experimentales está presente el agregado, el mismo sería no electroactivo en la zona de potencial estudiada. Por lo tanto la corriente medida corresponde a la descarga de la molécula PRODAN como monómero.

Sin embargo, se ve la necesidad de encontrar una ecuación que relacione la concentración analítica de la molécula PRODAN (P_w) con la concentración electroactiva de la molécula PRODAN (P_w^{mono}). Para ello, se prepararon soluciones de diferentes concentraciones analíticas de PRODAN y luego se determinó experimentalmente el valor de i_p . Posteriormente, mediante el empleo de la ecuación 58 fue posible determinar el valor de la concentración electroactiva correspondiente a cada

valor experimental de i_p . Luego se gráfica los valores de P_w^{mono} en función de P_w (Figura 32) y se realiza un ajuste de los puntos experimentales. La ecuación que ajusta dichos puntos es:

$$P_w^{\text{mono}} = A_1 - A_2 \exp(kP_w) \quad (60)$$

en donde A_1 , A_2 y k son constantes que carecen de significado físico. Los valores obtenidos son $A_1 = 1,10 \times 10^{-5}$, $A_2 = 1,24 \times 10^{-5}$ y $k = 2 \times 10^{-4}$.

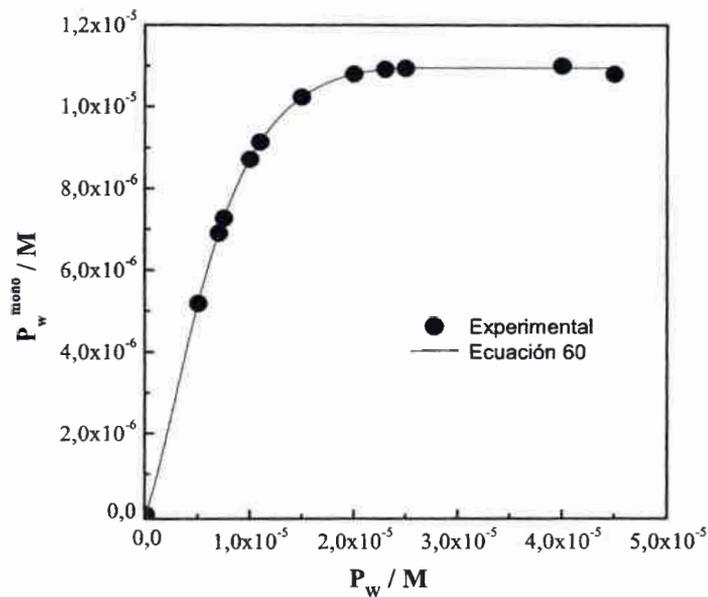


Figura 32. Variación de i_p en función de [PRODAN]. $[LiClO_4] = 0,1 M$. $v = 50mV \text{ seg}^{-1}$.

Esta ecuación es empírica y será empleada más adelante como una herramienta para poder calcular los parámetros de interés en el estudio electroquímico de PRODAN incorporado en vesículas unilaminares grandes de DOPC.

3. B-1. DPH

Otra de las sondas empleadas para sensar el interior de las membranas es la molécula DPH. Es conocido¹⁰¹, que la ubicación del colorante en bicapas lipídicas va acompañada de un gran aumento en su fluorescencia siendo, en agua, la misma prácticamente nula.

Los espectros de absorción y/o de emisión de DPH fueron tomados en varios solventes orgánicos. En la Figura 33 se muestran los espectros típicos de la banda de absorción de DPH. Al igual que lo realizado con la molécula PRODAN, se estudiaron las diferentes interacciones posibles de DPH mediante el método de comparación solvatocrómica de Kamlet y Taft.¹¹²

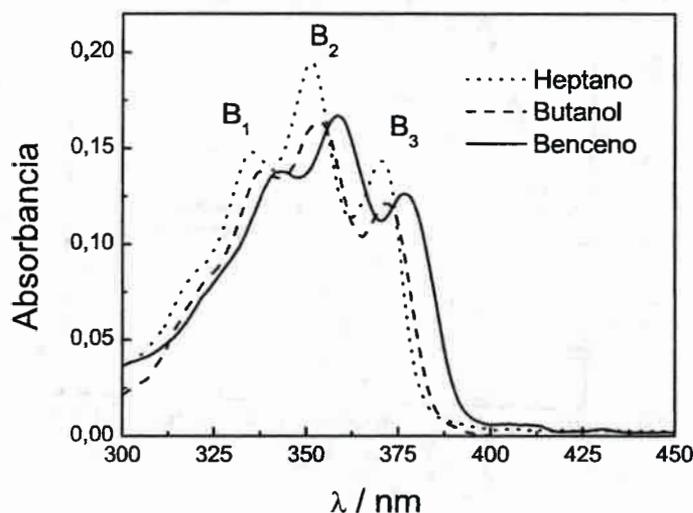


Figura 33. Espectros de absorción UV-Visible de la molécula DPH en solventes puros. [DPH] = $2,5 \times 10^{-6}$ M

En la Tabla 7 se muestran los valores de los máximos de absorción y emisión junto a los parámetros empíricos π^* , y β del solventes.¹⁵⁴

Los resultados de los máximos de los espectros de absorción y emisión que aquí se informan son los obtenidos de la banda centrada a la menor longitud de onda de los espectros (B_1), sin embargo las mismas correlaciones fueron aplicadas en las bandas restantes (B_2 , B_3) de ambos espectros obteniendo resultados similares a los informados.

Tabla 7. Número de onda de absorción (ν_{abs}) y emisión (ν_{emi}) de la banda B₁ de DPH en diferentes solventes. [DPH] = $2,5 \times 10^{-6}$ M. π^* y β parámetros obtenidos de referencia 154.

Número	Solventes	ν_{abs} (cm^{-1})	ν_{emi} (cm^{-1})	π^*	β
1	Etilen glycol	29,45	24,75	0,92	0,52
2	Metanol	29,75	24,95	0,60	0,66
3	Butanol	29,55	24,89	0,47	0,84
4	Octanol	29,53	24,86	0,40	0,81
5	m-Xyleno	29,40	24,72	0,45	0,12
6	Tolueno	29,19	24,70	0,49	0,11
7	2-Propanol	29,79	24,93	0,48	0,84
8	Dicloro etano	29,24	24,73	0,73	0,10
9	Dicloro metano.	29,73	24,80	0,73	0,10
10	Eter etílico	29,89	24,96	0,24	0,47
11	Cloroformo	29,37	24,75	0,69	0,10
12	Dimetil formida	29,44	24,74	0,88	0,69
13	Acetonitrilo	29,65	24,90	0,66	0,40
14	Acetato de etilo	29,68	24,94	0,45	0,45
15	Ciclohexano	29,69	24,93	0,00	0,00
16	Decano	29,73	24,96	0,03	0,00
17	Heptano	29,83	24,98	-0,08	0,00
18	Hexano	29,88	24,98	-0,11	0,00

En las ecuaciones (61) y (62) se muestran los resultados de las correlaciones para las bandas de absorción y emisión de DPH.

$$\nu_{\text{abs.max}} = 29,73 \pm 0,05 - (0,69 \pm 0,08) \pi^* + (0,42 \pm 0,09) \beta \quad (61)$$

$$n = 18, r = 0,91$$

$$\nu_{\text{emi.max}} = 24,94 \pm 0,02 - (0,33 \pm 0,04) \pi^* + (0,17 \pm 0,05) \beta \quad (62)$$

$$n = 18, r = 0,92$$

n = número de solventes utilizados, r = coeficiente de regresión.

De las mismas, se observa que DPH es sensible tanto a la polaridad/polarizabilidad (parámetro π^*) como a la capacidad de donar electrones (parámetro β). Los corrimientos de sus bandas, por estos efectos, son opuestos: corrimiento al rojo (solvatocromismo positivo) al aumentar la polaridad y corrimiento al

azul (solvatocromismo negativo) al aumentar la capacidad β lo que resulta extraño dado que este compuesto no es dador de hidrógeno. Otros autores¹⁵⁸, estudiaron una serie de moléculas de carotenos que poseen sistema π conjugado y observaron que los mismos correlacionaron con el parámetro β , atribuyendo dicho efecto a la conjugación de los dobles enlaces que actúan como aceptores de electrones. Al parecer DPH debido al sistema π conjugado que posee también tiene la capacidad de aceptar electrones y por lo tanto correlaciona con el parámetro β .

Debido a su baja solubilidad en agua no fue posible investigar su comportamiento en tal solvente tal como se realizó con PRODAN.

3. C-1. Hemicianinas. DIA y HC

El ioduro de trans-4-[4-(dihexadecil amino)-estiril]-1-metil piridinio (DIA) e ioduro de trans-4-[4-(dimetilamino)-estiril]-1-metilpiridinio (HC) son hemicianinas que presentan dos bandas de absorción.^{159,160} Una es asignada a la transición π, π^* centrada aproximadamente en 350 nm, la otra banda esta centrada en 250 nm y corresponde a las transiciones prohibidas características de los sistemas aromáticos (piridinio y benceno). La posiciones de la bandas de absorción varían dependiendo del solvente a utilizar.

A diferencia de otras moléculas prueba, todas las hemicianinas¹⁵⁹ presentan características espectroscópicas anómalas. Es decir, los corrimientos por absorción y emisión son opuestos con el aumento de la constante dieléctrica del solvente. Los corrimientos de los espectros de absorción son hacia longitudes de ondas menores (corrimiento hipsocrómico), mientras que los de emisión son hacia longitudes de ondas mayores (corrimiento batocrómico).

Fromherz y col.¹⁶⁰ estudiaron una serie de hemicianinas zwitteriónicas y determinaron que la localización de la carga en el estado fundamental y estado excitado no es la misma. En el estado fundamental se ubica sobre el N del anillo piridinio, mientras que en el estado excitado esta sobre el N de la amina terciaria (ver Figura 34). Se demostró que el valor absoluto del momento dipolar (μ) permanece prácticamente constante, solo cambia la orientación luego de la excitación.

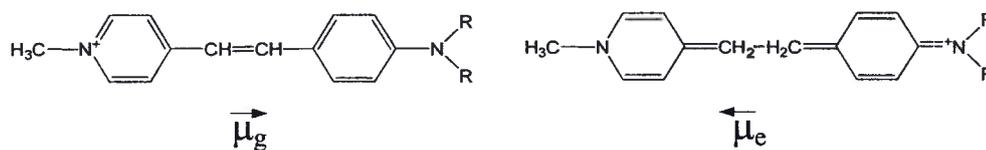


Figura 34. Localización de la carga en el estado fundamental (E.F) y el estado excitado (E.E) de las hemicianinas. Siendo μ_g y μ_e los momentos dipolares en el estado fundamental y excitado respectivamente.

Además, Fromherz y col.¹⁶⁰ determinaron la banda cero – cero (ν_{00}) como el promedio de la ν_{abs} y ν_{emi} (ecuación (63)).

$$\nu_{00} = \frac{\nu_{abs} + \nu_{emi}}{2} \quad (63)$$

Ellos observaron que ν_{00} permanece constante en una serie de solventes, independientemente del valor de la constante dieléctrica, concluyendo que esto se puede deber a que, tanto el estado excitado como el fundamental están siendo solvatados en forma similar.

3. C-2. DIA

Para poder comprender el comportamiento espectroscópico anómalo de estas hemicianinas y determinar qué tipo de interacción predomina en su comportamiento espectroscópico, se realizó el estudio del comportamiento de DIA en medio homogéneo. En la Figura 35 se muestra los espectros característicos de emisión de la sonda DIA en diferentes solventes.

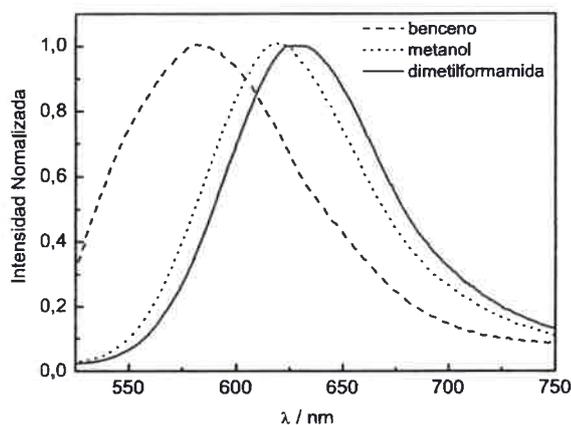


Figura 35. Espectros de emisión normalizados de DIA. [DIA] = 1×10^{-6} M

Como se observa en la Figura 35, DIA muestra un corrimiento batocrómico del máximo de emisión al aumentar la polaridad del solvente.

En la Tabla 8 se muestran los valores de v_{\max} obtenidos tanto por absorción v_{abs} como por emisión v_{emi} , los valores de Stokes v_{stokes} y el valor de la frecuencia v_{00} en todos los solventes medidos.

Tabla 8. Frecuencia de absorción (v_{abs}), emisión (v_{emi}), corrimiento de stokes (v_{stokes}) y banda cero – cero (v_{00}) en diferentes solventes. [DIA] = 1×10^{-6} M. π^* y β parámetros del solventes obtenidos de referencia.154

Número	Solventes	v_{abs} (cm^{-1})	v_{emi} (cm^{-1})	v_{stokes} (cm^{-1})	v_{00} (cm^{-1})	π^*	β
1	Acetona	20,40	15,97	4,43	18,18	0,62	0,49
2	Etilenglicol	20,36	16,08	4,27	18,22	0,92	0,52
3	Metanol	20,31	16,14	4,17	18,22	0,6	0,66
4	Butanol	19,87	16,22	3,65	18,05	0,47	0,84
5	Tetrahidrofurano	20,36	16,20	4,16	18,28	0,58	0,55
6	2 - Propanol	20,11	16,29	3,83	18,20	0,48	0,84
7	Acetonitrilo	20,45	15,92	4,53	18,19	0,66	0,39
8	Etanol	20,15	16,19	3,96	18,17	0,50	0,75
9	Formamida	20,54	16,01	4,52	18,27	0,97	0,48
10	Octanol	20,06	16,37	3,69	18,22	0,40	0,81
11	Benceno	20,38	17,12	3,26	18,75	0,59	0,10
12	Tolueno	20,04	16,83	3,21	18,43	0,54	0,11
13	p-Xyleno	19,99	17,15	2,84	18,57	0,47	0,12
14	Heptano	21,74	17,32	4,42	19,53	-0,08	0,00
15	Decano	22,39	16,39	6,00	19,39	0,03	0,00
16	Dicloroetano	18,62	16,29	2,33	17,45	0,73	0,10
17	Diclorometano	18,37	17,39	0,98	17,88	0,73	0,10

En la Figura 36 se muestra las variaciones de las frecuencias de absorción (v_{abs}), emisión (v_{emi}) y cero – cero (v_{00}) con el aumento del parámetro π^* . Los valores de la v_{abs} aumenta y v_{emi} disminuye al aumentar la polaridad del medio, mientras que la v_{00} permanece constante. Al no variar la v_{00} con el aumento de la polaridad, la molécula

prueba estaría indicando que tanto el estado excitado como el fundamental están siendo solvatados en forma similar, tal cual lo observado por Fromherz y col.¹⁶⁰ con las hemicianinas zwitteriónicas.

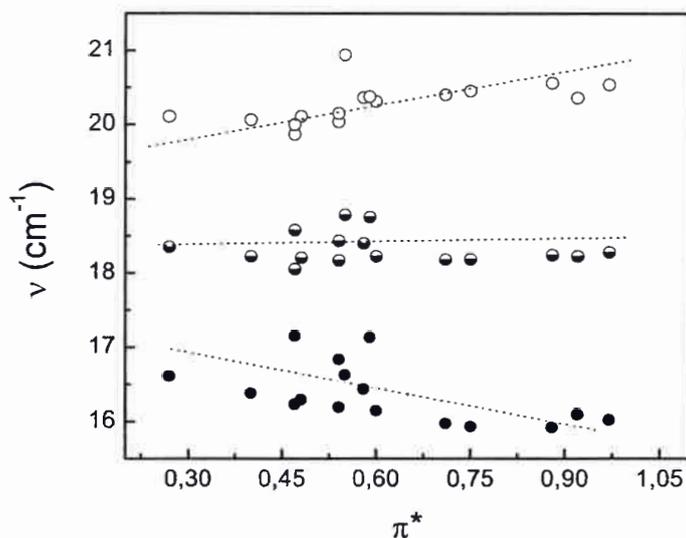


Figura 36. Corrimientos de la ν_{abs} (○), $\nu_{\text{em.}}$ (●) y ν_{00} (⊖) en solventes de diferentes polaridad. [DIA] = 1×10^{-6} M.

Como la hemicianina posee una carga (+) en su estructura se procedió a investigar si la misma puede sufrir algún tipo de interacción específica, posibilidad que no había sido explorada hasta el momento. Para ello se procedió a investigar el efecto dador de electrones del medio (parámetro β) sobre su solvatocromismo.

En la ecuación (64) se muestra la correlación de la frecuencia de absorción con el parámetro β y la Figura 37 muestra la regresión lineal de la misma. Los mismos mostrarían que la molécula DIA es sensible a dicho parámetro, indicando la habilidad de la molécula a aceptar electrones y protones del solvente.

$$\nu_{\text{abs}} = 20,97 - (1,12 \pm 0,16) \beta \quad (64)$$

C[N+]1=CC=C(C=C1)/C=C/C2=CC=C(N(C)C)C=C2

$n = 10 \quad r = 0,96$

Es preciso aclarar que los solventes de $\beta < 0,12$ han sido excluidos porque la molécula se agrega tal como se explicara mas adelante.

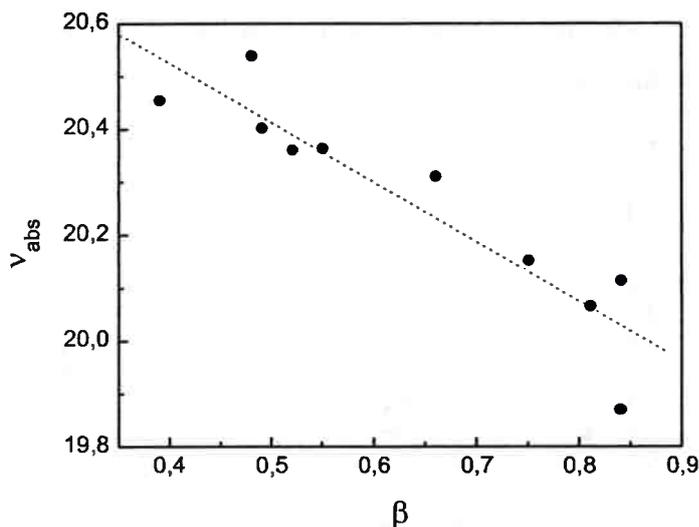
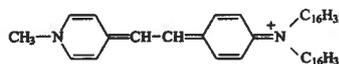


Figura 37. Regresión lineal de la v_{abs} de DIA con el parámetro β . $[DIA] = 1 \times 10^{-6}$ M.

En la ecuación (65) se muestra la correlación de la frecuencia de emisión con el parámetro β y la Figura 38 muestra la regresión lineal de la frecuencia de emisión. Los mismos indicarían que la molécula DIA sufre un solvatocromismo negativo al aumentar el parámetro β .

$$v_{emi} = 15,66 + (0,75 \pm 0,13) \beta \quad (65)$$

$$n = 10 \quad r = 0,94$$



Las correlaciones obtenidas en las ecuaciones (64) y (65) muestran la disminución y el aumento de la v_{abs} y v_{emi} , corrimientos opuestos, con el aumento del parámetro β respectivamente. Tales correlaciones podrían indicar que la carga (+) localizada en el anillo piridino (E.F) está mejor solvatada que cuando se ubica en el nitrógeno de la amina terciaria (E.E) con el aumento del parámetro β .

Es preciso aclarar que nunca se logró obtener una correlación conjuntamente con los parámetros β y π^* . Pero si se logró correlacionar estos parámetros por separado. Notar que la dependencia obtenida con β en el E.E es menor que la obtenida en E.F. Es decir, la carga de la molécula esta distribuida de forma diferente en el E.F y en el E.E. Esto último sería también la razón porque la v_{abs} y v_{emi} no correlacionan conjuntamente

con los parámetros π^* y β , ya que al parecer la molécula podría comportarse como una molécula diferente en el E.E y en el E.F, es decir como dos moléculas que tienen diferentes capacidades de sensar entornos ricos en electrones.

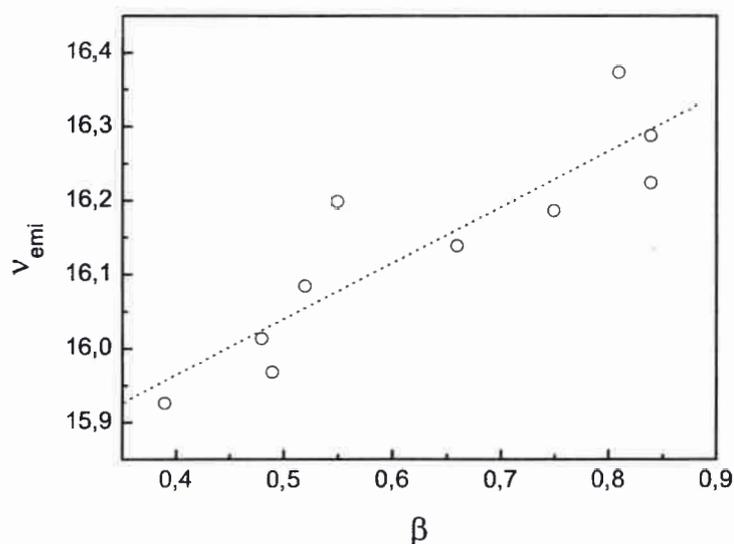


Figura 38. Regresión lineal de las bandas de emisión de DIA con el parámetro β . [DIA] = 1×10^{-6} M.

Los corrimientos de Stokes de esta molécula también fueron correlacionados con el parámetro β , tal cual lo muestra la ecuación (66). Como era de esperarse, los mismos parecen ser sensibles a la capacidad de los solventes a dar electrones.

$$v_{\text{Stokes}} = 5,31 - (1,88 \pm 0,19) \beta \quad (66)$$

$$n = 10 \quad r = 0,98$$

En la Figura 39 se muestra la regresión lineal del corrimiento de Stokes con el parámetro β .

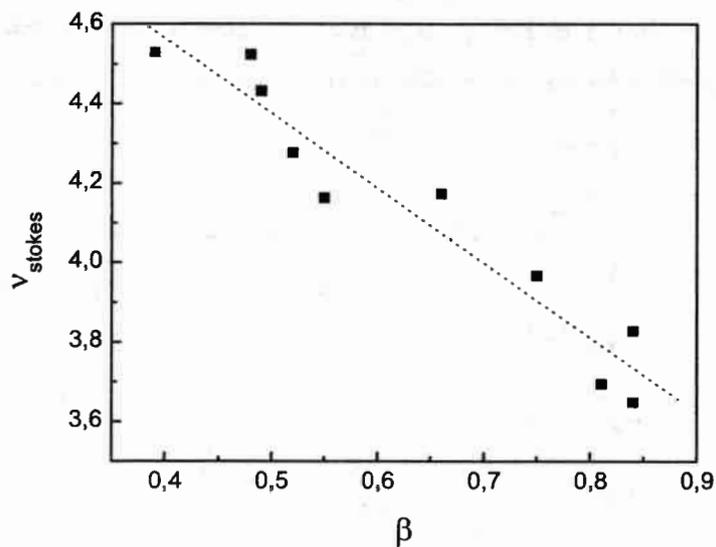


Figura 39. Regresión lineal de los corrimientos de Stokes de DIA con el parámetro β de los solventes empleados. $[DIA] = 1 \times 10^{-6} M$.

En la Figura 40 se observa los corrimientos en la frecuencia (ν_{00}) con el aumento del parámetro β .

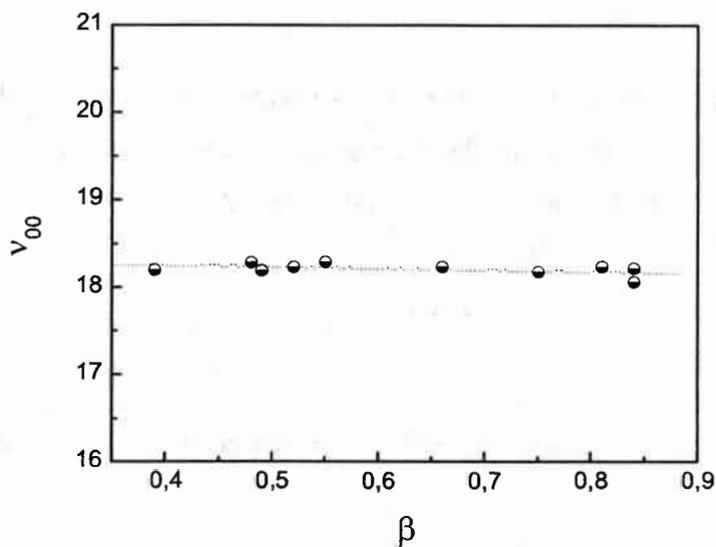


Figura 40. Corrimientos de la ν_{00} en solventes con diferentes β . $[DIA] = 1 \times 10^{-6} M$.

Por otro lado, es conocido que algunas hemicianinas se agregan¹⁶¹ en medio homogéneo, Stathatos y Lianos¹⁶² realizaron diferentes estudios concluyendo que en aquellos solventes donde se encuentra diferencia significativa en el ancho de media banda (HW) existe la posibilidad de que la hemicianina este agregada.

Se investigó la posibilidad de formación de agregados en medio homogéneo estudiando el ancho de media banda de absorción y emisión, y se representaran en las Figura 41 y Figura 42, respectivamente.

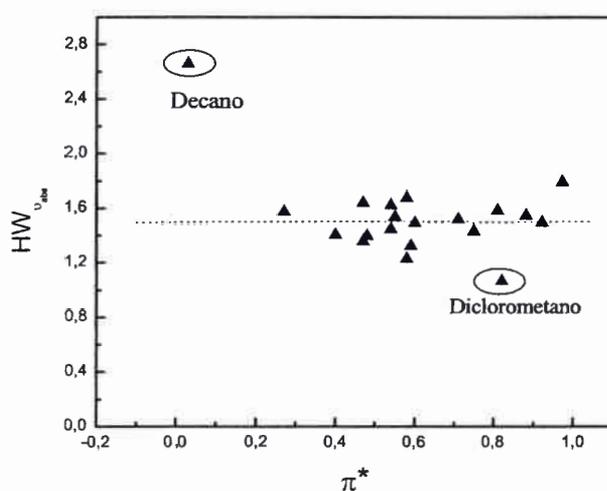


Figura 41. Ancho de media banda (HW) de los espectros de absorción en distintos solventes de polaridad/polarizabilidad diferente. [DIA] = 5×10^{-6} M.

Los valores obtenidos del ancho de media banda en los solventes que poseen β bajo tales como: tolueno, xileno, benceno, heptano decano, dicloroetano y diclorometano, son diferentes a los obtenidos en solventes que poseen β mas alto. Por eso se cree que existe la posibilidad de que en tales solventes DIA, a la concentración de trabajo 5×10^{-6} M, se encuentra agregada debido a su naturaleza anfifilica. Es por eso que todas las medidas realizadas anteriormente fueron a una concentración de 1×10^{-6} M, para disminuir la posibilidad de encontrar agregada a la molécula de DIA. Notar que, justamente donde el ancho de media banda se ensancha corresponde a aquellos solventes con bajo valores en el parámetro β (Tabla 8).

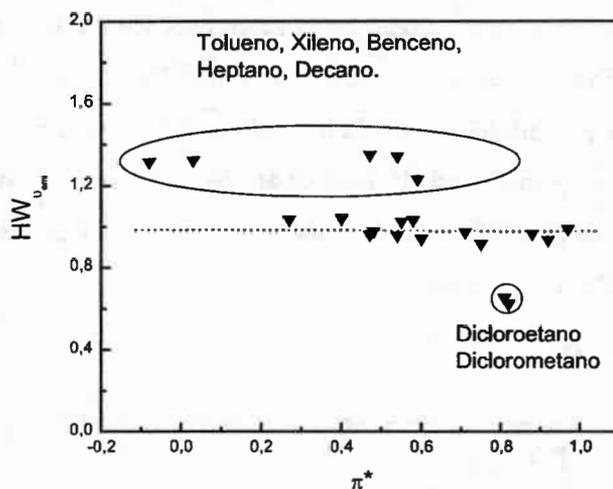


Figura 42. Ancho de media banda de los espectros de emisión en distintos solventes de polaridad/polarizabilidad diferente. $[DIA] = 5 \times 10^{-6}$ M.

Se concluye que la solvatación de la carga (+) con los solventes capaces de donar electrones (β grandes) permite la desagregación de esta molécula y en aquellos solventes que no poseen dicha capacidad (β pequeños o nulo) esta es más propensa a la agregación. Se cree que los resultados hallados podrían ser muy esclarecedores en el momento de estudiar las diferentes interfaces de los sistemas organizados debido a que nunca los datos fueron interpretados teniendo en cuenta la capacidad de sensar entornos dadores de electrones (parámetro β) que posee esta hemicianina.

3. C-3. DIA en benceno

Para profundizar el estudio de esta hemicianina se procedió a investigar su comportamiento en benceno. La importancia del mismo se debe a que este solvente será empleado en la formación de micelas inversas de AOT.

La Figura 44 y Figura 45 muestra respectivamente el espectro de absorción y de emisión característico de la molécula DIA en benceno. Los espectros fueron tomados a una concentración de 1×10^{-6} M. Es preciso notar que el parámetro β para benceno es muy bajo¹⁶³ y por lo tanto DIA esta propensa a formar agregado tal como se discutió en la sección anterior.

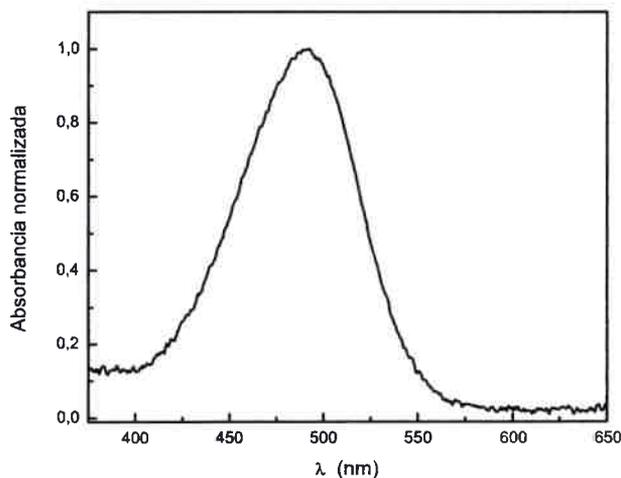


Figura 43. Espectro de absorción normalizado de DIA en benceno. $[DIA] = 1 \times 10^{-6} M$.

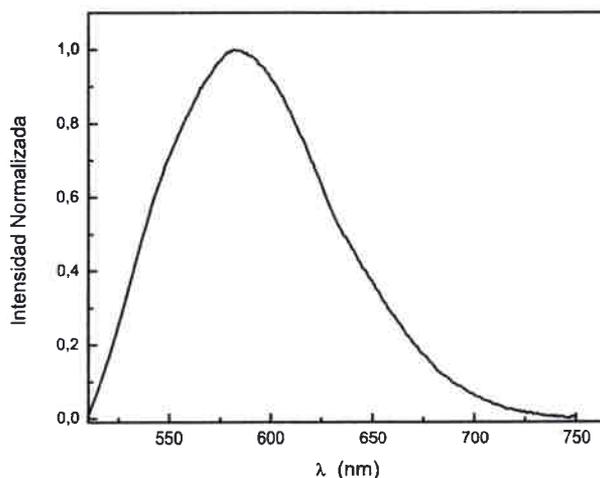


Figura 44. Espectro de emisión normalizado de DIA en benceno. $[DIA] = 1 \times 10^{-6} M$.

De la Figura 44 y Figura 45, se observa que ambos espectros presentan una banda principal en el visible. El máximo de absorción está centrado a 490 nm mientras que el de emisión está a 580 nm y es independiente de la longitud de onda de excitación. Estos indicios parecen indicar que solo una especie está presente en benceno cuando se trabaja a una concentración de $1 \times 10^{-6} M$.

Para profundizar el estudio en benceno se determinó el tiempo de vida de DIA usando SPC. La longitud de onda de excitación fue 450 nm, y se observó la emisión de dos longitudes de ondas diferentes, $\lambda_{em} = 590$ y 650 nm. Se encontró un decaimiento monoexponencial e independiente de la λ_{em} . El valor encontrado es de $\tau = 0,40 \text{ ns} \pm 0,05$, $\chi^2 = 1,46$. Estos resultados confirman que solo una especie está presente en benceno a una concentración de $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ y que la misma emite de un estado excitado totalmente relajado. Debido a la baja solubilidad que esta molécula presenta en benceno no fue posible explorar los tiempos de vida a mayor concentración.

3. D-1. HC

Para ahondar la potencial propiedad que poseen estas hemicianinas, se creyó oportuno profundizar el estudio con otra molécula de la familia de las hemicianina, ioduro de trans-4-[4-(dimetilamino)-estiril]-1-metilpiridinio (HC).

El método de KamLet y Taft,¹¹²⁻¹¹⁴ tal como se explicó anteriormente se empleó para poder correlacionar las bandas de absorción y emisión de la molécula HC. En la Figura 45 y Figura 46 se muestra los espectros característicos de absorción y emisión de la sonda HC en diferentes solventes. En tanto que, la Tabla 9 se presenta los valores de ν_{abs} , ν_{emi} , ν_{Stokes} y ν_{00} en diferentes solventes. Los máximos de absorción y emisión fueron extraídos de la tesis doctoral de R. Dario Falcone.¹⁶⁴

En la Figura 47 se muestran los corrimientos en las frecuencias de absorción (ν_{abs}), emisión (ν_{emi}) y banda cero – cero (ν_{00}) con el aumento del parámetro π^* . Se observa que la ν_{abs} y ν_{emi} aumentan y disminuyen respectivamente al aumentar la polaridad del medio, mientras que la ν_{00} permanece constante. Al igual que los estudios realizados con la hemicianina DIA; es posible pensar que la molécula HC, al no variar la ν_{00} con el aumento de la polaridad, tanto el E.F como el E.E tienen polaridades semejantes.

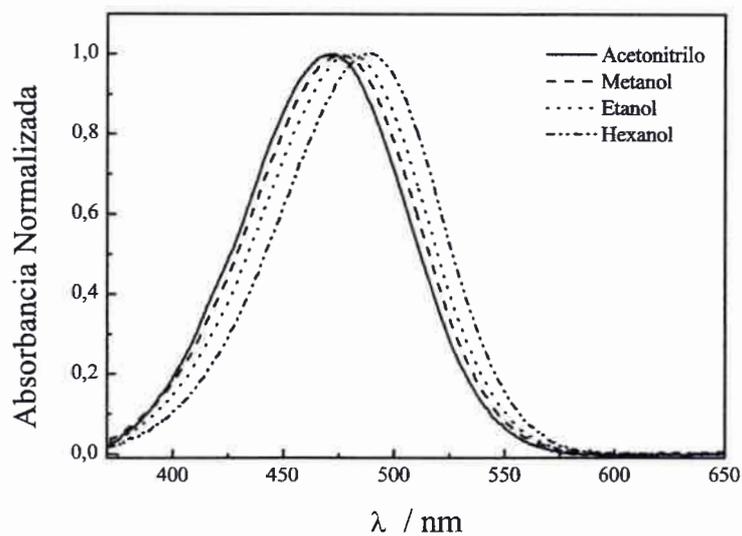


Figura 45. Espectros de absorción de HC en diferentes solventes. $[HC] = 1 \times 10^{-5} M$.

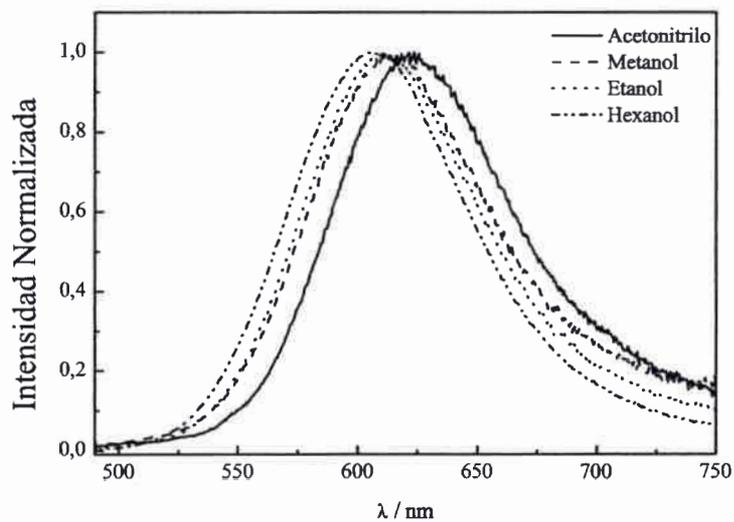


Figura 46. Espectros de emisión de HC en diferentes solventes. $[HC] = 1 \times 10^{-5} M$.

Tabla 9. Frecuencia de absorción (ν_{abs}), emisión (ν_{emi}), corrimiento de stokes (ν_{Stokes}) y banda 00 (ν_{00}) x (10^{-3} cm^{-1}) en diferentes solventes. $[\text{HC}] = 1 \times 10^{-5} \text{ M}$.

Número	Solventes	ν_{abs} (cm^{-1})	ν_{emi} (cm^{-1})	ν_{Stokes} (cm^{-1})	ν_{00} (cm^{-1})	π^*	β
1	1-Hexanol	20,49	16,35	4,14	18,42	0,40	0,84
2	1-Octanol	20,70	16,47	4,23	18,59	0,40	0,81
3	Ciclohexanol	20,41	16,35	4,06	18,38	0,45	0,84
4	Butanol	20,53	16,30	4,23	18,41	0,47	0,84
5	2-Propanol	20,75	16,34	4,41	18,55	0,48	0,84
6	1-Propanol	20,66	16,29	4,37	18,48	0,52	0,90
7	Etanol	20,83	16,25	4,58	18,54	0,54	0,75
8	THF	21,10	16,27	4,83	18,68	0,58	0,59
9	Metanol	21,01	16,16	4,85	18,59	0,60	0,66
10	Glicerol	20,75	16,14	4,61	18,45	0,62	0,51
11	Acetona	21,14	15,95	5,19	18,55	0,71	0,49
12	ACN	21,23	15,91	5,32	18,57	0,75	0,40
13	EG	20,96	16,05	4,91	18,50	0,92	0,52
14	PG	20,83	16,22	4,61	18,53	0,92	0,52
15	FA	20,92	15,95	4,97	18,43	0,97	0,48
16	Agua	22,22	15,95	6,27	19,09	1,09	0,47
17	Benceno	21,45	17,10	4,35	19,27	0,55	0,10
18	Tolueno	21,40	17,57	3,83	19,48	0,49	0,11
19	Xileno	21,15	17,30	3,85	19,22	0,45	0,12

De manera similar al estudio realizado con la molécula DIA, se procedió a investigar si HC debido a que posee una carga (+) puede sufrir algún tipo de interacción específica, posibilidad que no había sido explorada hasta el momento. Para ello se

procedió a investigar el efecto dador de electrones del medio (parámetro β) sobre su solvatocromismo.

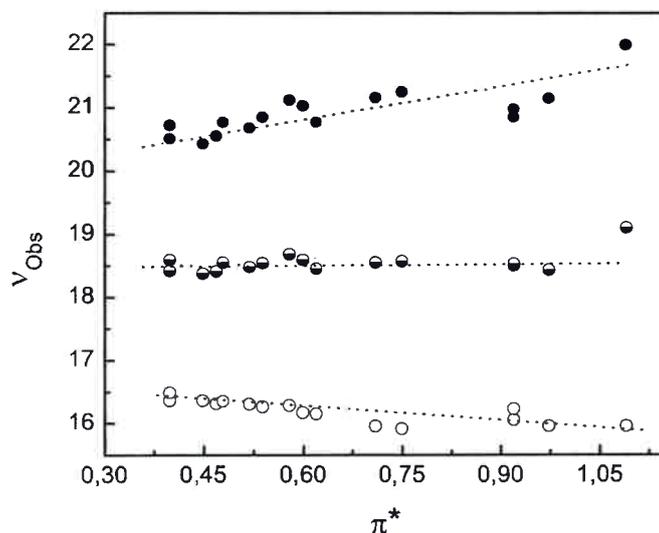
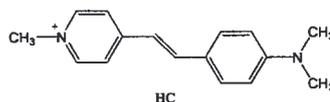


Figura 47. Corrimientos de la ν_{abs} (●), ν_{emis} (○) y ν_{00} (◐) en solventes de diferentes polaridad. $[\text{HC}] = 1 \times 10^{-5} \text{ M}$.

En las ecuaciones (67) y (68) se muestra la correlación de la frecuencia de absorción y emisión con el parámetro β .

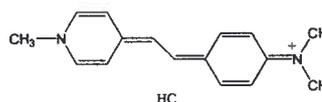
$$\nu_{\text{abs}} = 21,87 - (1,37 \pm 0,09) \beta$$

$n = 16 \quad r = 0,90$



$$\nu_{\text{emis}} = 15,61 + (0,88 \pm 0,12) \beta$$

$n = 16 \quad r = 0,92$



donde n es el número de solventes utilizados y r es el coeficiente de regresión lineal.

Cabe aclarar que tal regresión solo se realizó para 16 solventes de los 19 mostrados en la Tabla 9, los solventes 17-19 fueron excluidos de tal correlación por razones que se explicarán más adelante. Tales ecuaciones, muestran que la molécula HC es sensible al parámetro β , indicando la habilidad de la molécula a aceptar electrones.

En la Figura 48 y Figura 49 se muestran la regresión lineal de absorción y emisión con el parámetro β , respectivamente.

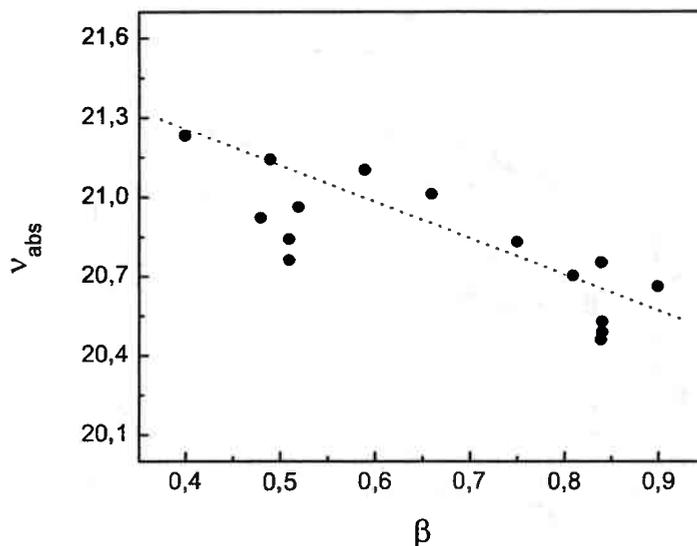


Figura 48. Regresión lineal de la frecuencia de absorción de HC con el parámetro β .

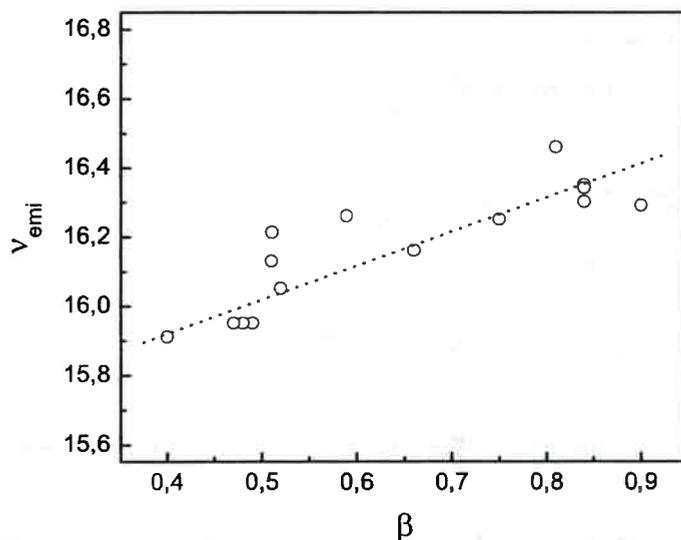


Figura 49. Regresión lineal de la frecuencia de emisión de HC con el parámetro β . $[HC] = 1 \times 10^{-3} M$.

Los corrimientos de Stokes de esta molécula también fueron correlacionados con el parámetro β , como se muestra la ecuación (69). Dicha correlación, como era de esperarse, es sensible a la capacidad de los solventes a dar electrones. En la Figura 50 se observa a los corrimientos de Stokes (ν_{Stokes}) con el aumento del parámetro β .

$$\nu_{\text{Stokes}} = 5,92 - (1,95 \pm 0,30) \beta \quad (69)$$

$$n = 16 \quad r = 0,91$$

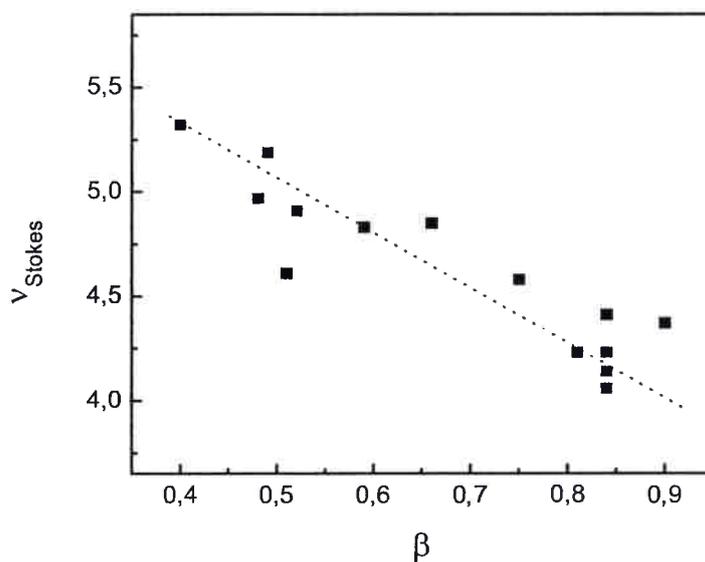


Figura 50. Correlación de los corrimientos de Stokes de HC con el parámetro β de los solventes empleados. $[\text{HC}] = 1 \times 10^{-5} \text{ M}$.

En la Figura 51 se muestra la correlación de la ν_{00} en función del parámetro β . Se observó que, al igual que con π^* , la misma se mantiene constante con el aumento en β .

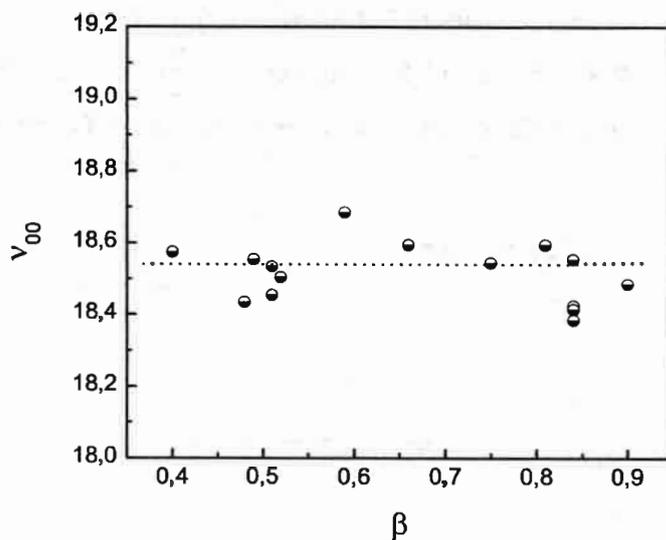


Figura 51. Corrimientos de la v_{00} en solventes con diferentes β . $[HC] = 1 \times 10^{-6}$ M.

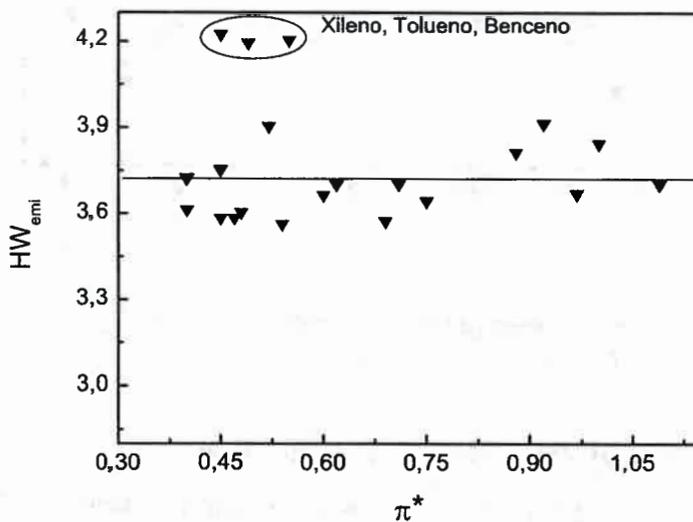


Figura 52. Ancho de media banda de los espectros de emisión en distintos solventes de polaridad/polarizabilidad diferente. $[HC] = 1 \times 10^{-5}$ M.

Se observa que, para los solventes: tolueno, xileno y benceno, los anchos de media banda son mayores que en los demás solventes. Esto hace que estos sean excluidos de las correlaciones en la ecuaciones (67), (68) y (69), y existe la posibilidad

de que en tales solventes, HC se encuentre agregada. Notar que, justamente donde el ancho de media banda se ensancha (Figura 52) corresponde a aquellos solventes con valores prácticamente nulos en el parámetro β . Al igual que para DIA, solventes de poca capacidad de donar electrones desfavorecen la solvatación de la carga (+) y esto favorece que la molécula se encuentre agregada.

En la Tabla 10 se puede ver a modo de resumen las correlaciones de las diferentes moléculas, DIA y HC por absorción y emisión. Notar que los coeficientes (b) para las diferentes hemicianinas informadas son ligeramente diferentes.

Como era de esperarse la longitud de la cadena alquílica, al igual que su carga positiva, también juega un papel importante en la agregación de las hemicianinas.

Tabla 10. Resumen de las correlaciones de las frecuencias máximas de absorción, emisión y corrimiento de stokes en (10^3 cm^{-1}) para HC y DIA.

Absorción	ν_0	b	Coef. de corr.	n	SD
HC	$21,87 \pm 0,06$	$-1,37 \pm 0,09$	0,90	16	0,15
DIA	$20,97 \pm 0,08$	$-1,12 \pm 0,13$	0,96	10	0,17
Emisión					
HC	$15,61 \pm 0,06$	$0,88 \pm 0,12$	0,92	16	0,12
DIA	$15,66 \pm 0,06$	$0,75 \pm 0,13$	0,94	10	0,11
Corrimiento de Stokes					
HC	$5,92 \pm 0,09$	$-1,95 \pm 0,30$	0,91	16	0,12
DIA	$5,31 \pm 0,09$	$-1,88 \pm 0,19$	0,98	10	0,12

Notar que la susceptibilidad al parámetro β es ligeramente mayor en HC que en DIA, es decir la longitud de la cadena alquílica podría producir algún tipo de efecto estérico mediante el cual se ve mas dificultada la interaccion de la carga (+) con la capacidad de donar electrones de los solventes.

3. D-2. Estudio de HC en benceno

Del estudio realizado en medio homogéneo se concluyó que existía la posibilidad de que la molécula HC estuviera agregada en solventes de bajos β tales como: xileno, tolueno y benceno, debido a que el ancho de media banda de los espectros de absorción y emisión aumentan en comparación con otros solventes empleados. Como benceno es el solvente empleado para la formación de micelas inversas de AOT, se investigó el comportamiento de HC en dicho solvente.

La Figura 53 muestra el espectro de absorción característico de la molécula HC en benceno a una concentración de 2×10^{-5} M. De la misma, se observa la aparición de un hombro centrado a 590 nm (al rojo de la banda principal). Este hombro no fue observado a concentraciones inferiores de HC ($[HC] < 1 \times 10^{-5}$ M). Esta nueva banda podría ser otro indicativo de la posible agregación de molécula HC en benceno.

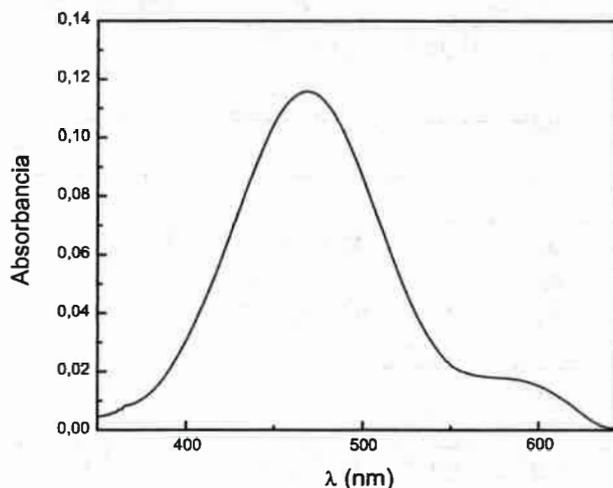


Figura 53. Espectros de absorción de HC en benceno. $[HC] = 2 \times 10^{-5}$ M.

La Figura 54 muestra la variación de absorbancia en función de la concentración de HC a $\lambda = 471$ nm.

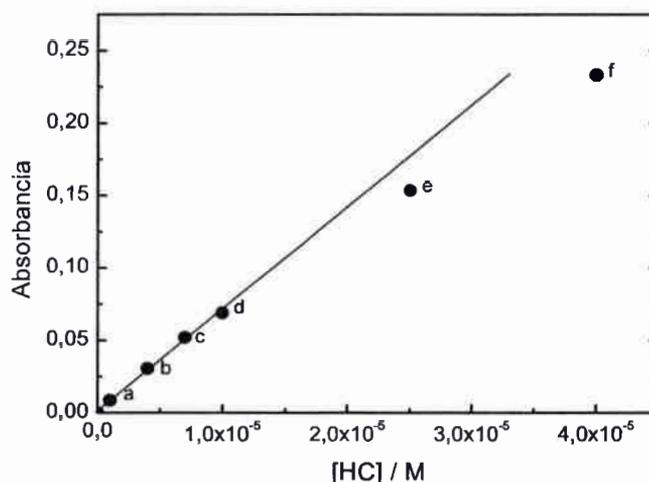


Figura 54. Variación de absorción de HC en benceno. [HC]: a) 1×10^{-6} M, b) 4×10^{-6} M, c) 7×10^{-6} M, d) 1×10^{-5} M, e) $2,5 \times 10^{-5}$ M, f) 4×10^{-5} M. $\lambda = 471$ nm.

Se observa que hay una respuesta lineal para $[HC] < 1 \times 10^{-5}$ M, en tanto que para $[HC] > 1 \times 10^{-5}$ M, hay una desviación de la linealidad. Es decir, la molécula no cumple la ley de Lambert y Beer a concentraciones mayores de 1×10^{-5} M.

Tanto los estudios de los anchos de media banda de absorción y emisión, la aparición de una nueva banda en los espectros de absorción y la no linealidad de HC al variar la concentración en benceno, indican que a $[HC] > 1 \times 10^{-5}$ M la molécula se encuentra agregada. Para caracterizar dicho agregado se realizaron experiencias de SPC.

Se estudiaron los tiempos de vida a dos concentraciones diferentes de la molécula HC en benceno: una concentración inferior a 1×10^{-5} M en donde se asegura la existencia del monómero de HC y una concentración superior en donde se pone de manifiesto el agregado. En la Tabla 11 se muestran los tiempos de vida obtenidos a dos concentraciones diferentes de HC.

A $[HC] = 3 \times 10^{-6}$ M, se observa que la molécula presenta un decaimiento de fluorescencia monoexponencial e independiente de la λ_{emi} . Tal independencia demuestra que la molécula emite desde un estado excitado totalmente relajado, es decir sensa un microentorno no viscoso. El tiempo de vida de fluorescencia encontrado es de $\tau = 0,20$ ns y se le asigna al monómero de HC.

Tabla 11. Tiempos de vida de HC a diferentes concentraciones en benceno. $\lambda_{exc} = 450$ nm.

$[HC] = 3 \times 10^{-6} \text{ M}$		$[HC] = 2 \times 10^{-5} \text{ M}$	
$\lambda_{emi} = 585 \text{ nm}$	$\lambda_{emi} = 650 \text{ nm}$	$\lambda_{emi} = 590 \text{ nm}$	$\lambda_{emi} = 680 \text{ nm}$
$\tau = 0,19 \text{ ns} \pm 0,02$	$\tau = 0,20 \text{ ns} \pm 0,04$	$\tau_1 = 0,22 \text{ ns} \pm 0,04$	$\tau_1 = 0,20 \text{ ns} \pm 0,03$
$\chi^2 = 1,37$	$\chi^2 = 1,26$	$\tau_2 = 1,17 \text{ ns} \pm 0,02$	$\tau_2 = 1,20 \text{ ns} \pm 0,05$
		$\chi^2 = 1,32$	$\chi^2 = 1,11$

χ^2 : es la suma de las desviaciones standares.

En tanto que, cuando se trabaja a $[HC] = 2 \times 10^{-5} \text{ M}$, la molécula presenta un decaimiento de fluorescencia biexponencial e independiente de la λ_{emi} . Que el decaimiento sea biexponencial (dos tiempos de vida diferente) estaría indicando la presencia de dos especies diferentes. Se observa que una de las especies posee un tiempo de vida de $\tau_1 \approx 0,20 \text{ ns}$ el cual es comparable con el tiempo de vida que le fue asignado al monómero; en tanto que la aparición de un tiempo de vida mayor ($\tau_2 = 1,22 \text{ ns}$) se lo asignaría a la especie agregada de HC en benceno. La independencia con la λ_{emi} indica que ambas especies presentes, monómero y agregado, emiten desde estados excitados totalmente relajados.

4

Estudio en Micelas DIA y HC PRODAN

4. A-1. DIA

a) *DIA en micelas inversas de benceno/AOT. $W = 0$.*

Se realizaron estudios espectroscópicos variando la concentración de AOT a $W = 0$ y a una concentración fija de la molécula prueba. Cabe aclarar que debido a problemas de solubilidad de DIA en benceno, se decidió comenzar a trabajar a partir de la menor concentración de surfactante donde la solubilidad de la molécula es total. La mínima concentración de AOT para comenzar a trabajar es de 1×10^{-3} M.

En la Figura 55 y Figura 56 se muestran los espectros de absorción y emisión de la molécula DIA, respectivamente. Mientras que, la Figura 57 se muestra los corrimientos máximos de absorción y emisión al variar la [AOT].

Se observa que tanto por absorción como por emisión existe un corrimiento hipsocrómico al incrementar la [AOT]. Del estudio en medio homogéneo se conoce que las bandas de absorción sufren un corrimiento hipsocrómico cuando π^* aumenta y cuando β disminuye mientras que, las bandas de emisión sufren un corrimiento al azul con una disminución de la polaridad y un aumento en β (Tabla 10). Además, las

hemicianinas, sufren corrimientos opuestos en las bandas de absorción y emisión cuando la molécula se encuentra en solventes donde la relajación es completa.

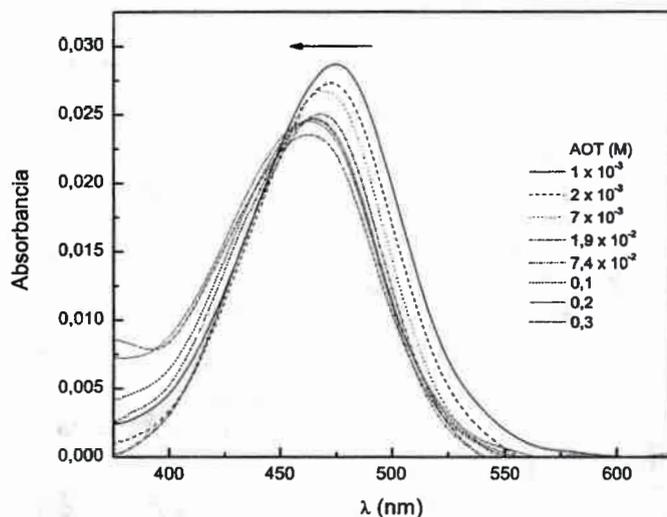


Figura 55. Espectros de absorción de DIA en micelas inversas de benceno/AOT. $W = 0$. [DIA] 1×10^{-6} M.

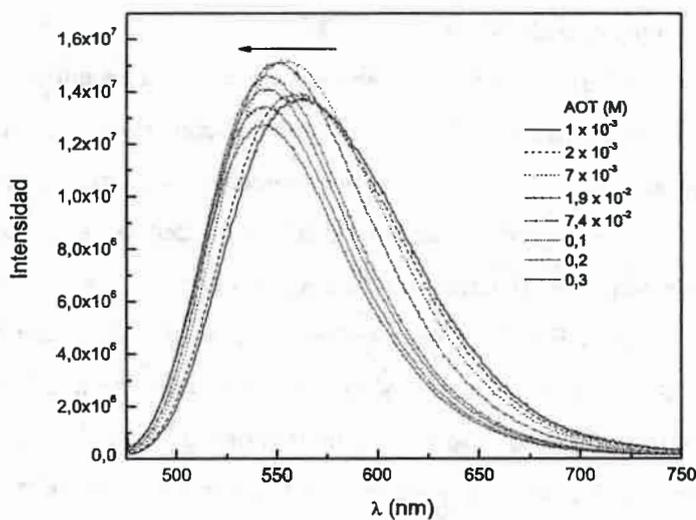


Figura 56. Espectros de emisión de DIA en micelas inversas de benceno/AOT. $W = 0$. [DIA] 1×10^{-6} M.

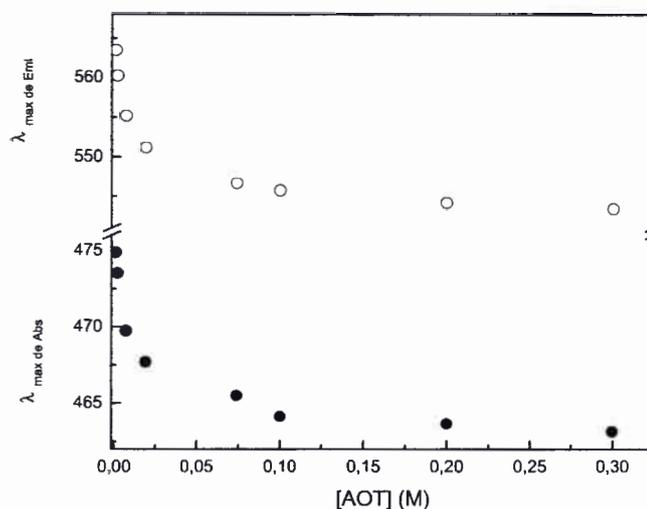


Figura 57. Corrimientos máximos de absorción (●) y de emisión (○) de DIA en micelas inversas de benceno/AOT. $W = 0$. $[\text{DIA}] 1 \times 10^{-6} \text{ M}$.

Los resultados obtenidos al variar la $[\text{AOT}]$ son por lo tanto anómalos ya que ambas bandas se corren hipsocromicamente con el aumento en la $[\text{AOT}]$. Es conocido que la polaridad de los sistemas benceno/AOT aumenta con el aumento de la $[\text{AOT}]$ hasta que la micela está formada.⁴⁴ De esta manera, los resultados muestran que debe haber algún efecto diferente y no solo el efecto de polaridad. Una posible explicación puede ser que en el estado fundamental, la carga (+) ubicada en el N piridinio puede estar interactuando electrostáticamente con la carga (-) del grupo SO_3^- del AOT. Por otro lado, al excitar la molécula la carga (+) pasa al N de la anilina (Figura 34), la misma se encontraría en la parte menos polar de la molécula de AOT, posiblemente cerca del carbonilo del grupo éster de este, sensando menos polaridad y un mayor β . Es decir, un corrimiento hipsocromico en los espectros de emisión indicarían que la molécula está sensando un entorno con mayor capacidad de dar electrones.

En la Figura 58 se muestra la variación de ν_{00} en función de la concentración de AOT para $W = 0$. Este claro corrimiento de la ν_{00} hacia el azul, no puede ser asignado a los cambios en la polaridad o a la capacidad de donar electrones del medio debido a que ν_{00} para DIA, es independiente a los parámetros π^* y β .

El incremento ν_{00} con la concentración de AOT, se puede asignar a la posible interacción de carga (+) de la molécula DIA con el grupo SO_3^- del AOT. Asimismo, se observa que a $[\text{AOT}] > 7,4 \times 10^{-2} \text{ M}$ el valor es prácticamente constante e igual a 20000 cm^{-1} ; en comparación con el valor obtenido en medio homogéneo (18400 cm^{-1} aproximadamente).

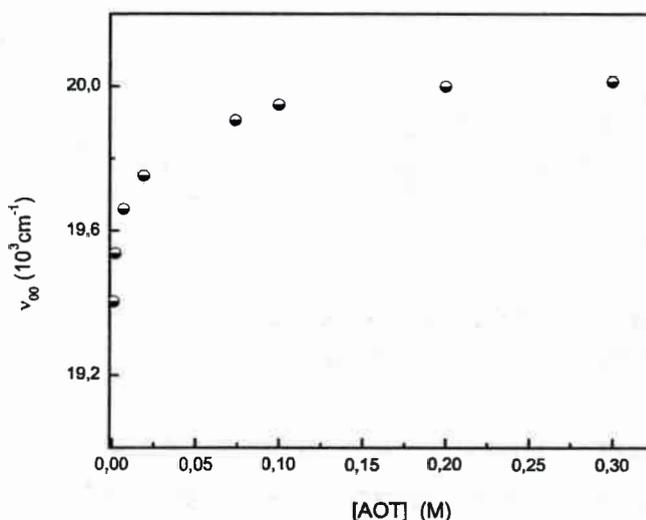


Figura 58. Banda 00 (ν_{00}) en micelas inversas de Benceno/AOT. $W = 0$ (●). $[\text{DIA}] 1 \times 10^{-6} \text{ M}$.

Este valor encontrado a $W = 0$ de 20000 cm^{-1} indicaría que DIA, incorporado en la interfaz micelar sensa un entorno poco fluido y además estaría interactuando electrostáticamente a través de su carga (+) con el grupo SO_3^- del AOT.

b) Estudio del corrimiento del máximo de emisión de DIA al cambiar la longitud de onda de excitación (REES).

En la Figura 59 se muestra el REES de la molécula DIA en función de la concentración de AOT a $W = 0$. Se observa un marcado incremento del REES ($\Delta \lambda_{\text{emi}}$ ($\lambda_{\text{emi}}(\text{exc } 520\text{nm}) - \lambda_{\text{emi}}(\text{exc } 470\text{nm})$)) al aumentar $[\text{AOT}]$. Un valor de 22 nm de REES no se podría solo explicar por la ubicación de la molécula en una zona poco viscosa de la micela.^{132,134} Se cree que este valor tan elevado, además de indicar la poca fluidez del entorno que sensa, manifiesta la interacción electrostática de la carga (+) de la molécula

con el grupo SO_3^- de AOT. Es decir, a concentraciones menores de DOPC el efecto es debido solo a la interacción electrostática de la molécula y el surfactante; mientras que a concentraciones mayores de DOPC, HC sensa dos efectos conjuntos. El efecto electrostático y el efecto debido a la localización de la molécula en un medio restringido de movimiento (interfaz micelar).

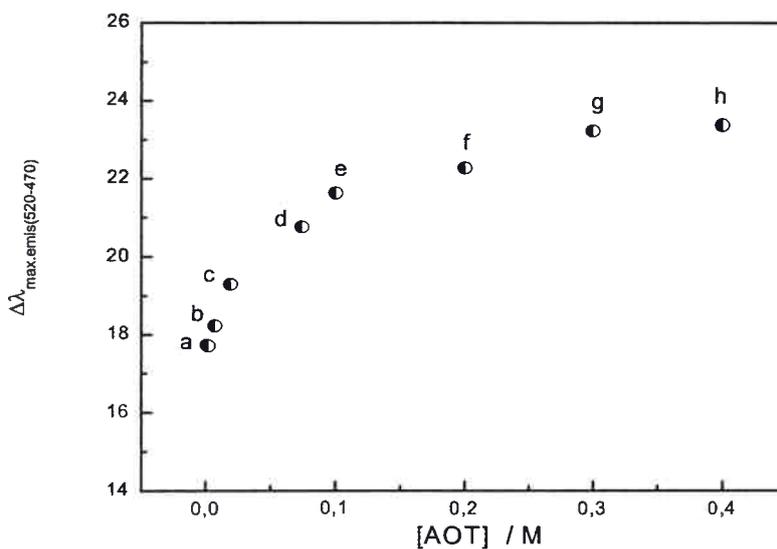


Figura 59. REES ($\lambda_{\text{max. emi}}$ a λ_{exc} 520 nm - $\lambda_{\text{max. emi}}$ a λ_{exc} 470 nm) de DIA variando la concentración de AOT. [DIA] = 1×10^{-6} M. $W = 0$ (●). AOT (a) 1×10^{-3} M, (b) 2×10^{-3} M, (c) 7×10^{-3} M, (d) $1,9 \times 10^{-2}$ M, (e) $7,4 \times 10^{-2}$ M, (f) 0,1 M, (g) 0,2 M, (h) 0,3 M.

c) Estudio del tiempo de vida de fluorescencia de DIA en micelas inversas de benceno/AOT. $W = 0$.

Anteriormente (Cap. 3.C-3), se determinó el tiempo de vida de fluorescencia de DIA a una concentración de 1×10^{-6} M en benceno. El mismo, es monoexponencial e independiente de la longitud de onda de emisión y su valor es de 0,4 ns. En la Tabla 12 se muestran los tiempos de vida de DIA en micelas inversas de AOT a $W = 0$ a los efectos de compararlos con el valor obtenido en el solvente orgánico.

Se observa, que el decaimiento para dos concentraciones diferentes de micelas de AOT es biexponencial. Por otro lado, es preciso hacer notar que el tiempo de vida es

dependiente de la longitud de onda de emisión, cosa que no sucede en medio homogéneo. Resultados similares fueron encontrados para otras moléculas prueba por Chatopadaya¹³⁵⁻¹³⁷ en donde el incremento en los tiempos de vida con el aumento en la longitud de onda de emisión fue asignado a la presencia de la molécula en diferentes microentornos. Lo mismo puede pensarse que ocurre con DIA que supone emisiones desde dos microentornos diferentes. Así, se puede asignar el valor correspondiente al tiempo de vida mayor ($\tau \approx 1,1$ ns) a la especie que esta interaccionando con las cabezas polares de AOT, entorno rígido; en tanto que el tiempo de vida menor ($\tau \approx 0,7$ ns) se lo asigna a la especie que se aleja de las cabezas polares de AOT, un entorno menos rígido (pero que no es el benceno), posiblemente en inmediaciones del grupo carbonilo.

Tabla 12. Tiempos de vida de DIA en micelas inversas de Benceno/AOT. $W = 0$. $[DIA] 1 \times 10^{-6}$ M. $\lambda_{exc} = 450$ nm. χ^2 : es la suma de las desviaciones standares.

[AOT] = 5×10^{-3} M W = 0	
$\lambda_{emi} = 556$ nm	$\lambda_{emi} = 630$ nm
$\tau_1 = 0,60$ ns	$\tau_1 = 0,75$ ns
$\tau_2 = 1,20$ ns	$\tau_2 = 1,81$ ns
$\chi^2 = 1,17$	$\chi^2 = 1,14$
[AOT] = 0,2 M W = 0	
$\lambda_{emi} = 543$ nm	$\lambda_{emi} = 605$ nm
$\tau_1 = 0,63$ ns	$\tau_1 = 0,82$ ns
$\tau_2 = 1,5$ ns	$\tau_2 = 1,85$ ns
$\chi^2 = 1,09$	$\chi^2 = 1,53$

Se procedió a investigar cual es el efecto de agregar agua en micelas inversas de AOT usando como molécula prueba DIA; para ello se trabajo a $W = 5$ y $W = 10$. A los dos W de trabajo se encontró resultados similares, es por ello que solo se informa los datos obtenidos cuando se trabajó a $W = 10$.

d) DIA en micelas inversas de benceno/AOT/agua. W = 10

De forma similar al estudio realizado en micelas inversas de benceno/AOT/agua a $W = 0$; se realizaron los estudios espectroscópicos de absorción y emisión a una dada concentración de molécula prueba a $W = 10$. En la Figura 60 y Figura 61 se muestran

los espectros de absorción y emisión respectivamente variando la concentración de AOT. Mientras que, la Figura 62 se muestran los corrimientos máximos de absorción y emisión en las mismas experiencias.

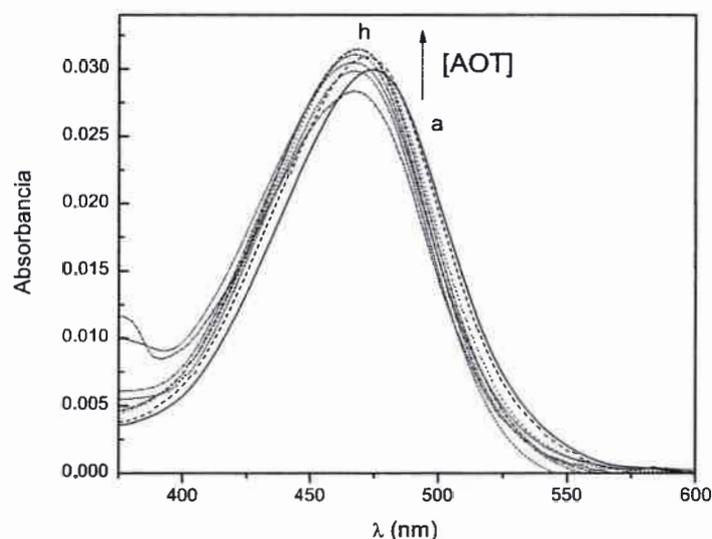


Figura 60. Espectros de absorción de DIA en micelas inversas de benceno/AOT/agua. $W = 10$. $[DIA] 1 \times 10^{-6}$ M. AOT (a) 1×10^{-3} M, (b) 2×10^{-3} M, (c) 7×10^{-3} M, (d) $1,9 \times 10^{-2}$ M, (e) $7,4 \times 10^{-2}$ M, (f) 0,1 M, (g) 0,2 M, (h) 0,3 M.

Comparando la Figura 55 y Figura 60 se observa que para la menor concentración de AOT a $W = 10$ ($[AOT] = 1 \times 10^{-3}$ M) el máximo de absorción está al azul ($\lambda_{\text{max}} = 467$ nm) respecto al observado en $W = 0$ ($\lambda_{\text{max}} = 474$ nm), sin embargo prácticamente no sufren corrimientos al aumentar $[AOT]$. Como es de esperar la presencia de agua juega un papel importante en lo referido a corrimientos solvatocromicos que se observan. Estos hechos se pueden explicar considerando la competencia del agua y DIA por interactuar con el grupo sulfonato del AOT. La hidratación de las cabezas polares de AOT origina un desplazamiento de la molécula DIA a un microentorno menos polar, alejando la molécula del corazón polar. A diferencia de lo observado a $W = 0$, los corrimientos de los espectros de emisión son batocromicos al incrementar $[AOT]$. De las correlaciones obtenidas en medio homogéneo (Tabla 10) un corrimiento batocromico indicaría que DIA sensa un entorno

con baja capacidad de dar electrones (β bajo) y mas polar, esto es corroborado con el agregado de agua que origina una competencia por solvatar los grupos SO_3^- entre el agua y DIA.

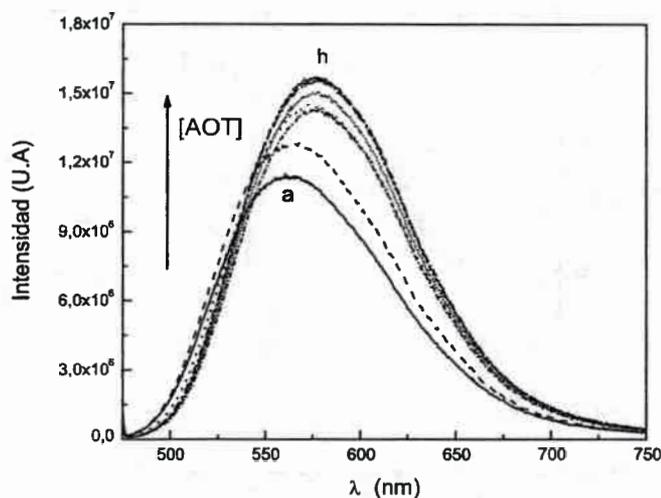


Figura 61. Espectros de emisión de DIA en micelas inversas AOT / Benceno / Agua. $W = 10$. $[\text{DIA}] 1 \times 10^{-6}$ M. AOT (a) 1×10^{-3} M, (b) 2×10^{-3} M, (c) 7×10^{-3} M, (d) $1,9 \times 10^{-2}$ M, (e) $7,4 \times 10^{-2}$ M, (f) 0,1 M, (g) 0,2 M, (h) 0,3 M.

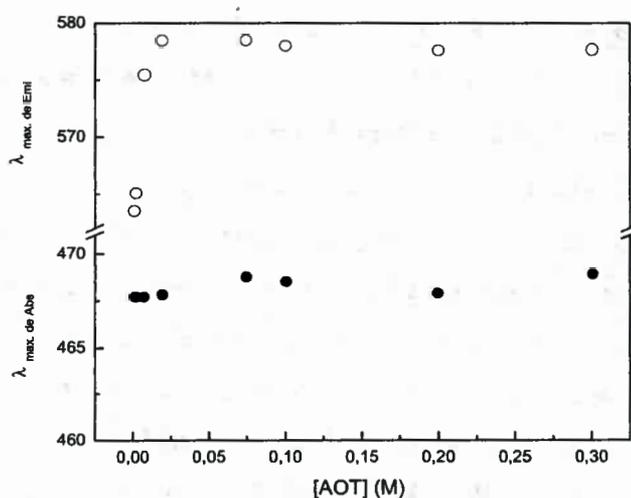


Figura 62. Corrimientos máximos de absorción (●) y de emisión (○) de DIA en micelas inversas de Benceno/AOT/agua. $W = 10$. $[\text{DIA}] 1 \times 10^{-6}$ M.

Tanto por emisión como por absorción, hay así evidencia que DIA en presencia de agua se aleja del corazón polar hacia la zona de baja capacidad de dar electrones (bajo β) posiblemente hacia las cadenas hidrocarbonadas del surfactante.

En la Figura 63 se muestra la variación de ν_{00} en función de la concentración de AOT para $W = 10$. Tal como se puede observar en la misma y a diferencia de lo observado a $W = 0$, la ν_{00} a $W = 10$ permanece constante en todo el rango de la $[AOT]$. El valor obtenido de la ν_{00} es 19400 cm^{-1} y en comparación con el valor obtenido en medio homogéneo (18400 cm^{-1}) posee un claro corrimiento hacia el azul, sin embargo si se lo compara con el valor obtenido a $W = 0$ (20000 cm^{-1}) muestra un claro corrimiento al rojo.

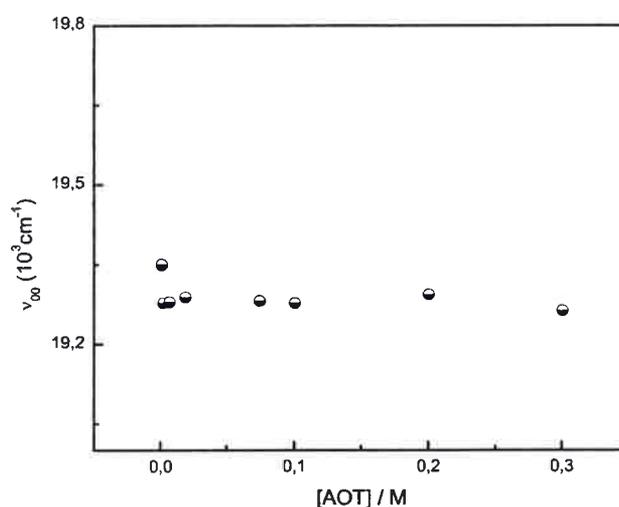


Figura 63. Banda 00 (ν_{00}) en micelas inversas de benceno/AOT/agua. $W = 10$ (\ominus). $[DIA] 1 \times 10^{-6} \text{ M}$.

Estos corrimiento de la ν_{00} , tal como se dijo anteriormente no puede ser asignado a los cambios en la polaridad o a la capacidad de donar electrones del medio debido a que DIA, es independiente a los parámetros π^* y β . Estos resultados distintos de lo que ocurre a $W = 0$ (ausencia de agua), a $W = 10$ muestran también que el agua solvata los grupos SO_3^- de AOT y desplaza a DIA alejándolo del corazón polar (menor interacción electrostática) y por lo tanto sensa un entorno menos rígido.

e) Estudio del corrimiento del máximo de emisión de DIA al cambiar la longitud de onda de excitación (REES). $W = 10$

La Figura 64 muestra el REES de la molécula DIA en función de la concentración de AOT a $W = 10$. Contrariamente a lo que ocurre a $W = 0$, el REES disminuye al incrementar la concentración de AOT.

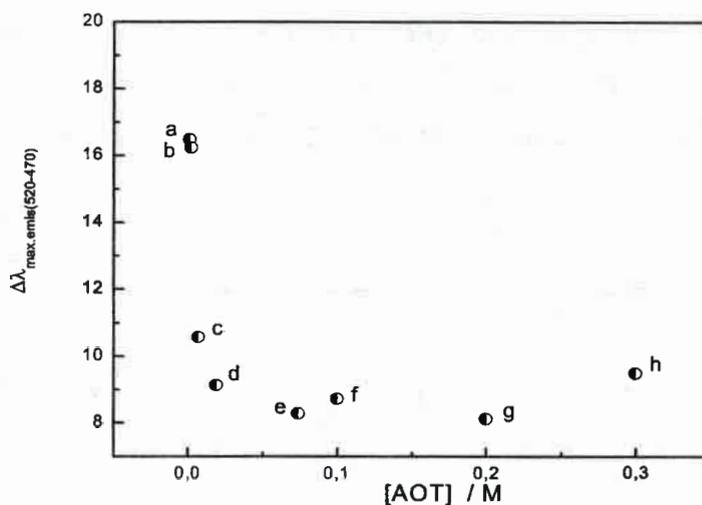


Figura 64. REES ($\lambda_{\text{max. emi}}$ a λ_{exc} 520 nm - $\lambda_{\text{max. emi}}$ a λ_{exc} 470 nm) de DIA variando la concentración de AOT. [DIA] = 1×10^{-6} M. $W = 10$ (●). AOT (a) 1×10^{-3} M, (b) 2×10^{-3} M, (c) 7×10^{-3} M, (d) $1,9 \times 10^{-2}$ M, (e) $7,4 \times 10^{-2}$ M, (f) 0,1 M, (g) 0,2 M, (h) 0,3 M.

La disminución abrupta del valor de REES (8 nm), confirma la ausencia de la interacción electrostática entre DIA y AOT. Además, los valores de REES sugieren que DIA está localizada en un entorno de movimiento restringido, posiblemente en la región exterior de la interfaz micelar, lejos del corazón polar de la micela. Es decir, DIA se ubicaría entre las colas de los surfactantes que forman las micelas inversas.

f) Estudio del tiempo de vida de fluorescencia de DIA en micelas inversas de Benceno/AOT/agua. $W = 10$.

En la Tabla 13 se muestran los tiempos de vida de DIA en benceno y a dos concentraciones diferentes de micelas inversas de AOT a $W = 10$. Se observa, que el decaimiento de la molécula es monoexponencial y dependiente de la longitud de onda

de emisión. Al igual que lo observado a $W = 0$, tal dependencia de la longitud de onda de emisión parece indicar que la especie emite desde un estado excitado no relajado totalmente.

Tabla 13. Tiempos de vida de DIA en benceno y en micelas inversas de benceno/AOT/agua a $W = 10$. $[DIA] 1 \times 10^{-6} M$, $\lambda_{exc} = 450 \text{ nm}$. χ^2 : es la suma de las desviaciones estándares.

[AOT] = $5 \times 10^{-3} M$ $W = 10$	
$\lambda_{emi} = 581 \text{ nm}$	$\lambda_{emi} = 655 \text{ nm}$
$\tau = 0,79 \text{ ns}$	$\tau = 0,95 \text{ ns}$
$\chi^2 = 1,57$	$\chi^2 = 1,44$
[AOT] = $0,2 M$ $W = 10$	
$\lambda_{emi} = 578 \text{ nm}$	$\lambda_{emi} = 653 \text{ nm}$
$\tau = 0,74 \text{ ns}$	$\tau = 1,08 \text{ ns}$
$\chi^2 = 1,23$	$\chi^2 = 1,68$

El valor obtenido del tiempo de vida ($\tau \approx 0,7 \text{ ns}$) es comparable con el tiempo de vida que se asignó a las especies localizada en un entorno más fluido a $W = 0$. Por ello, se lo asigna a la especie que se aleja de las cabezas polares de AOT, de manera tal que no sensa la fuerte interacción electrostática con los grupos sulfonatos de AOT y la molécula se encuentra en inmediaciones del grupo carbonilo.

4. B-1. HC

Habiendo caracterizado espectroscópicamente la hemicianina en medio homogéneo y benceno (Cap. 3. C-2 y C-3) se utilizó la molécula prueba para caracterizar la interfaz de las micelas inversas de AOT. Anteriormente (Cap. 3. C-3), se demostró que HC se agrega a concentraciones mayores de $1 \times 10^{-5} M$ en benceno. Para probar, el poder de desagregación de las micelas inversas de AOT se trabajó a una concentración de HC donde la misma está agregada. Para ello se varió la concentración del surfactante a una $[HC] = 2 \times 10^{-5} M$, para los diferentes sistemas micelares de benceno/AOT/agua ($W = 0$ y $W = 10$).

a) Variación de la concentración de AOT en micelas inversas de benceno/AOT.

$W = 0$.

Se realizaron estudios espectroscópicos variando la concentración de AOT a $W = 0$ y a una concentración fija de la molécula prueba. En la Figura 65 y Figura 66 se muestran los espectros de absorción y emisión a una $[HC] = 2 \times 10^{-5}$ M variando la concentración AOT, respectivamente. Mientras que, la Figura 67 se muestra los corrimientos máximos de absorción y emisión al variar la $[AOT]$.

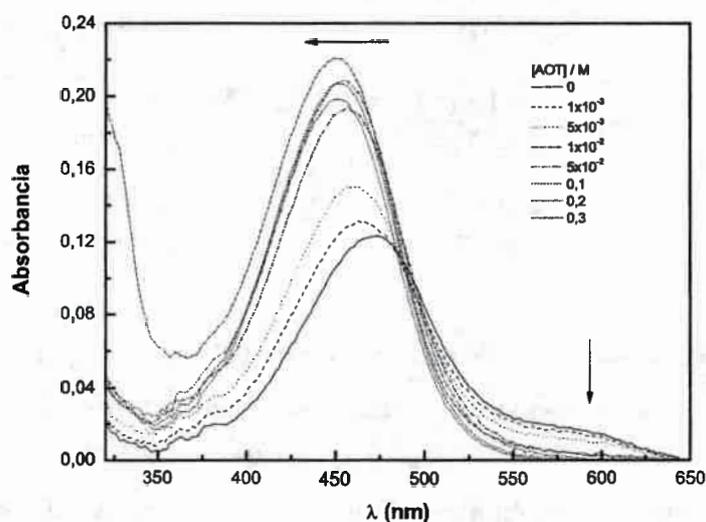


Figura 65. Espectros de absorción de HC en micelas inversas de benceno/AOT. $W = 0$. $[HC] = 2 \times 10^{-5}$ M.

De los gráficos se observa que tanto por absorción como por emisión existe un corrimiento hipsocrómico al incrementar la $[AOT]$. Del estudio en medio homogéneo (Tabla 10) se conoce que las bandas de absorción sufren un corrimiento hipsocrómico cuando π^* aumenta y cuando β disminuye mientras que, las bandas de emisión sufren un corrimiento al azul con una disminución en π^* y un aumento en β .

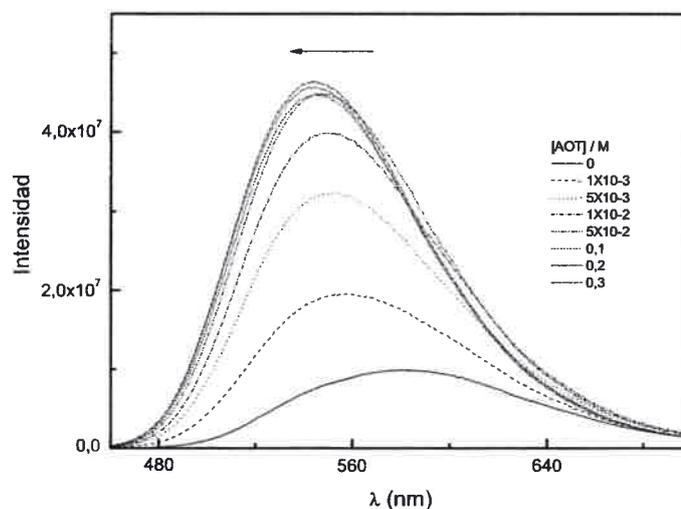


Figura 66. Espectros de emisión de HC en micelas inversas de benceno/AOT. $W = 0$. $[HC] = 2 \times 10^{-5} M$.

Los resultados obtenidos al variar la $[AOT]$ son por lo tanto anómalos ya que ambas bandas se corren hipsocromicamente con el aumento en la $[AOT]$. Tal como se mencionó anteriormente es conocido que la polaridad de los sistemas benceno/AOT aumenta con el incremento de la $[AOT]$ hasta que se forma la micela⁴⁴. De esta manera y al igual que lo observado con la molécula DIA, los resultados muestran que debe haber algún efecto diferente que solo el efecto de polaridad. La posible explicación es que en el estado fundamental, la carga (+) ubicada en el N piridinio puede estar interactuando electrostáticamente con la carga (-) del grupo SO_3^- del AOT. Al excitar la molécula de HC, la carga (+) pasa al N de la anilina, la misma se encontraría en la parte menos polar de la molécula de AOT, posiblemente cerca del carbonilo del grupo éster de este, sensando menos polaridad y un mayor β .

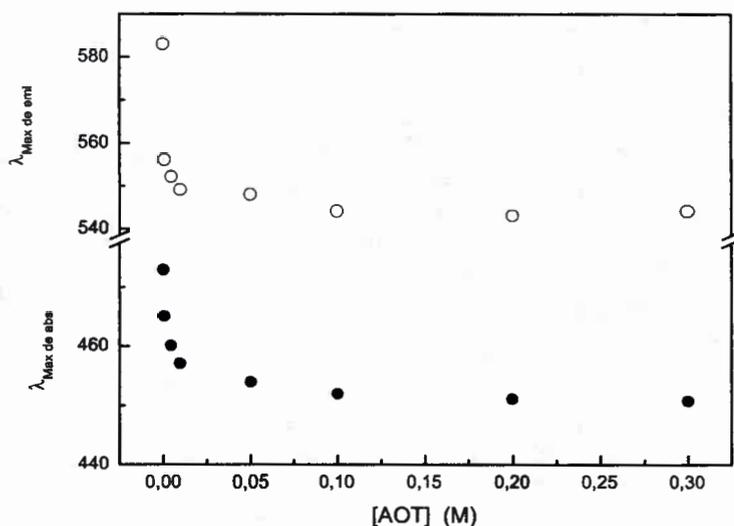


Figura 67. Corrimientos máximos de absorción (●) y de emisión (○) de HC en micelas inversas de benceno/AOT. $W = 0$. $[HC] = 2 \times 10^{-5}$ M.

Por otro lado, se observa que en los espectros de absorción (Figura 65), el hombro centrado a 590 nm y que fue asignado a la banda de absorción del agregado (Cap. D-1. y D-2.), disminuye a medida que se aumenta la concentración de AOT. Tal disminución puede ser explicada, teniendo en cuenta que la molécula HC, esta interaccionando con el surfactante aniónico de AOT favoreciendo la desagregación de HC. En la Figura 68 se observa la disminución del hombro centrado a 590 nm en función de la concentración de AOT. Siguiendo la disminución en la absorción del hombro (Figura 65) se pudo determinar el valor de la *cmc*, igual a 1×10^{-2} M. El mismo es algo superior al encontrado en bibliografía (1×10^{-3} M)⁸¹ y puede ser explicado teniendo en cuenta que el surfactante empleado contenía poca cantidad de agua residual, ya que el mismo fue secado a alto vacío durante dos días.

Se decidió realizar medidas de los tiempos de vida de fluorescencia de la molécula HC para poder dilucidar que tipo de interacciones esta presente en este sistema a diferentes concentraciones de AOT.

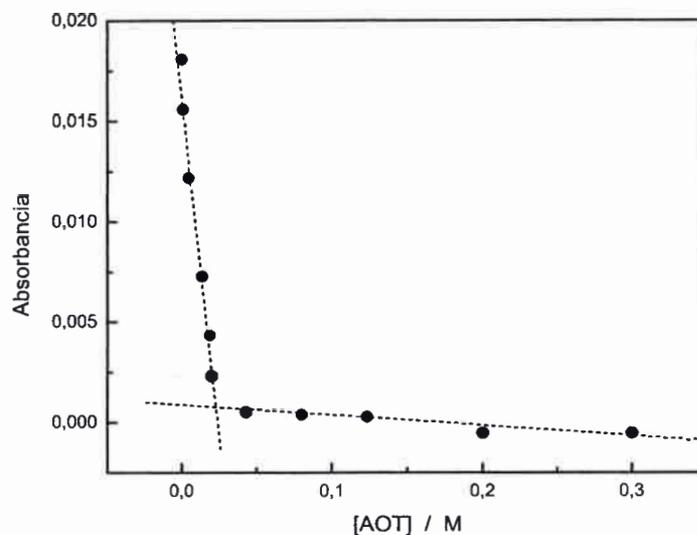


Figura 68. Variación de la absorción a $\lambda_{\text{Observado}} = 590 \text{ nm}$ en micelas inversas de benceno/AOT. $W = 0$. $[HC] = 2 \times 10^{-5} \text{ M}$

b) Estudio del tiempo de vida de fluorescencia de HC en micelas inversas de Benceno/AOT. $W = 0$.

Es preciso recordar que HC a $2 \times 10^{-5} \text{ M}$ en benceno, posee un decaimiento biexponencial e independiente de la λ_{emi} . El tiempo de vida de $\tau = 0,20 \text{ ns}$ le corresponde al monómero, y $\tau = 1,21 \text{ ns}$ le corresponde al agregado HC.

En la Tabla 14 se muestran los tiempos de vida de HC a dos concentraciones diferentes de AOT. Se observa, que a una $[AOT] = 5 \times 10^{-3} \text{ M}$ el decaimiento es biexponencial e independiente de la longitud de onda de emisión. Es preciso hacer notar que a esta concentración de AOT la micela no está formada ($cmc = 1 \times 10^{-2} \text{ M}$); con lo cual no existe la posibilidad de que HC este localizada en un entorno rígido tal como lo es la interfaz micelar y es por ello que los tiempos de vida observados son independientes de la longitud de onda de emisión. Por otro lado, el valor $\tau_1 \approx 0,4 \text{ ns}$ es algo superior y comparable con el monómero de HC en benceno. Tal aumento en el tiempo de vida podría ser debido a la interacción electrostática de HC; en tanto que el $\tau_2 \approx 1,20 \text{ ns}$ es comparable con el agregado en benceno, al parecer la interacción del HC en el agregado es lo suficientemente fuerte y no es perturbada por la presencia de AOT.

Tabla 14. Tiempos de vida de HC en micelas inversas de Benceno/AOT a $W = 0$. $[HC] = 2 \times 10^{-5}$ M. $\lambda_{exc} = 450$ nm. χ^2 : es la suma de las desviaciones standares.

[AOT] = 5×10^{-3} M W = 0	
$\lambda_{emi} = 580$ nm	$\lambda_{emi} = 670$ nm
$\tau_1 = 0,41$ ns	$\tau_1 = 0,45$ ns
$\tau_2 = 1,21$ ns	$\tau_2 = 1,22$ ns
$\chi^2 = 1,37$	$\chi^2 = 1,31$
[AOT] = 0,2 M W = 0	
$\lambda_{emi} = 543$ nm	$\lambda_{emi} = 605$ nm
$\tau = 0,47$ ns	$\tau = 0,78$ ns
$\chi^2 = 1,45$	$\chi^2 = 1,58$

A una $[AOT] = 0,2$ M el decaimiento es monoexponencial y dependiente de la longitud de onda de emisión lo cual indica que HC está localizada en un medio de movimiento restringido. El valor encontrado de 0,47 ns es mucho menor que el del agregado; lo que indicaría que en presencia de micelas inversas de AOT la molécula de HC esta desagregada. Estos resultados indican que las micelas favorecen la desagregación de HC, la cual se localiza en la interfaz micelar, interacciona con las cabezas polares de AOT y sensa un entorno restringido en movimiento.

Como se mencionó anteriormente, se quiere explorar el efecto que tiene las micelas inversas de AOT en el proceso de agregación de HC en benceno discutido en el Cap 3. D-2. La Figura 65 muestra el espectro de absorción a diferentes concentraciones de AOT y a $[HC] = 2 \times 10^{-5}$ M. Del mismo se puede observar que la banda a $\lambda = 590$ nm, la cual es asignada al agregado de HC, desaparece a concentraciones de AOT elevadas. Por lo tanto, el comportamiento de HC en micelas inversas difiere del comportamiento en benceno. Es decir, en las micelas inversas de AOT, HC no esta agregada y se distribuye en las micelas de acuerdo a la distribución Poisson.⁷⁹ A concentraciones de surfactante mayor que la *cmc* el número de ocupación esta dado por la siguiente ecuación:

$$n = \frac{[HC]}{[MI]} \quad (70)$$

donde MI es la concentración de micelas inversas de AOT.

$$[MI] = \frac{[\text{Surfactante}] - cmc}{N_{ag}} \quad (71)$$

donde N_{ag} es el número de agregación, el cual está definido como el número de moléculas que forman una micela inversa.⁷⁹

Si el valor de $n < 1$, indicaría que existe poca probabilidad de encontrar más de una molécula de HC por micela de AOT.¹⁶⁵⁻¹⁶⁷ Si la concentración de surfactante es 0,1 M y la $[HC]=2 \times 10^{-5}$ M, empleando el valor operacional de cmc de 2×10^{-3} M⁸¹ y el valor de $N_{ag} = 20^{168}$ para $W = 0$ podremos obtener el valor de $n = 0,004$. De esta manera, el valor de n indica que encontrar más de una molécula de HC en micelas inversas de AOT es improbable. Estos resultados demuestran el poder de desagregación que las micelas poseen.

c) Estudio del corrimiento del máximo de emisión de HC al cambiar la longitud de onda de excitación (REES). $W = 0$

En la Figura 69 se muestra el REES ($\Delta\lambda_{emi} (\lambda_{emi (exc 515nm)} - \lambda_{emi (exc 450nm)})$) de la molécula HC en función de la concentración de AOT a $W = 0$. Se observa un marcado incremento del REES al incrementar la $[AOT]$. Un valor de 26 nm de REES no se podría solo explicar por la ubicación de la molécula en una zona no fluida de la micela. Se cree que valores tan elevado de REES en la micela, además de indicar la poca fluidez del entorno que sensa, indica la interacción electrostática de la carga (+) de la molécula HC con el grupo SO_3^- de AOT.

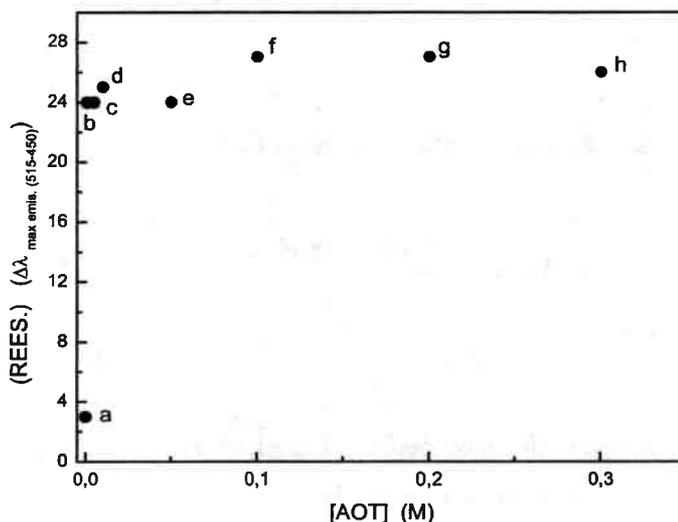


Figura 69. REES ($\lambda_{\text{max. emi.}} \text{ a } \lambda_{\text{exc.}} 515 \text{ nm} - \lambda_{\text{max. emi.}} \text{ a } \lambda_{\text{exc.}} 450 \text{ nm}$) de HC variando la concentración de AOT. $[\text{HC}] = 2 \times 10^{-5} \text{ M}$. $W = 0$ (●). AOT (a) 0 M, (b) $1 \times 10^{-3} \text{ M}$, (c) $5 \times 10^{-3} \text{ M}$, (d) $1 \times 10^{-2} \text{ M}$, (e) $5 \times 10^{-2} \text{ M}$, (f) 0,1 M, (g) 0,2 M, (h) 0,3 M.

d) Variación de la concentración de AOT en Benceno/AOT/agua. $W = 10$.

De forma similar al estudio realizado en micelas inversas de benceno/AOT a $W = 0$ se realizaron los estudios espectroscópicos de absorción y emisión a $W = 10$. En la Figura 70 y Figura 71 se muestran los espectros de absorción y emisión de la variación de AOT a una $[\text{HC}] = 2 \times 10^{-5} \text{ M}$, respectivamente. Mientras que, la Figura 72 muestra los corrimientos máximos de absorción y emisión al variar la $[\text{AOT}]$.

A diferencia de lo observado a $W = 0$ (Figura 67), a $W = 10$ los corrimientos de absorción y emisión son opuestos entre sí (Figura 72). Es decir, se observa un corrimiento hipsocrómico en los máximos de absorción y un corrimiento batocrómico en los máximos de emisión al aumentar la concentración de AOT. Tal como se vió en los estudios solvatocrómicos realizados en medio homogéneo (Tabla 10), tales corrimientos indican que la molécula está sensando un entorno más polar y con menor capacidad de dar electrones (β bajo).

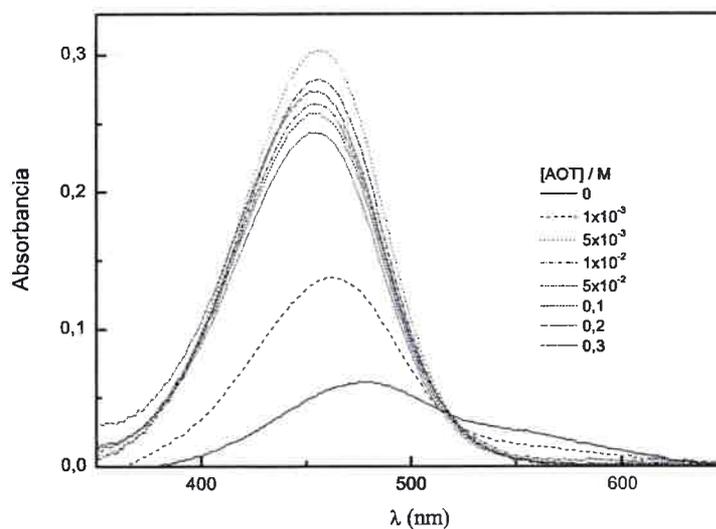


Figura 70. Espectros de absorción de HC en micelas inversas de Benceno/AOT/agua. $W = 10$. $[HC] 2 \times 10^{-5} M$.

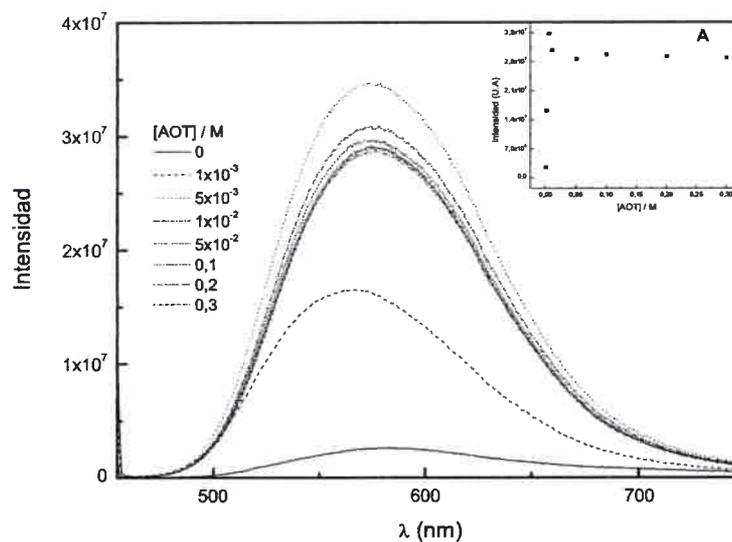


Figura 71. Espectros de emisión de HC en micelas inversas benceno/AOT/agua. $W = 10$. $[HC] 2 \times 10^{-5} M$. Inserto A) Intensidad de fluorescencia vs $[AOT]$ a $\lambda = 580 nm$.

Estos hechos podrían explicarse mediante la diferente capacidad del agua y la molécula HC por interactuar con las cabezas polar de AOT. El agua penetra en la interfaz de la micela hasta proximidades del grupo carbonilo, donde esta ubicada HC y esta sensa una mayor polaridad. Por lo tanto, HC localizada en un entorno más fluido puede ahora sensar la capacidad de dar electrones que posee el éster del surfactante aniónico AOT ($\beta_{\text{agua}} < \beta_{\text{éster}}$).¹⁰

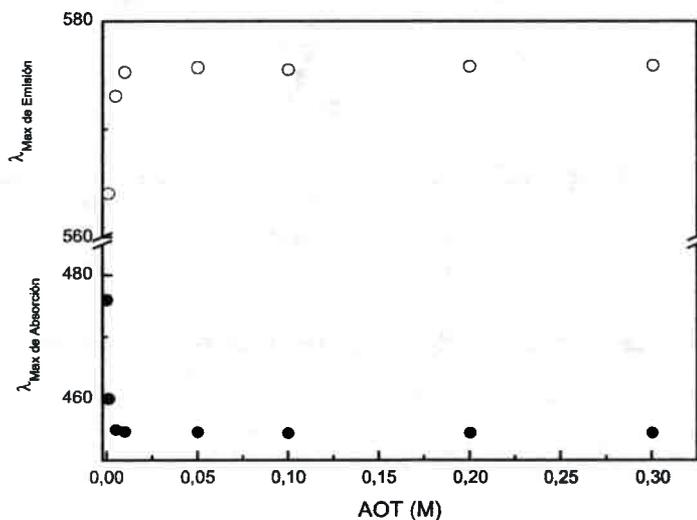


Figura 72. Corrimientos máximos de absorción (●) y de emisión (○) de HC en micelas inversas de Benceno/AOT/agua. $W = 10$. $[HC] 2 \times 10^{-5} M$.

Por otro lado, fue posible determinar la *cmc* del sistema benceno/AOT/agua a $W = 10$, mediante la disminución de la absorción del hombro centrado a 590 nm (Figura 70), tal cual lo realizado a $W = 0$. La Figura 73 muestra la disminución de la absorción en función de la $[AOT]$.

El valor encontrado de *cmc* es de $2 \times 10^{-3} M$ y concuerda con el de bibliografía.⁸¹ Este valor es inferior si se lo compara con el encontrado en ausencia de agua ($cmc = 1 \times 10^{-2} M$) e indicaría que el proceso de micelización esta siendo favorecido en presencia de agua.

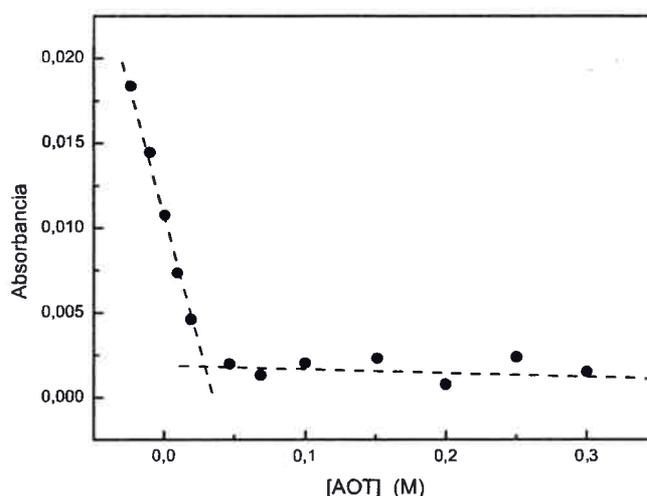


Figura 73. Variación de la absorción a $\lambda_{\text{Observado}} = 590$ nm en micelas inversas de benceno/AOT/agua. $W = 10$. $[\text{HC}] = 2 \times 10^{-5}$ M

e) *Estudio del tiempo de vida de fluorescencia de HC en micelas inversas de benceno/AOT/agua. $W = 10$.*

Se realizaron experiencias de SPC ($\lambda_{\text{exc}} = 450$ nm y $\lambda_{\text{emi}} = 578$ nm, $\lambda_{\text{emi}} = 660$ nm) en micelas inversas de AOT. En la Tabla 15 se muestran los tiempos de vida de HC a dos concentraciones diferente de AOT. Se observa, que en ambas concentraciones de AOT ($[\text{AOT}] = 5 \times 10^{-3}$ M y $[\text{AOT}] = 0,2$ M) el decaimiento es monoexponencial e independiente de la longitud de onda de emisión. Tal decaimiento indica que hay solo una especie presente, lo cual confirma el efecto desagregante que poseen las micelas inversas de AOT. Cabe aclarar que ambas concentraciones de AOT están por encima del valor encontrado de *cmc* ($\text{cmc} \approx 2 \times 10^{-3}$ M) a $W = 10$. El valor encontrado en el tiempo de vida en las micelas es de $\tau \approx 0,3$ ns, algo mayor si se lo compara con el tiempo de vida de HC monómero en benceno. El pequeño incremento en el tiempo de vida puede ser debido a la interacción específica que sensa HC con la región de las cabezas polares del surfactante.

Tabla 15. Tiempos de vida de HC en micelas inversas de benceno/AOT/agua a $W = 10$. $[HC] = 2 \times 10^{-5} M$. $\lambda_{exc} = 450 \text{ nm}$. χ^2 : es la suma de las desviaciones standares.

[AOT] = $5 \times 10^{-3} M$ $W = 10$	
$\lambda_{emi} = 578 \text{ nm}$	$\lambda_{emi} = 660 \text{ nm}$
$\tau = 0,28 \text{ ns}$	$\tau = 0,31 \text{ ns}$
$\chi^2 = 1,29$	$\chi^2 = 1,42$
[AOT] = $0,2 M$ $W = 10$	
$\lambda_{emi} = 578 \text{ nm}$	$\lambda_{emi} = 660 \text{ nm}$
$\tau = 0,27 \text{ ns}$	$\tau = 0,29 \text{ ns}$
$\chi^2 = 1,34$	$\chi^2 = 1,39$

Sin embargo, si se lo compara con el tiempo de vida del monómero incorporado a la micela en ausencia de agua ($\tau_{w=0} \approx 0,4 \text{ ns}$), el tiempo de vida obtenido es algo menor. Este hecho puede ser explicado ya que la molécula incorporada en la bicapa sensa el agua, lo cual hace disminuir su rendimiento cuántico de fluorescencia (Figura inserto 71.A) y por lo tanto obtener un tiempo de vida ligeramente inferior que a $W = 0$.

f) Estudio del corrimiento del máximo de emisión de HC al cambiar la longitud de onda de excitación (REES).

La Figura 74 muestra el REES de la molécula HC en función de la concentración de AOT a $W = 10$. Se observa, que los valores de REES son similares a los obtenidos a $W = 0$ (Figura 69) al incrementar la concentración de AOT.

Tal como se explicó con anterioridad, un valor de 24 nm de REES no se podría solo explicar por la ubicación de la molécula en una zona poco fluida de la micela. Se cree que valores tan elevado de REES en la micela, además de indicar la poca fluidez del entorno que sensa, indica la interacción electrostática de la carga (+) de la molécula HC con el grupo SO_3^- de AOT.

Así, el valor de REES encontrado indica que la interacción electrostática HC-AOT está presente aun en presencia de agua. Con lo cual se puede concluir que para sensar interacciones la técnica de REES es más sensible que la técnica de SPC.

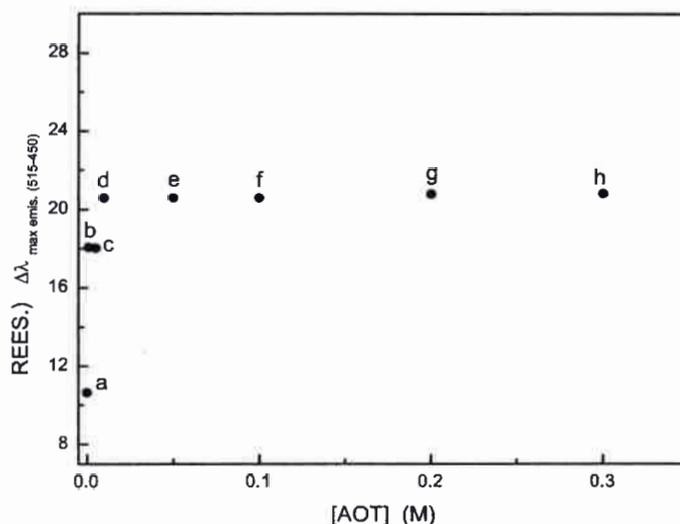


Figura 74. REES ($\lambda_{\text{max. emi}}$ a λ_{exc} 515 nm - $\lambda_{\text{max. emi}}$ a λ_{exc} 450 nm) de HC variando la concentración de AOT. [HC] = 2×10^{-5} M. W = 10. AOT (a) 0 M, (b) 1×10^{-3} M, (c) 5×10^{-3} M, (d) 1×10^{-2} M, (e) 5×10^{-2} M, (f) 0,1 M, (g) 0,2 M, (h) 0,3 M.

En la Figura 75 se muestra la variación de ν_{00} , para los diferentes sistemas estudiados. De los mismos se observa que la ν_{00} a W = 10 permanece constante en todo el rango de la [AOT] y el valor encontrado de la ν_{00} es 19620 cm^{-1} . En comparación con el valor obtenido en medio homogéneo (18400 cm^{-1}) posee un claro corrimiento hacia frecuencias mayores, sin embargo, si se lo compara con el valor obtenido a W = 0 (20300 cm^{-1}) muestra un claro corrimiento a frecuencias menores.

Estos corrimiento de la ν_{00} , tal como se dijo anteriormente no puede ser asignado a los cambios en la polaridad o a la capacidad de donar electrones del medio debido a que HC, es independiente a los parámetros π^* y β . Parece ser que a W = 10 HC sensa un entorno más fluido en comparación con W = 0, pero nunca logra ser lo suficientemente fluido como lo es el medio homogéneo debido a que se ubica en la interfaz micelar.

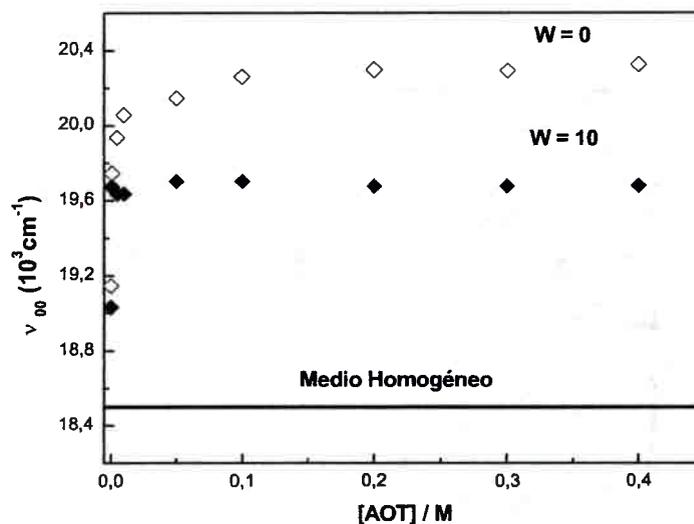


Figura 75. Banda 00 (ν_{00}) en micelas inversas de Benceno/AOT/agua y en medio homogéneo. (◆) $W = 10$, (◇) $W = 0$ y (-) medio homogéneo. $[HC] 2 \times 10^{-5} M$.

En resumen, al realizar los estudios espectroscópicos en micelas inversas de AOT se observa que, a las concentraciones de trabajo, HC se encuentra agregada y, variando la concentración de AOT para los diferentes sistemas estudiados ($W = 0$ y $W = 10$), se pudo comprobar el poder de desagregación de las micelas de AOT como fue encontrado para otras moléculas pruebas.^{166,167} Además, se pudo determinar la *cmc* (concentración micelar crítica) de los diferentes sistemas, siguiendo la disminución de absorbancia de la banda del agregado de HC a medida que se adiciona AOT.

Los espectros de absorción y emisión de ambas hemicianinas estudiadas (DIA y HC) muestran un corrimiento hipsocrómico al aumentar $[AOT]$ a $W = 0$. Estos resultados parecen indicar que en el estado fundamental hay una posible interacción con AOT. En el estado excitado DIA sensa un entorno menos polar y con mayor capacidad de dar electrones y se puede pensar que la carga se ubica cerca del grupo carbonilo de AOT. La adición de agua juega un papel importante en la funcionalidad de las diferentes interfaces, indicando que la misma penetra la interfaz hasta inmediaciones del grupo carbonilo. Se observa, además, que la misma no rompe la fuerte interacción existente entre la molécula HC y el AOT. Sin embargo si logra debilitar la interacción existente entre DIA y AOT. DIA se ubicaría entonces entre las colas hidrocarbonadas

del AOT entorno con menor capacidad para donar electrones. Todos los resultados encontrados por diferentes técnicas son coherentes entre si y corroboran lo antedicho.

4. C-1. PRODAN

Se investigó el comportamiento de espectroscópico de PRODAN en micelas inversas no acuosas de AOT heptano/AOT/DMF y DMA. Es preciso notar que estos solventes polares a diferencia del agua, no poseen la capacidad de formar puente hidrógeno y además es necesario emplear otro solvente externo para la formación de este tipo de sistema organizado. Es por ello que el solvente no polar utilizado en la formación de estos sistemas es heptano.

1) Estudio en micelas inversas no acuosas de heptano/AOT/DMF y DMA

Los resultados encontrados en micelas inversas no acuosas heptano/AOT/DMF y DMA son similares, es por ello que solo se muestran los resultados encontrados en uno de los sistemas.

En la Figura 76, se muestra un espectro de absorción característico de PRODAN en micelas inversas de heptano/AOT/DMF en función de la concentración de AOT a $W_s = 2$. Del mismo, se observa un corrimiento batocrómico en las bandas de absorción al aumentar la concentración de AOT y un claro punto isobestico a 348 nm. Estos resultados indicarían la existencia de un proceso de partición en el estado fundamental entre el solvente no polar y la interfaz micelar. De los estudios realizados en medio homogéneo (Capítulo 3. A-1), puede ser asignado el corrimiento batocrómico en los máximos de absorción al aumentar la [AOT], a la incorporación de PRODAN desde un entorno no polar (solvente orgánico) hacia un entorno más polar (la interfaz micelar).⁹³

Mediante los cambios observados en los espectros de absorción, fue posible determinar el valor de la constante de partición (K_p) empleando el modelo de la pseudo-fase¹⁶⁹⁻¹⁷³

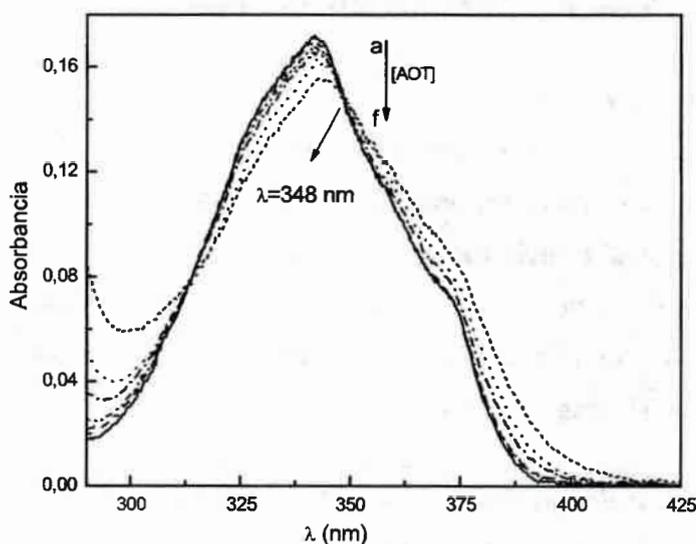


Figura 76. Espectro de absorción de PRODAN variando [AOT] a $W_s = 2$ en micelas inversas no acuosas de heptano/AOT/DMF. [AOT] a) 0M, b) $5,1 \times 10^{-3}M$, c) $1,1 \times 10^{-2}M$, d) $2,9 \times 10^{-2}M$, e) $4,6 \times 10^{-2}M$, f) 0,1M

Este modelo considera la partición de PRODAN entre la micela y el solvente no polar, es decir se considera a las micelas como una pseudo-fase distinta cuyas propiedades son independientes de la concentración de AOT. El modelo propone un equilibrio en el estado fundamental como el siguiente:



Donde $[\text{PRODAN}]_{\text{U}}$ es la concentración de sustrato incorporado en la interfaz micelar, $[\text{PRODAN}]_{\text{Hep}}$ es la concentración de sustrato en el solvente no polar y $[\text{AOT}]$ es la concentración de surfactante utilizado. Luego, la constante de partición (K_p) entre las fases puede ser definida como:

$$K_p = \frac{[\text{PRODAN}]_U}{[\text{PRODAN}]_{\text{Hep}} [\text{AOT}]} \quad (73)$$

La absorción total observada a una longitud de onda constante cuando la molécula PRODAN está repartida entre el solvente no polar y la micela esta dado por:

$$A_T^\lambda = A_{\text{Hep}}^\lambda + A_U^\lambda \quad (74)$$

donde A_{Hep}^λ y A_U^λ es la absorción de PRODAN en heptano y en la interfaz micelar, respectivamente. Para soluciones diluidas la ecuación (74) se puede escribir:

$$A_T^\lambda = (b \varepsilon_{\text{Hep}}^\lambda [\text{PRODAN}]_{\text{Hep}} + b \varepsilon_U^\lambda [\text{PRODAN}]_U) \quad (75)$$

Donde A_T^λ , es la absorción molar total de la solución, b el paso óptico de la luz incidente, $\varepsilon_{\text{Hep}}^\lambda$ y ε_U^λ , son los correspondientes coeficientes de extinción molar de PRODAN en heptano y unida en la interfaz de AOT, respectivamente.

El balance de masa de la molécula PRODAN está dado por la ecuación (76):

$$[\text{PRODAN}]_T = [\text{PRODAN}]_{\text{Hep}} + [\text{PRODAN}]_U \quad (76)$$

donde $[\text{PRODAN}]_T$ es la concentración analítica de PRODAN y es constante para todas las soluciones de AOT. Si la longitud de onda de absorción es constante ($\lambda = 342 \text{ nm}$), se puede obtener un gráfico que relacione la absorción con la variación de la $[\text{AOT}]$, tal como lo muestra Figura 77.

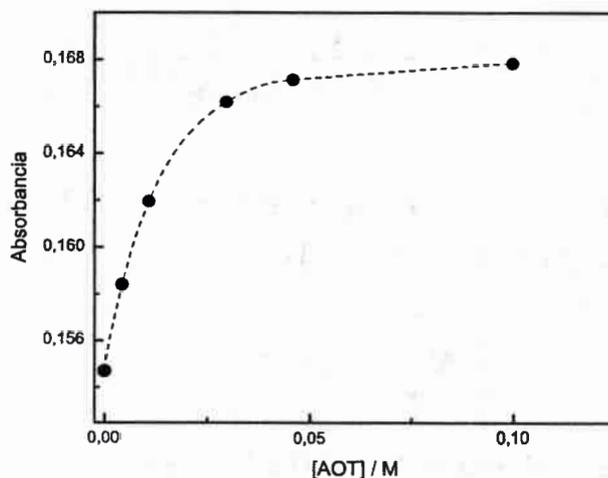


Figura 77. Absorción de PRODAN en micelas inversas no acuosas a $\lambda = 342$ nm, en función de la [AOT].

Considerando las ecuaciones (73), (75) y (76), y teniendo en cuenta que el paso óptico es de 1 cm, podemos deducir la ecuación (77). Esta ecuación solo es aplicable cuando la $[\text{PRODAN}]_T \ll [\text{AOT}]$

$$A_T^\lambda = \frac{(\epsilon_{\text{Hep}}^\lambda + \epsilon_U^\lambda [\text{AOT}] K_p) [\text{PRODAN}]_T}{1 + K_p [\text{AOT}]} \quad (77)$$

De esta manera, mediante la ecuación 77 y ajustando los valores de absorción a $\lambda = 342$ nm (Figura 77), el valor obtenido de K_p es de $10 \pm 2 \text{ M}^{-1}$. Este valor, es elevado y nos permite decir que a una concentración 0,1 M de AOT la molécula PRODAN prácticamente esta incorporada en la interfaz de las micelas inversas de AOT.

Por otro lado, la Figura 78 muestra espectros característicos de emisión de PRODAN en micelas inversas de heptano/AOT/DMF en función de la concentración de AOT a $W_s = 2$. Al igual que lo observado en los espectros de absorción, se observa un corrimiento batocrómico en los máximos de las bandas de emisión al aumentar la concentración de AOT. Los mismos pueden ser explicados, teniendo en cuenta el proceso de partición entre la interfaz de la micela inversa y el solvente no polar.

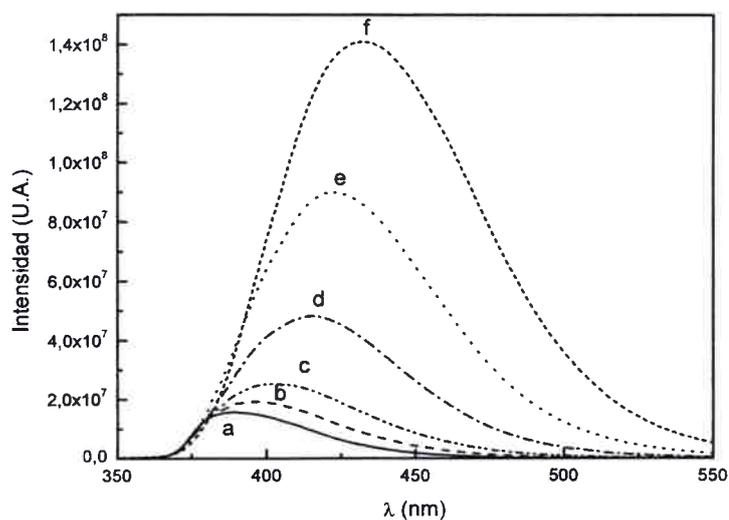


Figura 78. Espectro de emisión de PRODAN variando la [AOT] a $W_s = 2$ en micelas inversas no acuosas de heptano/AOT/DMF o DMA. λ_{exc} : 343 nm. [AOT] a) 0M, b) $5,1 \times 10^{-3}$ M, c) $1,1 \times 10^{-2}$ M, d) $2,9 \times 10^{-2}$ M, e) $4,6 \times 10^{-2}$ M, f) 0,1M

Los valores de K_p pueden ser determinados por cambios en la intensidad de fluorescencia al variar la concentración de AOT y teniendo en cuenta el modelo de la pseudo-fase anteriormente planteado.¹⁶⁹⁻¹⁷³ Si la concentración analítica de PRODAN y la longitud de onda de excitación son constantes, la intensidad de fluorescencia observada está dada por:

$$I = I_{Hep} + I_U \quad (78)$$

donde I_{Hep} y I_U es la intensidad de PRODAN en heptano y en la interfaz de las micelas inversas no acuosas, respectivamente. Para soluciones diluidas la ecuación (78) se puede escribir:

$$I = (I_0 \Phi_{Hep} \epsilon_{Hep} [PRODAN]_{Hep} + I_0 \Phi_U \epsilon_U [PRODAN]_U) / A_T \quad (79)$$

Donde, I es la intensidad de fluorescencia a una concentración de AOT dada, I_0 es la intensidad de la luz incidente; Φ_{Hep} y Φ_{U} , son los rendimientos cuánticos de PRODAN en heptano y unida en la interfaz de AOT, respectivamente. La A_T de la solución y el balance de masa de PRODAN esta dado por la ecuación (75) y (76), respectivamente:

Considerando las ecuaciones (75), (76) y (79), podemos deducir la ecuación (80). Esta ecuación solo es aplicable cuando la $[\text{PRODAN}]_T \ll [\text{AOT}]$

$$I = \frac{I_0 (\Phi_{\text{Hep}} + \Phi_{\text{U}} K_p [\text{AOT}])}{(1 + K_p [\text{AOT}])} \quad (80)$$

Luego graficando la intensidad de emisión en función la variación de la $[\text{AOT}]$, se obtiene la

Figura 79.

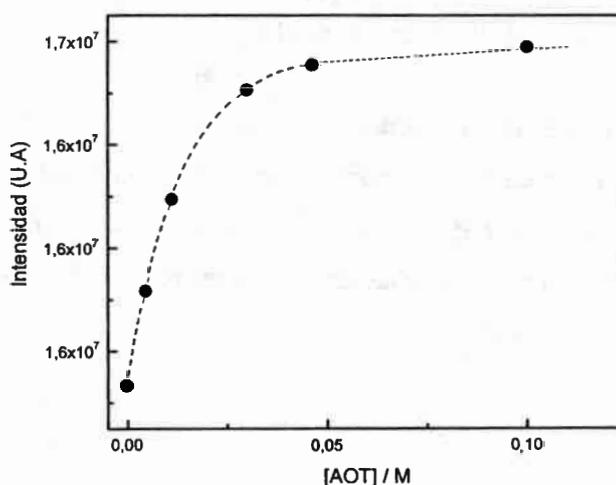


Figura 79. Variación de la intensidad de PRODAN en micelas inversas no acuosas mirando a $\lambda = 440$ nm, en función de la $[\text{AOT}]$.

Se ajusta luego los datos experimentales de la intensidad de emisión a $\lambda_{\text{em}} = 440$ nm en la Figura 79 mediante la ecuación (80) y se determina el valor de K_p . Se obtiene un valor de $12 \pm 2 \text{ M}^{-1}$.

Es preciso notar que si bien los valores obtenidos tanto por emisión como por absorción ($10 \pm 2 \text{ M}^{-1}$) son del orden y comparable.

Como se mostró en las ecuaciones (56) y (57) del Cap. 3. A-1, la $E_{\text{abs PRODAN}}$ y $E_{\text{emi PRODAN}}$ correlacionan con el parámetro $E_{\text{T}(30)}$ y pueden ser utilizados para determinar micropolaridad en la interfaz de micelas inversas no acuosas de AOT. Dado que PRODAN sufre un proceso de partición, se determinó la micropolaridad de la interfaz micelar a una $[\text{AOT}] = 0,2 \text{ M}$ y a $W_s = 2$. Se encontró que a $\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}} = 342 \text{ nm}$ un valor de $E_{\text{T}(30)}$ de 40,7 Kcal/mol semejante a los valores encontrados de los solventes acetofenona o diclorometano. En tanto que, a $\lambda_{\text{emi}}^{\text{max}} = 440 \text{ nm}$ el valor encontrado es de $E_{\text{T}(30)}$ de 41,7 Kcal/mol y le corresponde a valores de benzonitrilo o 2-cloro-piridinia. Estos valores se corresponden a solventes de polaridad considerable e indicarían que PRODAN, ubicado en la interfaz micelar, estaría sensando una región de polaridad algo menor que la de los alcoholes.

5

Estudio en Vesículas PRODAN, DPH, DIA y HC

Concluido el estudio espectrofotométrico en micelas inversas no acuosas de AOT, se caracterizaron vesículas unilaminares grandes de DOPC, empleando como molécula prueba PRODAN. La importancia de caracterizar sistemas de este tipo, radica en que son posibles de mimetizar células biológicas y emplearlos como transportadores de droga.

5. A-1. PRODAN

El comportamiento de la molécula prueba PRODAN fue investigado en vesículas unilaminares grandes de DOPC a la misma temperatura que se realizó el estudio en medio homogéneo (25 °C). A esta temperatura se sabe que se está trabajando en la fase cristal-líquido de estas vesículas.²⁸

a) Efecto de la variación de [DOPC].

Se realizaron estudios espectroscópicos variando la concentración del fosfolípido a una dada concentración de la molécula prueba.

La Figura 80 muestra la posición del máximo de las bandas de absorción con el aumento de DOPC.

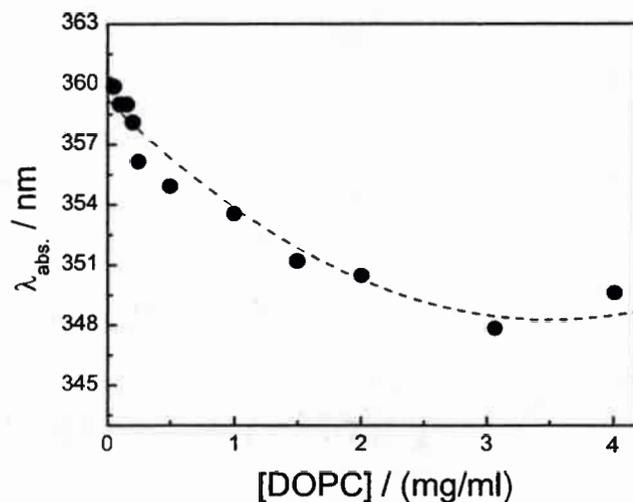


Figura 80. Corrimientos en el máximo de absorción UV-Visible de PRODAN en vesículas unilaminares de DOPC. $[PRODAN] = 5 \times 10^{-6} M$

En las Figura 81 y Figura 82 se muestran los espectros de emisión de PRODAN y la posición del máximo de las bandas de emisión con el aumento de DOPC, respectivamente. Como se observa en la Figura 81 al aumentar la concentración de DOPC hay un corrimiento hipsocrómico en los espectros de emisión, también se observa la aparición de un hombro a $[DOPC] > 1 \text{ mg/ml}$. El origen del mismo se discutirá en profundidad en los incisos *c)* y *d)*

Como se puede observar, al aumentar $[DOPC]$, hay un corrimiento hipsocrómico tanto en la banda de absorción como de emisión. Estos corrimientos hipsocrómicos estarían indicando que la molécula está sensando un entorno menos polar (ecuación (54) y (55)), es decir, PRODAN se estaría incorporando a la bicapa lipídica al aumentar $[DOPC]$. A concentraciones mayores a 1 mg/ml de DOPC, la misma parece estar prácticamente incorporada en la vesícula.¹⁷⁴⁻¹⁷⁸ Se realizaron medidas de depolarización de fluorescencia de PRODAN para poder determinar la fluidez de la interfaz en donde PRODAN se incorpora.

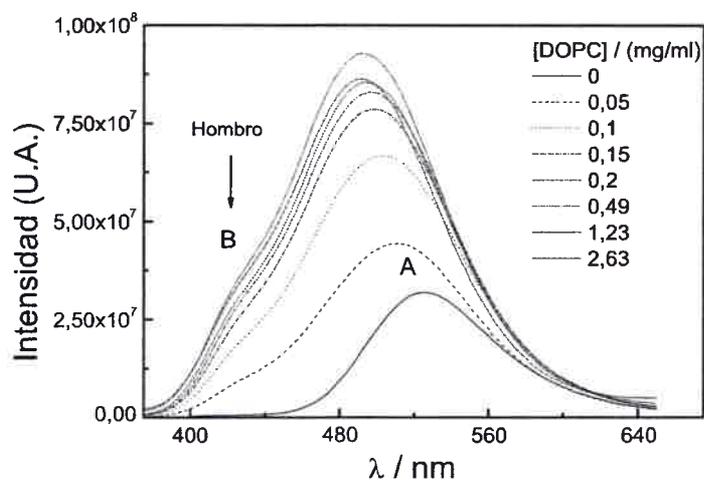


Figura 81. Espectros de emisión variando [DOPC]. [PRODAN] = 5×10^{-6} M. $\lambda_{exc} = 319$ nm

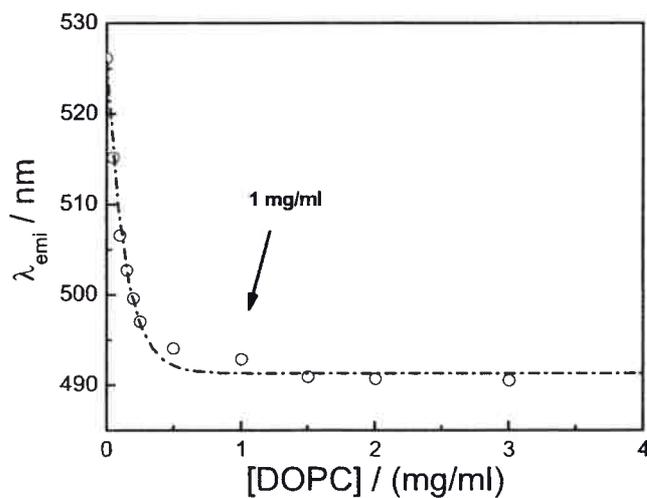


Figura 82. Corrimientos en el máximo de emisión de PRODAN en vesículas unilaminares de DOPC. [PRODAN] = 5×10^{-6} M. $\lambda_{exc} = 319$ nm.

En la Figura 83, se muestra la variación de $\langle r \rangle$ al variar la concentración de DOPC a una concentración de PRODAN de 1×10^{-6} M. Se puede observar que $\langle r \rangle$ aumenta con el aumento en la concentración de DOPC hasta un valor aproximado de

1mg/ml y luego prácticamente se mantiene constante. Esto muestra que la molécula prueba al incorporarse en la interfaz de la vesícula sensa un entorno menos fluido.

Mediante los cambios observados en los valores de $\langle r \rangle$ se determinó el valor de la constante de partición K_p . Se estudió el proceso de partición entre PRODAN en las vesículas y el agua es tratado mediante el modelo de la pseudo-fase,^{169-173,179} anteriormente detallado (Capítulo 4. C-1).

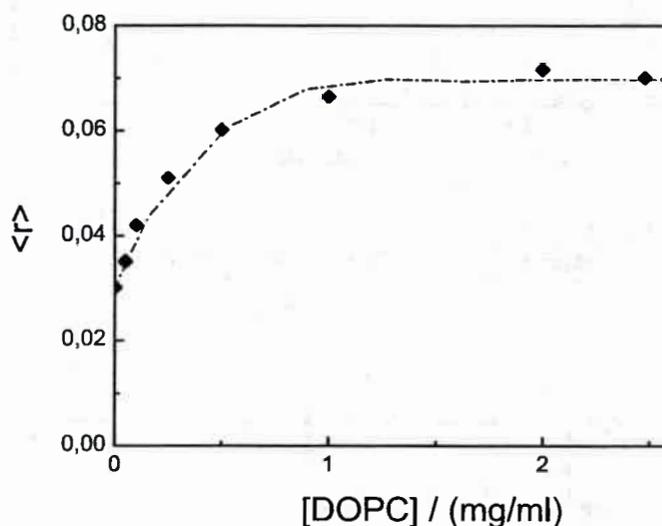


Figura 83. Variación $\langle r \rangle$ de PRODAN en LUV de DOPC al variar la concentración de DOPC. $[\text{PRODAN}] = 1 \times 10^{-6} \text{ M}$. $\lambda_{\text{exc}} = 319 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emi}} = 490 \text{ nm}$.

Haciendo uso de la propiedad de aditividad que posee la anisotropía de fluorescencia se puede reescribir la ecuación (21) como:

$$\langle r \rangle = \frac{\langle r_A \rangle [\text{PRODAN}_A]}{[\text{PRODAN}]_T} + \frac{\langle r_U \rangle [\text{PRODAN}_U]}{[\text{PRODAN}]_T} \quad (81)$$

Donde $\langle r \rangle$ es la anisotropía de la muestra, $\langle r_A \rangle$ es la anisotropía de PRODAN en agua y $\langle r_U \rangle$ es la anisotropía de PRODAN incorporado a la vesícula. $[\text{PRODAN}_U]$ es la concentración analítica del sustrato incorporado a la bicapa lipídica, $[\text{PRODAN}_A]$ es la concentración del sustrato en agua y $[\text{DOPC}]$ es la concentración del fosfolípido.

Combinando las ecuaciones (73), (76) y (81), obtenemos la siguiente ecuación:

$$\langle r \rangle = \frac{\langle r_A \rangle + \langle r_U \rangle K_p [\text{DOPC}]}{(1 + K_p [\text{DOPC}])} \quad (82)$$

Luego se ajustan los valores experimentales de anisotropía empleando la ecuación (82) y se determina la K_p . El valor obtenido es de $16,4 \pm 2 \text{ (mg/ml)}^{-1}$ o $12900 \pm 1300 \text{ M}^{-1}$ considerando el peso molecular del fosfolípido de 786,15 gr/mol. Este valor elevado de K_p nos permite decir que a una concentración de $[\text{DOPC}] = 1 \text{ mg/ml}$ el 94% de la molécula PRODAN esta incorporada en la bicapa (ecuación (73)), en tanto que solo queda una pequeña cantidad de PRODAN en agua, no detectable experimentalmente.

b) Efecto de la variación de [PRODAN] a una concentración de DOPC constante.

Se investigó la posibilidad que el proceso de agregación este ocurriendo en la bicapa lipídica. Para ello, se realizaron estudios espectroscópicos variando la concentración de PRODAN a una concentración de DOPC de 1 mg/ml, donde la molécula prueba se considera prácticamente incorporada. En la Figura 84 y Figura 85 se muestran los espectros de absorción y el gráfico de acuerdo con la ley de Lambert y Beer de PRODAN, respectivamente.

Como se puede ver y en contraposición con lo observado en el estudio realizado en agua, esta molécula una vez incorporada en la vesícula de DOPC, cumple la ley de Lambert y Beer.

Esto demuestra que cuando la misma está localizada en un entorno menos polar (bicapa lipídica) que el agua, se desfavorece su agregación encontrándose como monómero. Esto puede deberse a que PRODAN es más soluble en solventes orgánicos que en agua.

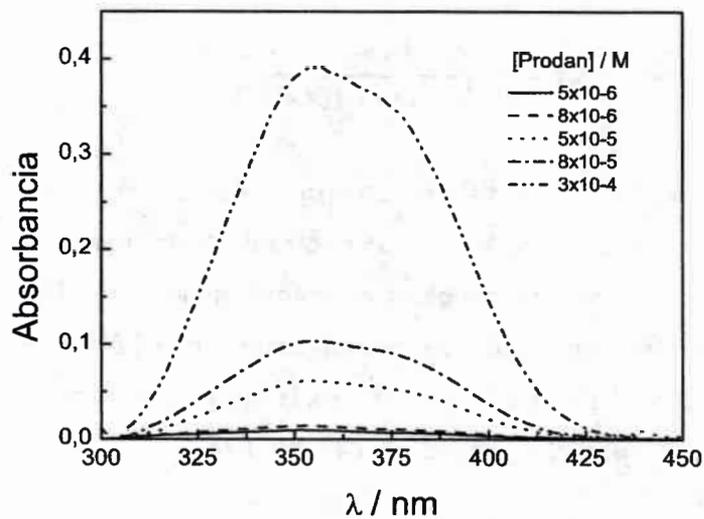


Figura 84. Espectros de absorción UV-Visible de la molécula de PRODAN, variando su concentración, en vesículas unilaminares de DOPC. [DOPC] = 1 mg/ml.

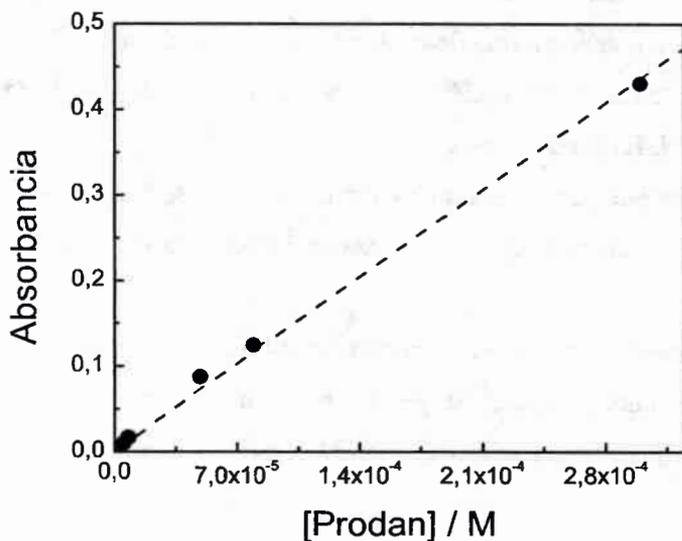


Figura 85. Absorbancia vs. concentración de la molécula de PRODAN en vesículas unilaminares grandes de DOPC.

c) Estudio del corrimiento del máximo de emisión de PRODAN al cambiar la longitud de onda de excitación (REES).

Tal como se explicó anteriormente el fenómeno conocido como REES es muy sensible a cambios en la micropolaridad y en la microviscosidad del microentorno en donde se ubique la molécula prueba.¹³⁵

En la Figura 86 se muestra $\Delta\lambda_{emi}$ ($\lambda_{emi} (exc\ 410nm) - (\lambda_{emi} (exc\ 319nm))$) variando la concentración de PRODAN.

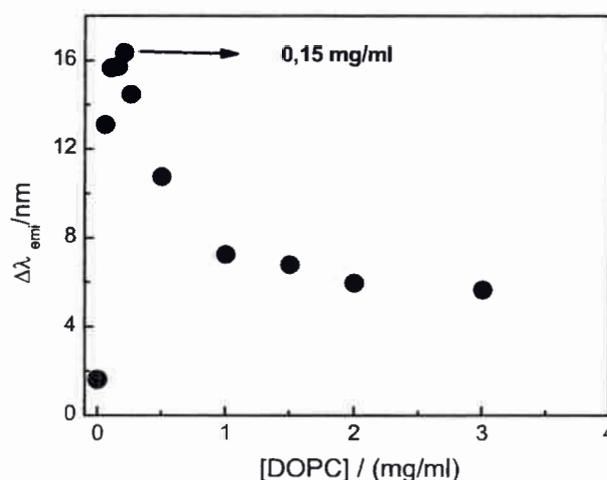


Figura 86. REES de la molécula PRODAN al variar la [DOPC]. [PRODAN]= 5×10^{-6} M. $\Delta\lambda_{emi} = (\lambda_{emi} (exc\ 410nm) - (\lambda_{emi} (exc\ 319nm)))$.

Los cambios que se observan en la Figura 86 pueden explicarse mediante dos posibles procesos: i) una incorporación gradual de la molécula prueba desde el agua hacia la bicapa, es decir un reparto, por lo tanto, existen dos especies que emiten de diferentes entornos y/o ii) que el tiempo de relajación del solvente sea comparable o mayor que el tiempo de vida de fluorescencia de PRODAN, es decir el fenómeno de REES puede estar de manifiesto. Además, estos efectos son dependientes de la concentración de DOPC.

Haciendo uso del valor de la K_p obtenida por espectrofotometría y la ecuación (73) se puede calcular el porcentaje de PRODAN en agua.

A una $[DOPC] = 0,15\text{mg/ml}$, el 30% del total de la concentración de PRODAN permanece en agua. Es decir, a bajas concentraciones de vesículas ($DOPC < 0,15\text{mg/ml}$) no hay suficiente cantidad de las mismas para incorporar la totalidad de PRODAN y parte de PRODAN queda en el agua. De esa manera, a bajas concentraciones de DOPC los procesos i) y ii) se manifiestan, aunque el dominante es i). A concentraciones más altas de DOPC, debido a la incorporación de la molécula a la vesícula (entorno menos fluido), comienza a dominar el proceso ii). Sin embargo, a concentraciones de DOPC mayores a 1mg/ml donde, PRODAN ya está totalmente incorporado en la bicapa.

Chong y col.¹⁷⁴ investigaron el efecto que ejerce la presión hidrostática en la localización de la molécula PRODAN en bicapas lipídicas de vesículas multilaminares de dimirísil - L - α - fosfatidil colina (DMPC). Los cambios en los espectros de emisión se los asignaron a la diferente relocalización de la molécula prueba en la bicapa. Es decir la molécula incorporada a la interfase puede estar localizada tanto en un microentorno polar (A) y uno menos polar (B) tal cual se muestra en la Figura 87.

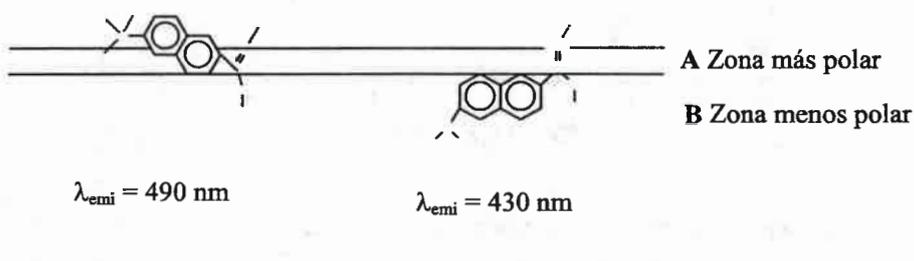


Figura 87. PRODAN totalmente incorporado, ubicado en diferentes entornos. Adaptación de la referencia 174.

Los resultados obtenidos con el REES a una concentración mayor de 1 mg/ml (Figura 86) y la aparición de un hombro ($\lambda_{emi} = 430\text{ nm}$) en los espectros de emisión (Figura 81) pueden ser explicados teniendo en cuenta lo propuesto por Chong y col.¹⁷⁴ Es decir, en los espectros de emisión (Figura 81) se observa la aparición de un hombro (B) centrado en 430 nm a $[DOPC] > 1\text{ mg/ml}$. Esto indica la posibilidad de que PRODAN puede localizarse en dos zonas dentro de la bicapa. Esto también estaría explicando porque los valores de $\Delta\lambda_{emi}$ continúan disminuyendo a una concentración

mayor de 1 mg/ml con el aumento en la concentración de fosfolípido. Así PRODAN incorporado en la bicapa estaría sensando dos entornos de polaridad diferente.

Debido a que PRODAN correlaciona con el parámetro $E_{T(30)}$, en el inciso e) se explicará con detalle la determinación de la micropolaridad de los dos entornos donde PRODAN esta localizado en la bicapa.

d) *Estudio de los tiempos de vida de fluorescencia de PRODAN en vesícula de DOPC.*

Se procedió a determinar los tiempos de vida de fluorescencia de PRODAN en las vesículas de DOPC con la técnica SPC. En la Tabla 16 se observan los datos obtenidos variando la [DOPC]. Los mismos estarían de acuerdo con la distinta ubicación propuesta de PRODAN al aumentar la concentración de DOPC, como así también con los resultados encontrados mediante la técnica de REES.

Tabla 16. Tiempo de vida de fluorescencia de PRODAN en LUV de DOPC. [PRODAN] = $3 \times 10^{-5} M$.

[DOPC] (mg/ml)	$\lambda_{exc}:360nm$ $\lambda_{emi}:435nm$	$\lambda_{exc}:360nm$ $\lambda_{emi}:525nm$
0,05	$\tau_1 = 3,01 \text{ ns} \pm 0,01$ (16%) $\tau_2 = 0,26 \text{ ns} \pm 0,02$ (34%) $\tau_3 = 1,15 \text{ ns} \pm 0,09$ (49%) $\chi^2 = 1,20$	$\tau_1 = 3,19 \text{ ns} \pm 0,01$ (22%) $\tau_2 = 0,80 \text{ ns} \pm 0,03$ (78%) $\chi^2 = 1,29$
0,25	$\tau_1 = 4,66 \text{ ns} \pm 0,09$ (55%) $\tau_2 = 0,17 \text{ ns} \pm 0,05$ (5%) $\tau_3 = 1,19 \text{ ns} \pm 0,07$ (40%) $\chi^2 = 1,30$	$\tau = 3,88 \text{ ns} \pm 0,06$ $\chi^2 = 0,90$
1	$\tau_1 = 3,35 \text{ ns} \pm 0,09$ (52%) $\tau_2 = 1,26 \text{ ns} \pm 0,04$ (48%) $\chi^2 = 1,20$	$\tau = 4,11 \text{ ns} \pm 0,09$ $\chi^2 = 1,70$
5	$\tau_1 = 3,33 \text{ ns} \pm 0,09$ (40%) $\tau_2 = 1,26 \text{ ns} \pm 0,04$ (60%) $\chi^2 = 1,19$	$\tau = 4,08 \text{ ns} \pm 0,09$ $\chi^2 = 1,79$

χ^2 : es la suma de las desviaciones standares y los valores en paréntesis es la contribución de la especie obtenida desde el fito.

A bajas concentraciones de vesícula, $[DOPC] < 0,25$ mg/ml, se puede deducir comparando con la emisión de PRODAN en agua (Cap. 3. A-2) que los τ_1 y τ_2 corresponden a PRODAN en agua (Tabla 6), mientras que τ_3 correspondería a la emisión desde la bicapa.

A concentraciones mayores de vesículas $[DOPC] > 1$ mg/ml, donde la molécula está totalmente incorporada a la bicapa lipídica, se observa que a $\lambda_{emi} = 525$ nm su decaimiento es monoexponencial con un $\tau \cong 4$ ns, correspondiente a la especie que emite desde el entorno más polar (Figura 87), mientras que a $\lambda_{emi} = 435$ nm el decaimiento es biexponencial, debido a la diferente localización de PRODAN en la bicapa (zona polar y no polar). Es preciso hacer notar que los tiempos de vida adjudicados al entorno más polar a diferentes longitud de onda de emisión son similares ($\tau \cong 4$ ns y $\tau \cong 3,5$ ns), por lo que, el tiempo de vida restante a la longitud de onda de emisión del entorno menos polar es ($\tau \cong 1,2$ ns). Notar que a $[DOPC] = 0,25$ mg/ml la contribución de PRODAN en agua es muy baja. Además, a ninguna concentración de DOPC se observa la componente del agregado encontrada en los estudios de agua pura (Cap. 3. A-2).

e) Micropolaridad de la vesícula de DOPC.

Como se mostró en las ecuaciones (56) y (57), $E_{abs\ PRODAN}$ y $E_{emi\ PRODAN}$ correlaciona con el parámetro $E_{T(30)}$ y pueden ser utilizados para determinar micropolaridad en vesículas unilaminares grandes de DOPC. Debido a que PRODAN una vez incorporado en la vesícula, ($[DOPC] \geq 1$ mg/ml) se ubica en dos lugares diferentes, se calcularon las micropolaridades. Se encontró que a $\lambda_{emi}^{max} = 490$ nm un valor de $E_{T(30)}$ de 53,8 Kcal/mol. Este valor se corresponde con el de metanol y estaría sensando la zona polar de la interfase de la membrana, Figura 87. A $\lambda_{emi}^{max} = 430$ nm el valor de $E_{T(30)}$ es de 36,98 Kcal/mol y se corresponde con el valor de tetrahidrofurano y/o benceno, aquí PRODAN esta sensando un microentorno no polar, tal como se muestra en la Figura 87. Podemos decir que, los valores encontrados de $E_{T(30)}$ en vesículas difieren totalmente a los encontrados en agua pura ($E_{T(30)} = 63,1$ Kcal/mol). Por otro parte, la micropolaridad sensada en el estado fundamental, $E_{T(30)} = 36$ Kcal/mol corresponde a un valor de $E_{T(30)}$ que está de acuerdo con el valor encontrado del microentorno no polar.

5. A-2. Estudio electroquímico en vesícula unilaminares grandes de DOPC.

Pocos son los trabajos encontrados en bibliografía,¹⁸⁰⁻¹⁸² donde se encapsula una molécula electroquímicamente activa en la cavidad acuosa de vesículas, para ser detectadas por técnicas electroquímicas. Recientemente, Ikonen y col.¹⁸³ encontraron un método electroquímico para determinar el coeficiente de partición entre el agua y la vesícula para algunas moléculas denominadas “*agentes bloqueadores beta-adrenérgicos*” solubles en agua.

Especialmente la electroquímica de interfaz líquido-líquido es una buena herramienta para determinar constante de partición ya que permitiría controlar el potencial de interfaz y por lo tanto la distribución de la especie entre las dos fases. Es decir, técnicas electroquímicas las cuales son técnicas rápidas y sencillas experimentalmente; combinadas con la capacidad que poseen las vesículas en mimetizar células, es un herramienta potencial poco explorada y puede contribuir para entender diferentes procesos en el área de la biotecnología.¹⁸⁴⁻¹⁸⁶

Es necesario aclarar, que en electroquímica se empleará otro tipo de nomenclatura, para poder diferenciarla de la técnicas espectrofotométricas. De esta manera, se logrará comprender y comparar los diferentes análisis por técnicas independientes.

Al igual que lo realizado en agua, se comenzó el estudio electroquímico de la molécula de PRODAN en LUV de DOPC mediante la técnica de voltametría cíclica. Se empleo una concenyración de PRODAN de 2×10^{-4} M y se utilizó como electrolito soporte LiClO_4 0,1 M. Los voltagramas típicos variando la concentración de DOPC obtenidos se muestran en la Figura 88. Se observa que la forma de los voltagramas es similar a los obtenidos en agua (Figura 28), lo cual sugiere que el mecanismo de electro-oxidación para PRODAN en vesículas es similar al de agua.

Además, para cada una de las concentraciones de DOPC se graficó el valor de la i_p en función de la $v^{1/2}$, tal como lo muestra la Figura 89. De la misma, se observa que existe una dependencia lineal de la i_p con la $v^{1/2}$ independientemente de la concentración de DOPC; lo cual indica que el proceso de oxidación está gobernado por la difusión en todos los casos.¹³⁹

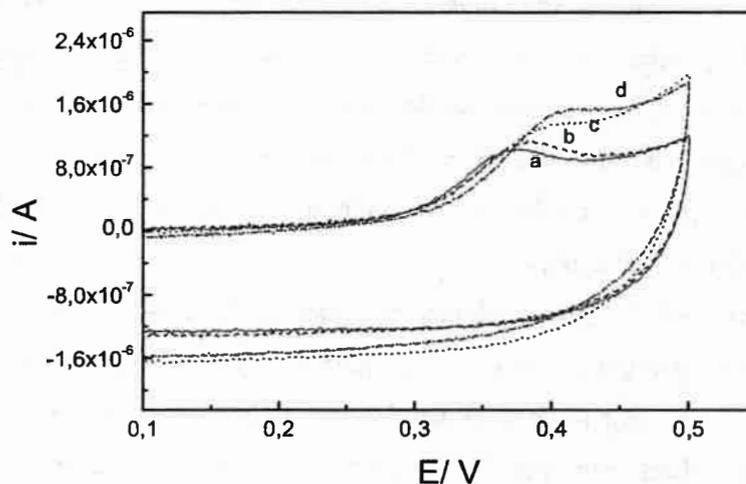


Figura 88. Voltagramas cíclicos de la PRODAN a diferentes concentraciones de DOPC. Intervalo de potencial barrido 0,1 V- 0,6 V. $v = 50\text{mV Seg}^{-1}$. $[\text{PRODAN}] = 2 \times 10^{-4} \text{ M}$. $[\text{DOPC}]$: a) 0,25mg/ml, b) 0,5mg/ml, c) 1mg/ml, a) 1,5mg/ml.

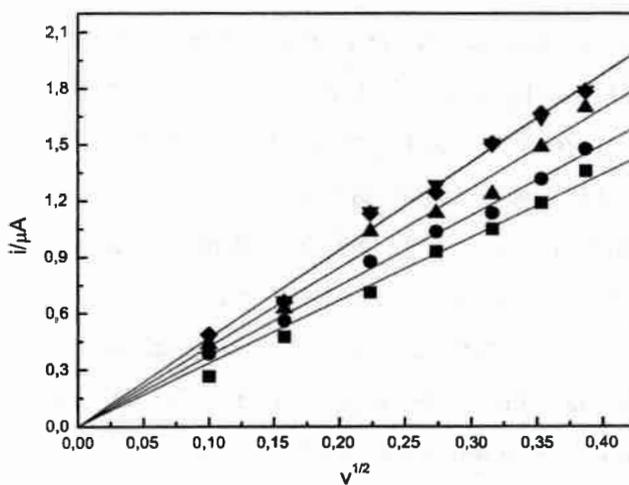


Figura 89. Variación de la i_p en función de $v^{1/2}$. $[\text{PRODAN}] = 2 \times 10^{-4} \text{ M}$. $[\text{LiClO}_4] = 0,1 \text{ M}$. $[\text{DOPC}]$: ■) 0,25mg/ml, ●) 0,5mg/ml, ▲) 1mg/ml, ▼) 1,5mg/ml ♦) 2mg/ml.

La pendiente de estas rectas (Figura 90) aumenta hasta una $[\text{DOPC}] \approx 1 \text{ mg/ml}$ y para $[\text{DOPC}] > 1,5 \text{ mg/ml}$ se mantiene prácticamente constante.

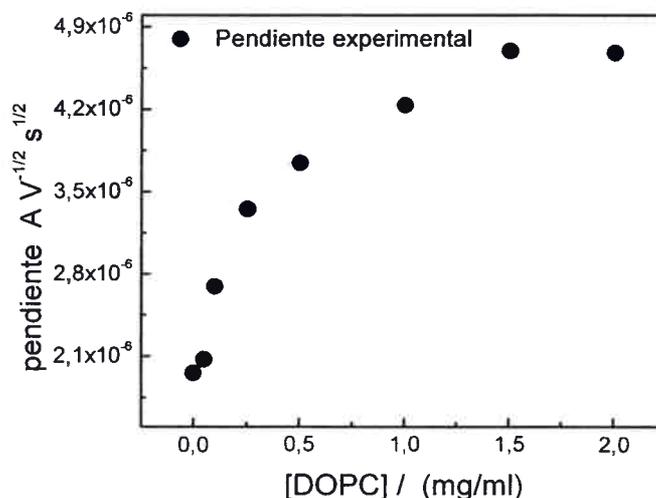


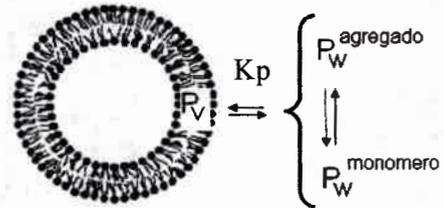
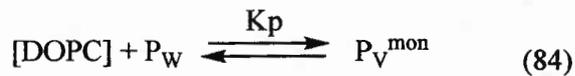
Figura 90. Variación de la pendiente de la Figura 89 en función de la $[\text{PRODAN}]$. $[\text{PRODAN}] = 2 \times 10^{-4} \text{ M}$. $[\text{LiClO}_4] = 0,1 \text{ M}$

A medida que se incrementa la concentración de DOPC aumenta la concentración de PRODAN que se incorpora como monómero a la bicapa y por lo tanto se observa un aumento en la pendiente hasta $[\text{DOPC}] \approx 1 \text{ mg/ml}$. Para $[\text{DOPC}] > 1 \text{ mg/ml}$, PRODAN ya está totalmente incorporada y es por ello que se mantiene constante. Análogo comportamiento de PRODAN incorporándose a la bicapa fue estudiado anteriormente en detalle (Cap. 5. A-1. a)) por espectrofotometría.

Es de interés entonces, investigar si dicho proceso puede ser estudiado mediante las técnicas electroquímicas. Para ello se propone el siguiente modelo, considerando cuatro hipótesis:

- ✓ Las especies electroactivas son: PRODAN como monómero en agua (P_w^{mon}) y PRODAN como monómero incorporado a las LUV de DOPC (P_v^{mon}). Además, ambas especies electroactivas son oxidadas al mismo potencial. Evidencia de ello es la aparición de un único pico en el voltograma.
- ✓ El proceso de agregación de PRODAN en agua posee la misma estequiometría en presencia y ausencia de LUV de DOPC.

- ✓ El mecanismo de electro-oxidación de PRODAN incorporado en la bicapa como monómero es el mismo para todas las concentraciones de trabajo de DOPC utilizadas
- ✓ Los equilibrios presentes son:



en donde n es el número de la moléculas de PRODAN que forman el agregado. La constante de partición (K_p) entre PRODAN en agua (P_W) y en la vesícula (P_V^{mon}) está dado por la ecuación (85)

$$K_p = [P_V^{\text{mon}}] / [P_W] [\text{DOPC}] \quad (85)$$

Por lo tanto, la concentración analítica (C_o) de PRODAN se puede expresar matemáticamente como:

$$C_o = [P_W^{\text{mon}}] + n [P_W^{\text{agr}}] + [P_V^{\text{mon}}] \quad (86)$$

$$C_o = [P_W] + [P_V^{\text{mon}}] \quad (87)$$

Empleando la ecuación (85) y (87) la concentración de P_V , se puede describir como:

$$[P_V^{\text{mon}}] = K_p C_o [\text{DOPC}] / (1 + K_p [\text{DOPC}]) \quad (88)$$

en tanto que, PRODAN en agua se puede escribir como:

$$[P_W] = C_o / (1 + K_p [\text{DOPC}]) \quad (89)$$

Tal como se planteo en la hipótesis del modelo, la especie agregada de PRODAN no es electroactiva, en tanto que la especie monomérica de PRODAN si lo es. Es preciso hacer notar que la especie monomérica no solo esta presente en el medio acuoso, sino también en la interfaz de las vesículas de DOPC, por lo que ambas especies monoméricas contribuirán a la ip. Además, ambas especies electroactivas son oxidadas al mismo potencial, entonces se puede expresar la ip como:

$$ip = ip^{agua} + ip^{vesicular} \quad (90)$$

Como el proceso de oxidación de PRODAN como monómero, tanto en agua como en las vesículas está gobernado por difusión (Figura 89), se puede expresar la ecuación (51) descripta en el Capítulo 2. B-6. IV. como:

$$ip = \chi_{(E)} nF (nF/RT)^{1/2} A \{ (D_w)^{1/2} [P_w^{mon}] + (D_v)^{1/2} [P_v^{mon}] \} v^{1/2} \quad (91)$$

donde D_w es el coeficiente de difusión de PRODAN en agua y D_v es el coeficiente de difusión de PRODAN incorporado a la bicapa de las vesículas de DOPC. El valor de la pendiente de dicha ecuación esta dado por:

$$pendiente = \chi_{(E)} nF (nF/RT)^{1/2} Area \{ (D_w)^{1/2} [P_w^{mon}] + (D_v)^{1/2} [P_v^{mon}] \} \quad (92)$$

Anteriormente, del estudio electroquímico de PRODAN en agua (Cap 3. A-3), se encontró la ecuación que relaciona la concentración analítica de la molécula PRODAN con la concentración electroactiva de la misma (ecuación (60)). Así reemplazando $[P_w^{mono}]$ ecuación (88) en la ecuación (60), se obtiene:

$$P_w^{mon} = A_1 - A_2 \exp[-k C_o / (1 + K_p [DOPC])] \quad (93)$$

Luego la $[P_w^{mon}]$ se reemplaza en la ecuación (92) y obtenemos la ecuación de interés que nos permite ajustar los datos experimentales con el modelo planteado.

$$\text{pendiente} = \chi_{(E)} nF (nF/RT)^{1/2} \text{Area} \{ D_w^{1/2} [A_1 - A_2 \exp [-k Co / (1 + K_p [DOPC])]] + [(D_v)^{1/2} Co / (1 + K_p [DOPC])] \} \quad (94)$$

En la Figura 91 se observa el ajuste de los datos experimentales con la ecuación (94), obtenida del modelo planteado. Del mismo se obtiene los parámetros de interés, K_p y D_v .

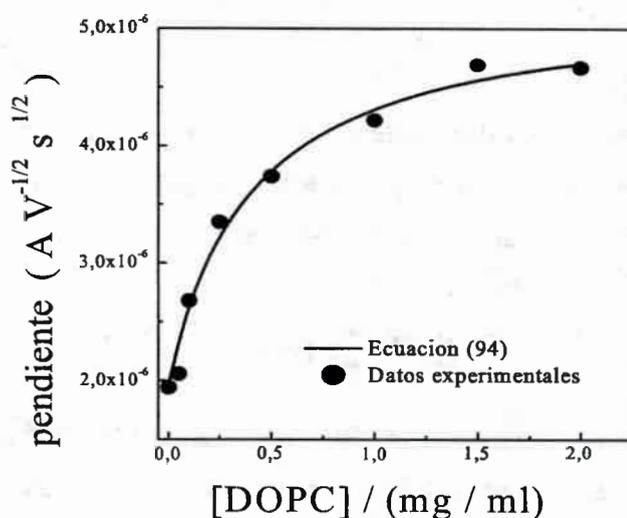


Figura 91. Variación de la pendiente en función de la [PRODAN]. [PRODAN] = 2×10^{-4} M. [ClO₄Li] = 0,1 M

El valor encontrado de K_p es de $2,5 \text{ (mg/ml)}^{-1}$. Este valor es inferior, aunque está dentro del orden de magnitud, del que se calcula por espectrofotometría (Cap. 5. A-1), que es $16,4 \text{ (mg/ml)}^{-1}$. Cabe aclarar, que la diferencia existente puede ser debido a: i) las diferentes condiciones de trabajo empleada en ambas técnicas. En las técnicas espectrofotométricas no se empleó electrolito soporte, además se trabaja a concentraciones muy inferiores a las de electroquímicas, con lo cual el equilibrio de monómero-agregado de PRODAN en agua no está presente. No fue posible trabajar a concentraciones inferiores en voltametría cíclica, porque prácticamente no se observa ninguna señal. Esto hace imposible igualar las condiciones de trabajo de las técnicas electroquímicas con las espectrofotométricas. ii) La técnica de depolarización que es la técnica empleada para determinar K_p espectrofotométricamente, posee un error más significativo que la técnica electroquímica. De esta manera y a pesar de las diferencias

encontradas en los valores de K_p , se demuestra que mediante una técnica rápida, sencilla y de bajo costo como lo es la voltametría cíclica, es posible determinar la constante de partición en las vesículas unilaminares grandes de DOPC, obteniéndose valores comparables al encontrado con técnicas espectroscópicas.

Por otro lado, el valor obtenido de D_V del ajuste es de $6,1 \times 10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ seg}^{-1}$ y no corresponde al valor obtenido para la difusión de la molécula en medio homogéneo,¹⁵⁶ que es del orden de $10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ seg}^{-1}$. Al parecer, si bien el proceso está gobernado por la difusión, no es la molécula la que difunde hacia el electrodo; sino que debe difundir la vesícula en la que está incorporada la molécula. Es decir, una vez que PRODAN se encuentra como monómero en la bicapa, la vesícula actúa como vehículo para transportarla hasta la superficie del electrodo. Es por eso que el valor obtenido de $6,1 \times 10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ seg}^{-1}$, es consistente con la difusión de la vesícula. Para confirmar lo antedicho, se determinó el D de las de LUV de DOPC sin PRODAN mediante la técnica DLS. El valor encontrado es de $5 \times 10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ seg}^{-1}$, independientemente de la concentración de DOPC que se trabaje. Estos valores encontrados por técnicas independientes son prácticamente iguales; confirmándose así las hipótesis de nuestro modelo.

En resumen, se propuso un modelo para calcular el valor de K_p que da un valor muy similar al obtenido por datos espectroscópicos. Es más, este modelo permite calcular el valor del D para las LUV de DOPC y este coincide con el obtenido a través de la técnica de DLS. Los resultados encontrados son prometedores ya que se demuestra que las técnicas electroquímicas pueden ser utilizadas como una poderosa herramienta para investigar el comportamiento de moléculas electro-activas ubicadas en sistemas organizados.

5. B-1. HC y DIA

Debido a la similitud en cuanto a su estructura química y a que las diferentes hemicianinas empleadas, HC y DIA, presentan un comportamiento similar en medio homogéneo; se cree conveniente informar conjuntamente el comportamiento de las mismas en LUV de DOPC. Además, en micelas inversas de AOT (Cap. 4. A-1. y B-1.) mediante el uso de estas hemicianinas se comprobó que el agua juega un papel

importante en la funcionalidad de las diferentes interfaces. Es por ello que se informan paralelamente los estudios realizados de ambas hemicianinas en LUV de DOPC.

a) Efecto de la variación de [DOPC]

Se realizaron estudios espectroscópicos de la molécula HC variando la concentración de DOPC. En la Figura 92 y Figura 93 se muestran los espectros de absorción y emisión de HC con el aumento en la [DOPC] respectivamente. Mientras que en la Figura 94 se muestra los corrimientos de los máximos de emisión de HC al incrementar la [DOPC].

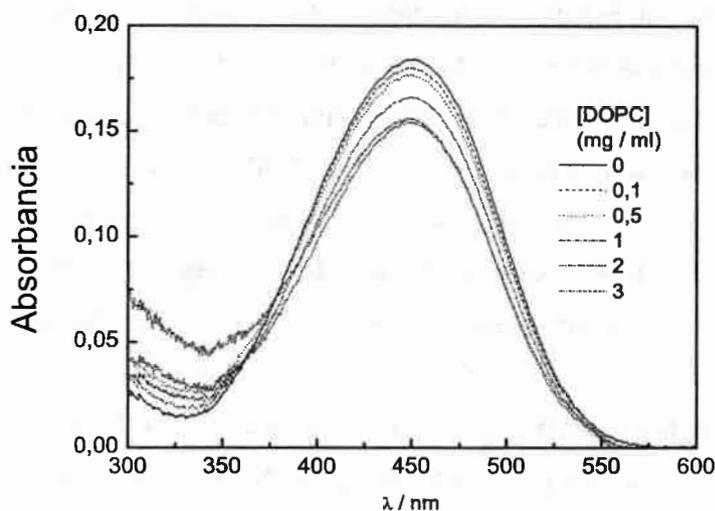


Figura 92. Espectros de absorción de HC variando [DOPC]. [HC] = 1×10^{-5} M.

Los resultados muestran que prácticamente no hay variación (2 nm) en los máximos de absorción de HC al aumentar [DOPC]. Mientras que, las bandas de emisión sufren un corrimiento hipsocrómico hasta una [DOPC] $\approx 0,5$ mg/mL de 23 nm aproximadamente (Figura 94), además se observa un marcado aumento en la intensidad de las bandas (Figura 95). De los estudios en medio homogéneo (Cap. 3. D-1), un corrimiento hipsocrómico en los máximos de emisión indican que la molécula está sensando un entorno menos polar y con mayor capacidad de dar electrones (β alto).

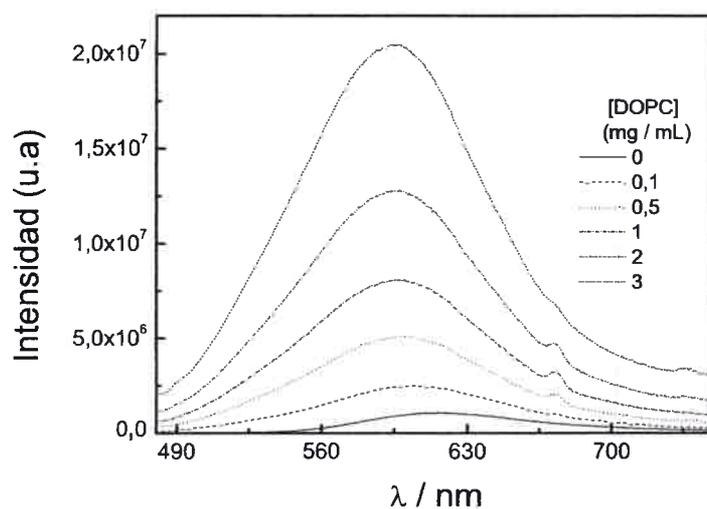


Figura 93. Espectros de emisión de HC variando [DOPC]. [HC] = 1×10^{-5} M. $\lambda_{exc} = 450$ nm.

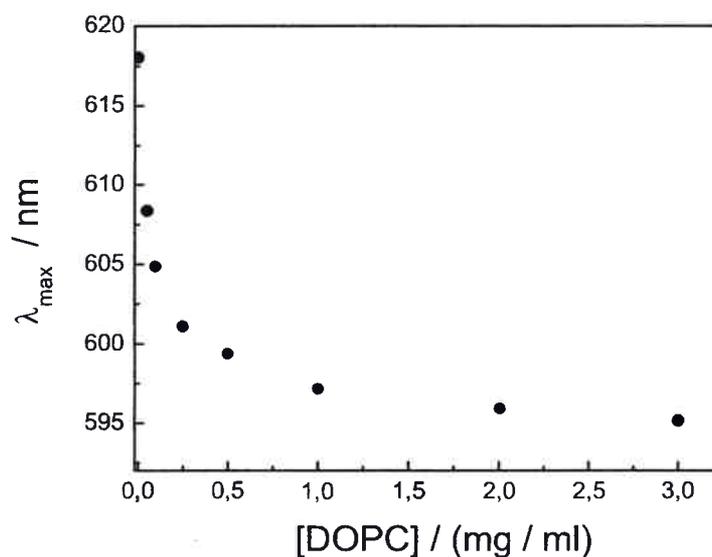


Figura 94. Variación del máximo de emisión de HC variando [DOPC]. [HC] = 1×10^{-5} M.

Es decir, dichos corrimientos podrían indicar la existencia de una partición entre el agua y la interfaz de las vesículas. Estos corrimientos no fueron observados en DIA dado que posee una cadena hidrocarbónica más larga que HC y no es soluble en agua. DIA es soluble en las vesículas solo a una [DOPC] > 0,01 mg/mL. Bajo estas

condiciones experimentales los espectros de absorción y emisión de DIA no muestran corrimientos al aumentar la concentración de DOPC. Esto significaría que DIA ya está incorporada en la bicapa a $[DOPC] > 0,01$ mg/mL, ubicándose en un solo lugar.

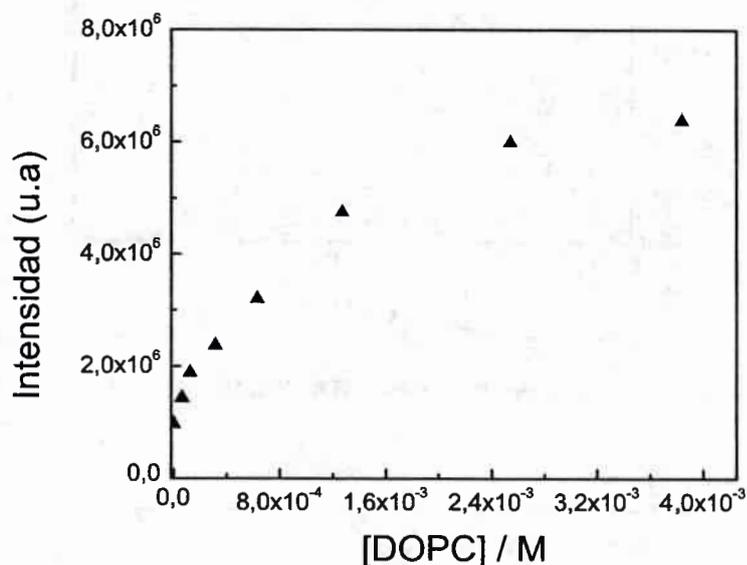


Figura 95. Variación de la intensidad máxima de emisión de HC al variar $[DOPC]$. $\lambda_{emi} = 500$ nm. $[HC] = 1 \times 10^{-5}$ M.

Los resultados obtenidos en medio homogéneo (Tabla 10) ayudan a entender los corrimientos espectrales que HC sensa en las LUV de DOPC. Un corrimiento hipsocrómico (Figura 94) en las bandas de emisión al aumentar la $[DOPC]$, indicarían que HC se encuentra en un entorno menos polar y con mayor β . Esto es posible si la molécula se incorpora a la bicapa y se localiza en un entorno rico en electrones, es decir próximo a los grupos fosfato de DOPC. Así, HC al incorporarse en la bicapa, sensa un microentorno menos polar que el agua y capaz de donar electrones.

b) Determinación de la constante de partición (K_p) de HC en DOPC.

Tal cual se mencionó anteriormente HC se incorpora desde el agua a la bicapa, es decir sufre un proceso de partición.



Análogo a lo realizado con molécula PRODAN en micelas inversas no acuosas (Cap. 4. C-1.) fue posible investigar el valor de la constante de partición K_p mediante los cambios en la intensidad de fluorescencia al variar la concentración de DOPC. Para ello se utiliza el modelo de la pseudo-fase,¹⁶⁹⁻¹⁷³ detallado anteriormente (Cap. 4. C-1.). Así la ecuación (80) se puede reescribir para HC como:

$$I = \frac{I_0 (\Phi_A + \Phi_U K_p [\text{DOPC}])}{(1 + K_p [\text{DOPC}])} \quad (95)$$

Donde, I es la intensidad de fluorescencia a una concentración de DOPC dada, I_0 es la intensidad de la luz incidente; Φ_A , Φ_U , son los rendimientos cuánticos de HC en agua y unida en la interfase de DOPC, respectivamente.

Mediante esta ecuación, se determinó el valor de K_p ajustando la ecuación (95) con los datos experimentales mostrados en la Figura 95 a $\lambda_{em} = 500$ nm. Se obtiene un valor de $1850 \pm 100 \text{ M}^{-1}$ o $2,35 \pm 0,13 (\text{mg/mL})^{-1}$. Es preciso notar que el valor de la constante de partición es elevado y justamente explica porque a una $[\text{DOPC}] > 0,01$ mg/mL prácticamente no se observan corrimientos en los espectros de emisión (Figura 94). A esta concentración más del 80% de la HC está en la interfase de la bicapa.

Como las moléculas pruebas podrían estar agregadas en las vesículas, se investigó dicha posibilidad comprobando si cumple la ley de Lambert y Beer. La Figura 96 muestra la variación en absorbancia de HC y DIA a una $[\text{DOPC}] = 1$ mg/mL al variar la concentración de las moléculas prueba. Se observa que, en el rango de concentración utilizado, se cumple la ley de Lambert y Beer. Para DIA, se llegó hasta una concentración de $3,5 \times 10^{-6}$ M, en tanto que, para HC se alcanzó una concentración de 2×10^{-5} M.

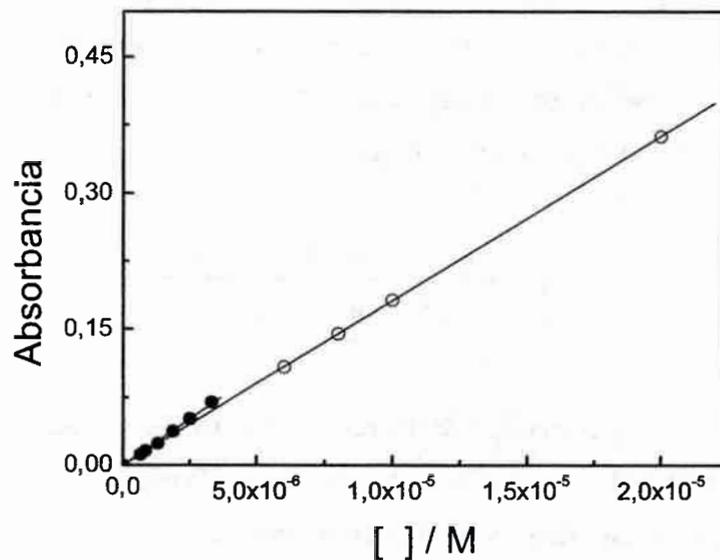


Figura 96. Ley de Lambert y Beer de: (○) HC, (●) DIA, $\lambda_{\text{abs}} = 450 \text{ nm}$ en vesículas de DOPC. $[\text{DOPC}] = 1 \text{ mg/ml}$.

Cabe recordar que en el estudio en medio homogéneo (Cap. 3. C-2 y D-1) se observó que las hemicianinas están agregadas en aquellos solventes que poseen un β bajo. Se puede considerar que en la máxima concentración usada en los trabajos, las moléculas prueba, no están agregadas en las vesículas. Posiblemente, las hemicianinas, además del efecto de concentración del surfactante, al ubicarse en un entorno capaz de donar electrones tal como lo es la interfase de la vesícula, la agregación se ve desfavorecida.

c) Estudio del corrimiento del máximo de emisión de HC y DIA al cambiar la longitud de onda de excitación (REES).

La Figura 97 muestra el corrimiento en los máximos de emisión de fluorescencia de HC en la bicapa de DOPC en función de la longitud de onda de excitación a diferentes concentraciones de DOPC. Tal como se observa en la Figura 97 al incrementar la $[\text{DOPC}]$, también se observa un incremento marcado (12 nm) en el valor de REES ($\Delta\lambda_{\text{emi}} (\lambda_{\text{emi}} (\text{exc } 510\text{nm}) - (\lambda_{\text{emi}} (\text{exc } 400\text{nm})))$) de HC hasta $[\text{DOPC}] \approx 1\text{mg/ml}$, lo cual demuestra que esta molécula, ubicada en la bicapa, está en un entorno de movilidad

restringida. Tendencias similares fueron se encontraron con la longitud de onda de excitación para DIA. Se observó que el REES incrementa su valor (8 nm) hasta una $[DOPC] = 1 \text{ mg/ml}$ y a concentraciones superiores prácticamente no varía.

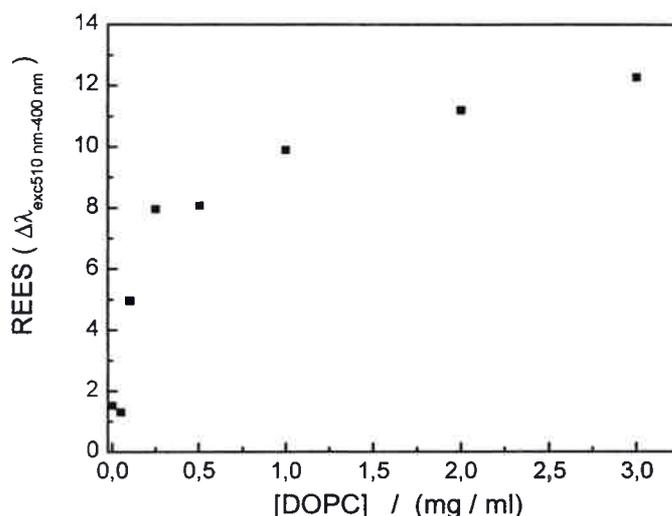


Figura 97. REES, $\Delta\lambda_{\text{emi}} (\lambda_{\text{emi}}(\text{exc } 510\text{nm}) - (\lambda_{\text{emi}}(\text{exc } 400\text{nm})))$ para HC, $[\text{HC}] = 5 \times 10^{-6} \text{ M}$.

Los resultados obtenidos en medio homogéneo (Cap. 3. C-2 y D-1) demostraron que las hemicianinas son capaces de interactuar específicamente los electrones disponibles de los solventes. Esta interacción específica puede contribuir al igual que las interacciones no específicas al fenómeno REES.¹³⁴ Luego, el valor un poco menor de REES encontrado para DIA, demuestra que dicha molécula no está incorporada en el centro de la bicapa (Región C de la Figura 98) tal como se esperaba. DIA a pesar de tener una cadena hidrocarbonada más larga que HC, se ubica en un microentorno donador de electrones (Región B de la Figura 98).

El valor de ν_{00} encontrado para DIA y HC variando la concentración de DOPC es de 19600 cm^{-1} y 19400 cm^{-1} , respectivamente. En comparación con el valor obtenido en medio homogéneo (18400 cm^{-1} aproximadamente) se observa que hay un claro corrimiento de la ν_{00} hacia una mayor energía.

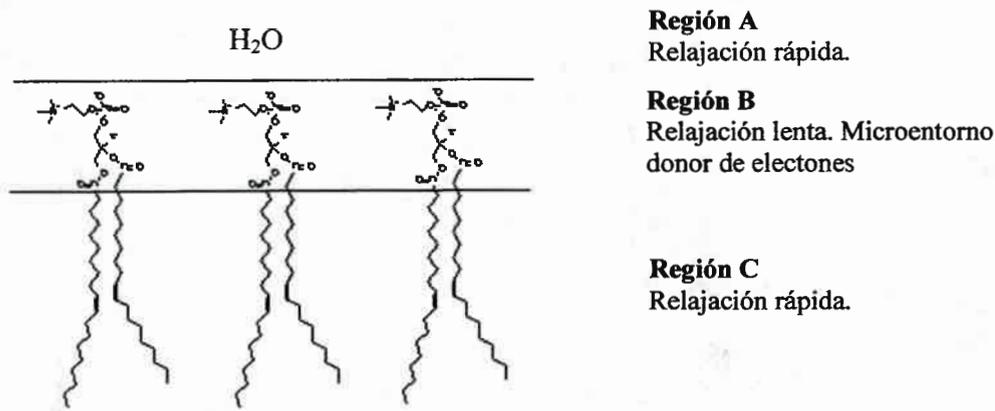


Figura 98. Diferentes regiones de la bicapa. Región A: agua libre, relajación rápida del solvente. Región B: Interfase, relajación lenta y/o esta restringida por las uniones puentes de hidrogenos existente y la capacidad donora de dar electrones del medio. Región C: Región lipofílica, rápida relajación del solvente. Adaptado de la referencia 134

El mismo no puede ser asignado a los cambios en la polaridad o a la capacidad de donar electrones del medio debido a que las ν_{00} de las hemicianinas son independientes a los parámetros π^* y β . Se piensa que el corrimiento se debe a que las hemicianinas se encuentran en un entorno más rígido y que no está siendo igualmente solvatado el estado fundamental y excitado. Así las hemicianinas se pueden utilizar para sentir un microentorno de movimiento restringido tal como lo son las interfaz de los sistemas organizados.

Al comparar el valor de la ν_{00} encontrado para DIA en micelas inversas de AOT a $W = 10$ con el obtenido en vesículas unilaminares grandes de DOPC, se encuentra que los mismos son similares. Al parecer estos valores podrían estar indicando que la restricción de movilidad que sensa DIA en la interfaz de estos sistemas organizados son similares.

d) Estudio del tiempo de vida de fluorescencia de DIA y HC en vesícula de DOPC.

Es conocido,¹⁸⁷ que el tiempo de vida de fluorescencia de HC en agua es de $11 \approx$ ps. El mismo no se corroboró en nuestro laboratorio debido a que la resolución del

equipo de medición, está en el orden de los 100 pico segundos. Sin embargo, la situación es diferente cuando las sondas se incorporan a la interfase de las LUV de DOPC, el tiempo de vida de fluorescencia aumenta y fue posible medirlo. Otros autores,¹⁸⁸ demostraron que con una hemicianina (RH421), también se obtiene un marcado aumento en el tiempo de vida de fluorescencia en solventes como cloroformo y diclorometano debido a que existe una interacción específica entre el grupo amino de la hemicianina y el solvente. Con lo cual, el aumento del tiempo de vida DIA y HC en la bicapa en comparación al agua pura, puede ser debido a una interacción con la región de las cabezas polares del fosfolípido rica en electrones (Tabla 8).

En la Figura 99 se muestra los tiempos de vida de las diferentes sondas en las vesículas de DOPC ([DOPC] = 1 mg/ml) en función de la longitud de onda de emisión.

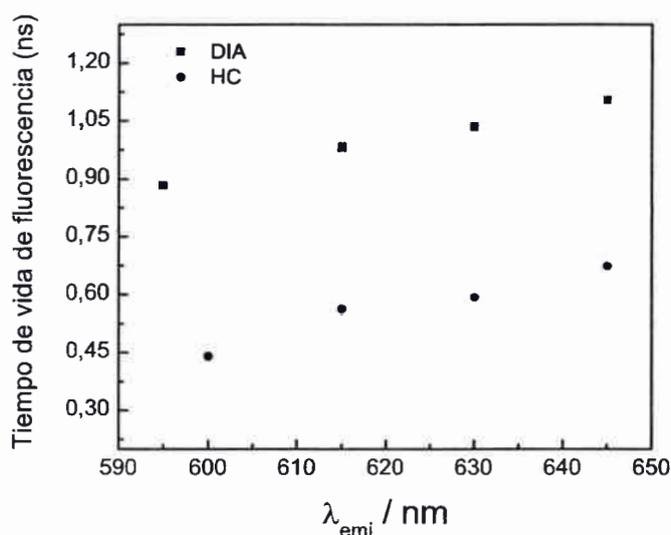


Figura 99. Tiempo de vida de fluorescencia en función de la longitud de onda de emisión para (●) HC, (■) DIA, $\lambda_{exc} = 450 \text{ nm}$ en vesículas de DOPC. [DOPC] = 1 mg/ml; [HC] = $1 \times 10^{-5} \text{ M}$; [DIA] = $1 \times 10^{-6} \text{ M}$.

La longitud de onda de excitación se fija en 450 nm para DIA y HC. Se observa que los tiempos de vida aumentan con la longitud de onda de emisión ($\lambda_{max,emi} = 600 \text{ nm}$ hasta 645 nm). Notar que siempre el incremento en la λ de emisión se realiza al rojo del máximo de la banda de emisión. La tendencia de incrementar el tiempo de vida de

fluorescencia con el aumento de la longitud de onda de emisión se detectó para fluoróforos que existen en medios de movimientos restringidos.^{135,136} Es decir, cuando la longitud de onda de emisión de las hemicianinas es menor predomina el fluoróforo no relajado. Su tiempo de vida es corto y ambas poblaciones (relajada y no relajada) están decayendo. Una lo hace a un valor de emisión menor (población no relajada) y la otra a una mayor (no observable). A mayores longitudes de onda de emisión los fluoróforos emiten desde un estado más relajado, su tiempo de vida se incrementa permitiendo una mayor reorientación del solvente.¹³⁵

e) *Depolarización de fluorescencia en estado estacionario $\langle r \rangle$ de DIA y HC en vesícula de DOPC.*

Se conoce,^{101,135,137} que un fluoróforo que vive más en el estado excitado puede pasar más tiempo rotando causando una disminución en los valores de $\langle r \rangle$. Se realizaron estudios de depolarización de DIA y HC en LUV de DOPC a una concentración fija de fosfolípido. La Figura 100 muestra la variación de los valores de $\langle r \rangle$ de DIA y HC en la bicapa lipídica de las vesículas de DOPC ($[DOPC] = 1 \text{ mg/ml}$) en función de la longitud de onda de emisión.

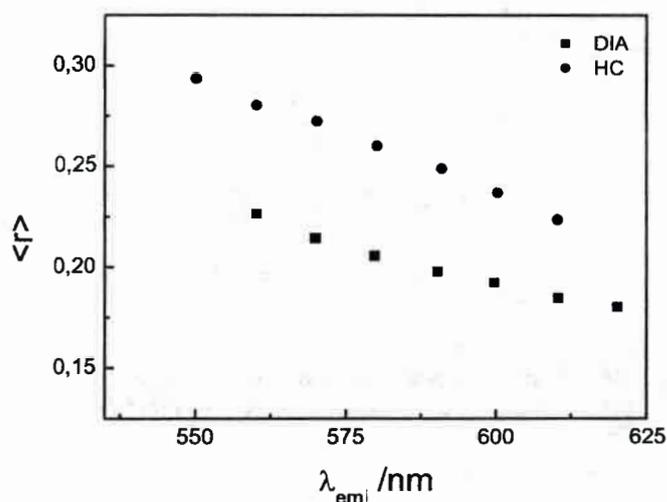


Figura 100. Polarización de fluorescencia ($\langle r \rangle$) en función de la longitud de onda de emisión para (●) HC, (■) DIA, $\lambda_{exc} = 450 \text{ nm}$ en las vesículas de DOPC. $[DOPC] = 1 \text{ mg/ml}$; $[HC] = 1 \times 10^{-5} \text{ M}$; $[DIA] = 1 \times 10^{-6} \text{ M}$.

Los resultados muestran que DIA y HC experimentan una disminución considerable en los valores de $\langle r \rangle$ al incrementar la longitud de onda de emisión. Es decir, a la longitud de onda de emisión menor, predomina el fluoróforo no relajado, el cual posee el tiempo de vida corto y se corresponde con los valores mayores de depolarización. En tanto que, a una longitud de onda mayor, predomina el fluoróforo relajado, el cual posee el tiempo de vida mayor y se corresponde con los valores menores de depolarización (Figura 99).

5. B-1. DPH

Es conocido que DPH,¹⁰¹ es una molécula hidrofóbica que se puede ubicar en la interfaz de diferentes sistemas organizados, micelas y bicapas lipídicas. Para continuar caracterizando la interfaz de las vesículas unilaminares grandes de DOPC se empleó la molécula DPH.

a) Efecto de la variación de [DPH]

En la Figura 101 se muestra los espectros de absorción al variar la concentración de DPH a una [DOPC] = 1 mg/ml. Mientras que la Figura 102 muestra la variación de la absorción al variar la concentración de DPH.

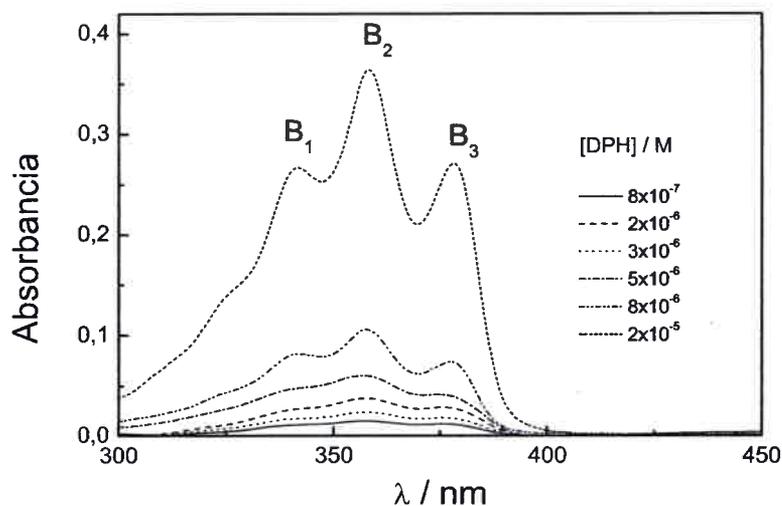


Figura 101. Espectros de absorción UV-Visible en vesícula. [DOPC] = 1 mg/ml.

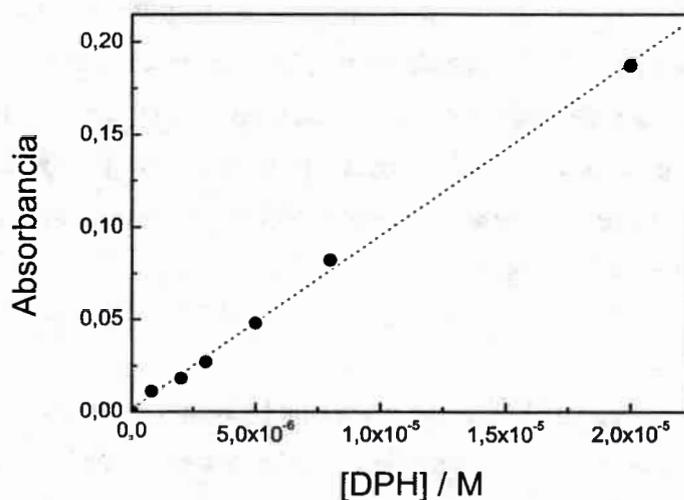


Figura 102. Efecto de concentración de DPH en vesículas de DOPC. $\lambda_{\text{Observado}} = 341 \text{ nm}$. $[\text{DOPC}] = 1 \text{ mg / ml}$.

De los espectros de absorción (Figura 101), se puede observar que no hay evidencia de la formación de agregados como así tampoco de un reparto entre el agua y la bicapa lipídica. Es decir, la misma se ubicaría en una región menos polar tal como lo es la bicapa, además se observa que dicha molécula cumple la ley de Lambert y Beer cuando se trabaja a una concentración de fosfolípido de 1 mg/ml (Figura 102).

b) Efecto de la variación de [DOPC]

Se realizaron estudios espectroscópicos de la molécula DPH variando la concentración de DOPC, a $5 \times 10^{-6} \text{ M}$. Se observa que la λ_{max} de absorción y emisión de la molécula prácticamente no varía con el aumento en la concentración de DOPC. Es conocido,¹⁰¹ que en agua la solubilidad de DPH es baja y que además el rendimiento cuántico de fluorescencia disminuye. Tal cual se puede observar, en los espectros de emisión (Figura 103) a medida que aumenta la [DOPC], la intensidad de la banda aumenta indicando una mayor solubilización de la molécula. El hecho que no se observe corrimiento de la banda de emisión con el aumento de la concentración de DOPC, indica que DPH está incorporado en la bicapa y que se ubica en un solo entorno de la misma.

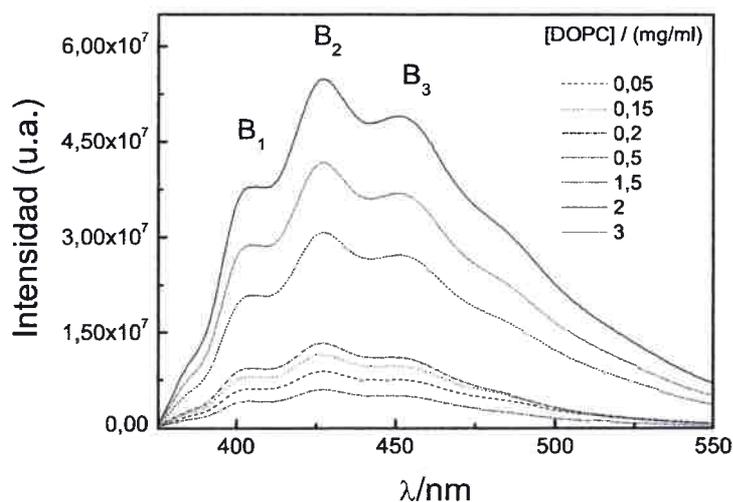


Figura 103. Espectro de emisión de DPH en vesículas de DOPC. $[DPH] = 5 \times 10^{-6} \text{ M}$. $\lambda_{\text{exc}} = 357 \text{ nm}$.

Esto se confirma mediante medidas de depolarización en estado estacionario de DPH variando la concentración de DOPC. En la Figura 104, se muestran dichos valores al variar DOPC.

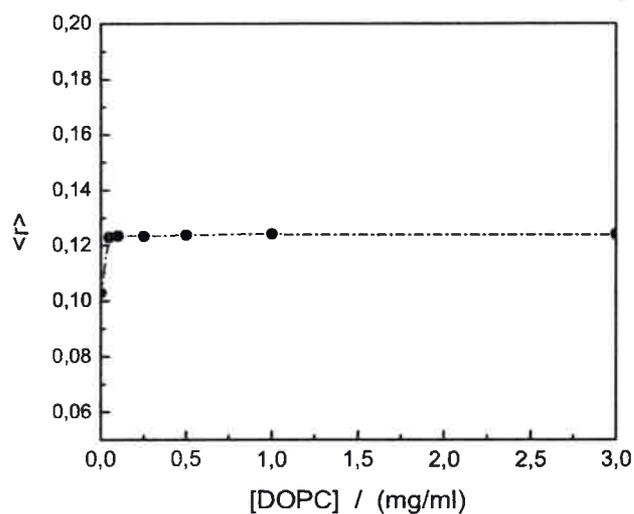


Figura 104. Anisotropía en estado estacionario $\langle r \rangle$ en función de la $[DOPC]$. $[DPH] = 5 \times 10^{-6} \text{ M}$. $\lambda_{\text{exc}} = 357 \text{ nm}$. $\lambda_{\text{emi}} = 430 \text{ nm}$.

El valor de $\langle r \rangle$ obtenido ($\langle r \rangle = 0,124$) está sugiriendo que DPH se localiza bien adentro de la bicapa (Región C de la Figura 98), alejado de la zona polar a diferencia de lo observado en las hemicininas y PRODAN.

c) *Estudio del corrimiento del máximo de emisión de DPH al cambiar la longitud de onda de excitación (REES).*

La fluidez del microentorno en donde se ubique la molécula prueba fue investigada por la técnica de REES. Se realizan espectros de fluorescencia de DPH, variando la longitud de onda de excitación (λ_{exc}). Tal como se observa en la Figura 105, DPH no sufre corrimientos en sus máximos de emisión cuando se varía λ_{exc} . La ausencia de REES es debido a que al ser una molécula poco polar, el momento dipolar no cambia apreciablemente una vez excitada y por lo tanto DPH al incorporarse a la bicapa lipídica siempre emite de un entorno relajado. Posiblemente DPH estaría emitiendo desde zona fluida de la interfaz, es decir en el centro de la bicapa alejado de la zona polar.

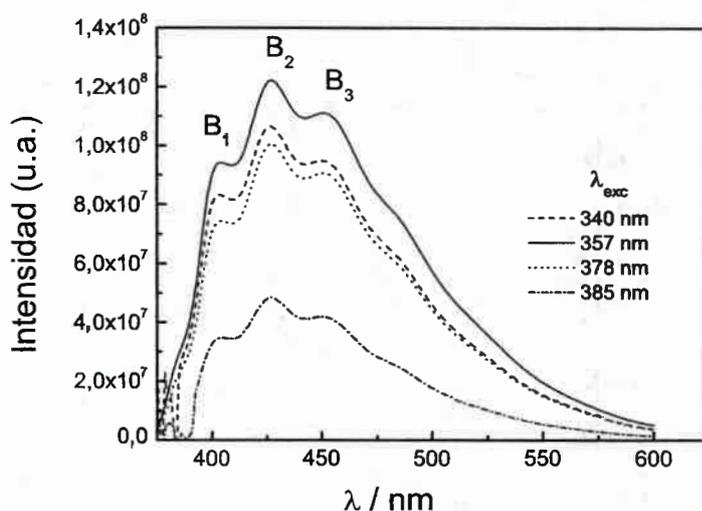


Figura 105. Espectros de emisión de DPH a distintas λ de excitación. [DOPC] = 1 mg/ml [DPH] = 5×10^{-6} M

d) Estudio de tiempos de vida de DPH en vesícula de DOPC.

Tal como era de esperarse el tiempo de vida de fluorescencia (τ) es independiente de la concentración de DOPC. Los ajustes obtenidos de las medidas realizadas mediante SPC muestran un decaimiento biexponencial, demostrando que esta molécula posee niveles de energía (S_1 y S_2) próximos.¹⁸⁹⁻¹⁹¹ Sin embargo, tales decaimientos contienen una componente principal (más del 95 %) de un valor de 8,1 ns, mientras que la otra componente tiene un valor de 1,3 ns. Ambas componentes muestran independencia al variar la concentración de DOPC y se podría pensarse que el tiempo de vida obtenido confirma la ubicación de DPH dentro de la bicapa lipídica de la vesícula, sensando un entorno fluido.

Conclusiones

En este trabajo de tesis se caracterizaron las diferentes propiedades de micelas inversas de AOT y de vesículas unilaminares grandes de DOPC. Para caracterizar la interfaz de dichos sistemas organizados, se usaron moléculas pruebas tales como: PRODAN, DPH, HC y DIA empleando técnicas de absorción, emisión, depolarización, espectroscópicas resuelta en el tiempo, técnicas electroanalíticas y dispersión dinámica de luz. Para poder comprender el comportamiento de dichas moléculas pruebas se investigó y caracterizó estas moléculas en medio homogéneo. De los estudios realizados en este trabajo de tesis podemos concluir que:

Estudio en medio homogéneo.

En el estudio en medio homogéneo se demuestra que PRODAN sirve como sensor de micropolaridad, correlacionando con el parámetro $E_{T(30)}$ y la misma se encuentra agregada en agua. Se caracterizó el agregado determinando su tiempo de vida y, de las medidas de anisotropía en estado estacionario, se pudo determinar el volumen de la unidad rotante del mismo mostrando que es mayor al de un dímero.

Del estudio electroquímico en agua se concluye que PRODAN presenta un pico de oxidación centrado a 0,32 volt y que el proceso de oxidación de la molécula es gobernado por la difusión de la especie activa. La especie agregada de PRODAN que se encuentra en el agua no es electroactiva, en el rango de potencial estudiado.

El estudio en medio homogéneo demostró que DPH no solo correlaciona con el parámetro π^* sino que, al igual que ciertos carotenos correlaciona con el parámetro β debido a los dobles enlaces conjugados.

De los estudios en medio homogéneo de DIA y HC, hemicianinas catiónicas, se concluye que además de interactuar con el medio a través del parámetro π^* (interacción no específica), lo hace con el parámetro β , (interacción específica) posiblemente debido a la carga (+) que la misma presenta. La carga (+) localizada en el anillo piridinio (E.F) esta mejor solvatada (corrimiento batocrómico), que cuando se ubica en el nitrógeno de la dialquilanilina (E.E) (corrimiento hipsocrómico). La ν_{00} se mantiene constante independientemente de los parámetros del solvente π^* y β utilizados, indicando corrimientos solvatocrómicos similares y opuestos en las bandas de absorción y emisión. HC, al igual que DIA, podría estar agregada en aquellos solventes que poseen un valor bajo de β .

A $[HC] > 1 \times 10^{-5}$ M la molécula se encuentra agregada en benceno, mientras que a una $[HC] \leq 3 \times 10^{-6}$ M no hay evidencia de la formación del agregado. Se determinó el tiempo de vida de fluorescencia del monómero ($\tau = 0,20$ ns) y del agregado ($\tau = 1,20$ ns) en benceno.

Estudio en micelas inversas de AOT

Para DIA y HC, tanto por absorción y como por emisión se observa un corrimiento hipsocrómico al aumentar $[AOT]$ a $W = 0$ los mismos indicarían que en E.F. hay una posible interacción con AOT sensando un entorno polar, mientras que en el E.E. estas hemicianinas sensan entornos de menor polaridad y con mayor capacidad de dar electrones, se puede pensar que la carga (+) se ubica cerca del grupo carbonilo de AOT.

A diferencia de $W = 0$, los corrimientos de los espectros de emisión de DIA y HC a $W = 10$ son batocrómicos al aumentar $[AOT]$. Se cree que el agua penetra hasta proximidades del grupo carbonilo y las moléculas, ubicada en la interfaz micelar, sensan un entorno más polar y de menor capacidad de dar electrones.

HC a $W = 0$ y a una $[AOT] = 5 \times 10^{-3}$ M, se observa un decaimiento biexponencial independiente de la λ_{em} . El tiempo de vida más corto le fue asignado a la especie de HC que interactúa con AOT, en tanto que el de vida más largo ($\tau_2 = 1,2$ ns) es comparable con el tiempo de vida del agregado de HC-HC. En tanto que, para $[AOT] = 0,2$ M el decaimiento es monoexponencial y dependiente de la λ_{em} , indicando

que la especie de HC se incorpora a la interfaz de la micela y emite desde un entorno restringido de movimiento. A $W = 10$ y para ambas concentraciones de [AOT], el decaimiento es monoexponencial e independiente de la λ_{em} , el valor encontrado es de 0,3 ns e indica que la molécula, ubicada en la interfaz micelar, sensa un entorno más fluido.

La ν_{00} a $W = 0$ aumenta con el incremento de la [AOT]. Esto puede deberse a que la carga (+) esta interaccionando con los grupos sulfonatos de AOT. Por el contrario a $W = 10$, la ν_{00} permanece constante y el valor encontrado para DIA es de 19400 cm^{-1} en tanto que el valor encontrado para HC es de 19620 cm^{-1} . Los valores a $W = 10$ se aproximan a los valores encontrado en medio homogéneo y parece indicar que, debido a la competencia del agua por solvatar las cabezas polares de AOT, debilita la interacción electrostática de las hemicianinas con la cabeza polar de AOT, vale la pena aclarar que debilita la interacción pero no logra romperla.

En micelas inversas no acuosas heptano/AOT/DMF y DMA existe una partición entre el solvente orgánico externo y la interfaz micelar. Dicha partición ocurre en la E.F. y el valor obtenido de K_p determinado tanto por absorción como por emisión son prácticamente constante y explican los corrimientos en los máximos de absorción y emisión respectivamente. Fue posible además, correlacionar la micropolaridad de la interfaz micelar con el parámetro $E_{T(30)}$. La micropolaridad que sensa PRODAN incorporado a la interfaz en micelas inversas no acuosas es semejante a benzonitrilo o acetofenona.

Estudio en vesículas unilaminares grandes de DOPC.

Se determinó espectrofotométricamente la incorporación de la molécula PRODAN, desde el agua hasta la interfaz de las vesículas, determinando la constante de partición (K_p) y sensando microentornos de diferente polaridad en la bicapa.

Los estudios de REES al variar la concentración de DOPC permiten diferenciar: i) partición entre el agua y la bicapa lipídica a concentraciones inferiores de 0,15 mg/ml ii) relajación de la molécula en la bicapa lipídica a concentraciones superiores de 1 mg/ml.

Se planteó un modelo electroquímico para poder determinar la K_p entre el agua y la interfaz de la bicapa de DOPC y compararla con el obtenido por espectrofotometría. El mismo considera a la molécula PRODAN monomérica como electroactiva, el agregado

de PRODAN como no electroactivo y el mismo mecanismo de electro-oxidación para PRODAN incorporado en la bicapa. El valor obtenido de K_p es de 8,84 mg/ml y comparable con los obtenidos con las medidas espectrofotométricas.

Al igual que lo observado en agua, el proceso de oxidación de la molécula en la bicapa es gobernado por la difusión del sistema. Se determinó el coeficiente de difusión de la vesícula y se comparó con el obtenido por la técnica de dispersión de luz dinámica. Los valores obtenidos por técnicas independientes son prácticamente iguales ($6,1 \times 10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ seg}^{-1}$).

DIA al igual que DPH posee una fuerte asociación a la bicapa lipídica de DOPC en tanto que HC posee un proceso de partición entre el agua y la interfase de la vesícula. La constante de partición obtenida mediante medidas de fluorescencia es 1850 M^{-1} .

Mediante la ν_{00} se determinó los distintos entornos que sensa las hemicianinas. HC sensa un entorno mas rígido que DIA. Posiblemente, debido a la interacción con los grupos fosfatos de DOPC.

Para las hemicianinas los tiempos de vida aumentan al incrementar la longitud de onda de emisión, lo que indica que las hemicianinas se ubican en sitios de movimiento restringido.

Los valores de depolarización ($\langle r \rangle$) de DIA y HC, varían al variar la longitud de onda de emisión con lo cual indican la diferente reorganización del solvente alrededor del fluoroforo.

DPH se incorpora a la bicapa lipídica ubicándose en una interfase fluida $\langle r \rangle \approx 0,12$ y se encontró que el tiempo de vida es biexponencial con una componente mayor de 8,1 ns. El tiempo de vida al incrementar la longitud de onda de emisión permanece constante afirmando la ubicación de la molécula en una región de la bicapa fluida, posiblemente en las colas lipofílicas de las vesículas.

DPH no sufre REES posiblemente debido a que su momento dipolar no cambia apreciablemente cuando esta en el estado excitado.

Abreviaturas

ν_{abs} Frecuencia del máximo de absorción, en cm^{-1} .

ν_{eml} Frecuencia del máximo de emisión, en cm^{-1} .

ν_{stokes} Corrimiento de stokes.

ν_{00} Frecuencia de la banda cero – cero.

π^* Escala empírica que mide polaridad/polarizabilidad del solvente.

β Escala empírica que mide la capacidad del solvente para aceptar puente de hidrógeno y/o de donar electrones.

α Escala empírica que mide la capacidad de donar hidrógeno en la formación del puente de hidrógeno.

$E_{T(30)}$ Parámetro de polaridad de solvente, basado en la energía de la transición de la banda de absorción de mayor longitud de onda de la betaína N-fenóxido de piridinio.

MLV Vesículas multilaminares grandes.

SUV Vesículas unilaminares pequeñas.

LUV Vesículas unilaminares grandes.

DLPC Di laureil fosfatidil colina.

DPPC Di palmitoil fosfatidil colina.

DMPC Di mirisil – L – α - posfatidil colina.

BHDC Bencil-dimetil-n-hexadecilamonio.

SPC Conteo de fotón único (single photon counting)

REES Cambio en los espectros de emisión al excitar la molécula al rojo del máximo de la banda de absorción (Red-edge excitation shifts).

DLC Dispersión de luz dinámica.

χ^2 Suma de las desviaciones standares.

η Viscosidad del solvente.

τ Tiempo de vida de fluorescencia.

R_H Radio hidrodinámico

<r> Anisotropía en estado estacionario.

D Constante dieléctrica del solvente.

T_T Temperatura de Transición

E.F Estado Fundamental de la molécula.

E.E Estado Excitado de la molécula.

NBD-PE 1,2-dipalmitoil-sn-glycero-7-nitrobenzen-2-oxa-1,3-diazol-4-yl-3-fosfoetanolamino

i(t) Intensidad de luz dispersada en el tiempo.

ψ Tiempo de espera entre dos lecturas consecutivas.

D Coeficiente de difusión

q Vector de onda.

C Cuadrado de la media de la intensidad de la luz dispersada.



Anexo I

Fruto de este trabajo de tesis se ha logrado participar en diferentes congresos nacionales e internacionales, obtener diferentes becas de reconocimiento nacional e internacional (CONICET, American Chemical Society y Universidad de Vigo), participar en actividades de divulgación científica y proyectos de investigación, tareas de gestión y docencia en el Departamento de Química. Además, los siguientes artículos que se detallan a continuación han sido publicados en revista de reconocimiento internacional con referato.

- 1) *Electrochemistry in Confined Environments: Characterization of Large Unilamellar Vesicles using PRODAN as the Electroactive Molecular Probe.* F. Moyano, P.G. Molina, J. J. Silber, Leonides Sereno, N. M. Correa. Enviado a publicar.
- 2) *An Example of How to Use AOT Reverse Micelles Interfaces to Control a photoinduced Intramolecular Charge Transfer Process.* Mercedes Novaira, Fernando Moyano, M. Alicia Biasutti, Juana J. Silber, N. Mariano Correa. *Langmuir* 24, 4637-4646. (2008).
- 3) *On the Investigation of the Bilayer of Large Unilamellar Vesicles Using Different Cationic and Nonionic Optical Probes. A Wavelength – Selective Fluorescence Approach.* Fernando Moyano, Juana J. Silber, N. Mariano. Correa. *J. of Colloid and Interface Science* 317, 332–345. (2008).
- 4) *New Insights on the Behavior of Prodan in Homogeneous Media and in Large Unilamellar Vesicles.* F.Moyano, M.A. Biasutti, J.J. Silber, N.M. Correa. *J. Phys. Chem. B.* 110, 11838-11846. (2006).

Manuscrito en preparación.

- 1) *On the Characterization of Multifunctional Reverse Micelles Interfaces Using Hemicyanines as Molecular Probes. Part 1: Effect of the hemicyanine's Structure.* F. Moyano, S.S. Quintana, J. J. Silber, R. D. Falcone, N. M. Correa.
- 2) *On the Characterization of Multifunctional Reverse Micelles Interfaces Using Hemicyanines as Molecular Probes. Part 2: Effect of the Surfactant.* S.S. Quintana, F. Moyano, J. J. Silber, R. D. Falcone, N. M. Correa.

Todo lo mencionado anteriormente reviste de un valor incalculable en mi formación personal, académica e iniciación científica, es por ello que no puedo dejar de agradecer a todas aquellas personas que contribuyeron y contribuyen de alguna manera en este logro personal.

▣ Referencias ▣

1. D. Myers, *Surfactant Science and Technology*, 2nd Ed., VCH Publishers, Inc. (1992).
2. F. MacRitchie, *Chemistry at Interfaces*, Academic Press, Inc. (1990).
3. A. Ben- Naim, *Water and aqueous solutions-Introduction to a molecular Theory*, Plenum Press, London (1975).
4. M. Klose; J. I. Naberuchin, *Wasswer-Struktur und dynamik*, Akademie-Verlag, Berlín (1986).
5. W. A. P. Luck, *Pure & Appl. Chem.* 59, 1215 (1987).
6. M. C. R. Symons, *Chem. Soc. Rev.* 12, 1 (1983).
7. P. Huyskens, *J. Mol. Struct.* 100, 403 (1983).
8. K. C. James, *Education in Chemistry*, 9, 220 (1972).
9. G. C. Pimentel, *Chemistry-An Experimental Science*, Freeman, San Francisco (1963).
10. C. Reichardt, en *Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry*. 2nd Ed. VCH, Germany (1990).
11. E. A. Moelwyn-Hughes, en *Physical Chemistry*, Pergamon Press, 2nd Ed. (1961).
12. N. H. March; M. P. Tosi, en *Coulomb Liquids*. Academic Press, New York (1984).
13. J. H. Mahanty; B. W. Ninham, en *Dispersion Forces*, Academic Press. New York (1977).
14. R. Cattana; J. J. Silber; J. Anunziata, *Can. J. Chem.* 70, 2677 (1992).
15. M. J. Kamlet; R. W. Taft, *J. Org. Chem.* 47, 1734 (1982).
16. D. Margetic; M. Eckert-Masic; Z. B. Masick, *J. Mol. Struct. Theochem.* 277, 161 (1992).
17. a) R. Foster, *Organic Charge Transfer Complexes*. Academic Press, London (1969), b) R. Foster (ed.), *Molecular Association*, Vol. 1, Academic Press, London (1975), c) R. Foster (ed.), *Molecular Association*, Vol. 2, Academic Press, London (1979).
18. M. A. Biasutti, *Tesis Doctoral*, Universidad Nacional de Río Cuarto (1993).
19. J. Israelachvili, en *Intermolecular & Surfaces Forces*, Academic Press, New York, 2nd Ed. (1991).
20. P. L. Huyskens; W. A. Luck; T. Zeegers-Huyskens, (Eds.), en *Intermolecular Forces*, Springer-Verlag (1991).
21. N. Muller, *Acc. Chem. Res.* 3, 23 (1990).
22. K. Shinoda, *J. Phys. Chem.* 89, 2429 (1985).
23. M. Bourrel, R. S. Schechter, en *Microemulsions and related systems. Formulation, solvency, and physical properties*. Surfactant science series. Volumen 30. Marcel Dekker, Inc., Ney York and Basel. (1988).

-
24. J.H. Fendler, E.J. Fendler, en *Catalysis in Micellar and Macromolecular Systems*, Academic Press, New York, (1975).
 25. A.D. Bangham, M.W. Hill, y N.G.A. Miller, en *Methods in Membrane Biology*, editado por Korn, E.D.; Plenum Press, New York, (1974).
 26. P.L. Luisi, M. Giomini, M.P. Pileni, B.H. Robinson, *Biochimica et Biophysica Acta*. 947, 209 (1988).
 27. F. M. Menger; J. S. Keiper, *Angew. Che. Int. Ed.* 39, 1906 (2000).
 28. J. H. Fendler, en *Membrane Mimetic Chemistry*, Wiley-Interscience, N.Y. New York (1982).
 29. D. F. Evans; H. Wennerström, en *The Colloidal Domain Where Physics, Chemistry, Biology, and Technology Meet*, VCH (1994).
 30. R.Gennis, *Biomembranes, molecular structures and functions*, Chapter 2. Spinger, New York, (1989).
 31. R.R.C. New, *Liposomes. A practical approach*, Oxford University Press Inc., New York, (1997).
 32. D.D. Lasic, *Liposomes: from physics to applications*, Elsevier Science B.V., Amsterdam, (1995).
 33. A. Pantos, D. Tsiourvas, C. M. Paleos, G. Nounesis. *Langmuir*. 21, 6696 (2005).
 34. W. F. Daamen, P.J. Geutjes, H.T. B. Van Moerkerk, S.T. M. Nielsen, R.G. Wismans, T. Hofmans, L.P.W.J. Van Den Heuvel, A.M.A. Pistorius, J.H. Veerkamp, J.C. M. Van Hest, Y.H. Van Kuppevelt. *Adv. Mater.* 19, 673 (2007).
 35. M.J.; Shick, en *Nonionic Surfactants*, Marcel Dekker, New York, (1987).
 36. D. Langevin, *Ann. Rev. Phys. Chem.* 43, 341 (1992).
 37. O. A. El Seoud, *Reversed Micelles and water-in-oil microemulsions: formation and some relevant properties*, en: W. L. Hinze (Ed.), *Organized Assemblies in Chemical Analysis*, vol.1, JAI Press Inc. London (1994).
 38. M.P. Pileni, editor de *Structure and Reactivity in Reversed Micelles*, Elsevier, Amsterdam, (1989).
 39. M. Camardo; M. D'Angelo; S. Mannaioli; G. Onori; A. Santucci, *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspets.* 119, 183 (1996).
 40. F. Mantegazza; V. Degiorgio; M. E. Giardini; A. L. Price; D. C. Steyler; B. H. Robinson, *Langmuir*. 14, 1 (1998).
 41. E. Bardez; N. Cao Vy; Th. Zemb, *Langmuir*. 11, 3374 (1995).
 42. F. Caboi; G. Capuzzi; P. Baglioni; M. Monduzzi, *J. Phys. Chem. B.* 101, 10205 (1997).
-

-
43. N. M. Correa, *Tesis Doctoral*, Universidad Nacional de Río Cuarto (1997).
 44. J. J. Silber; A. Biasutti; E. Abuin; E. Lissi, *Adv. Colloid Interface Sci.* 82, 189 (1999).
 45. C.J. O'Connor, H.F. Eicke, G.D. Parfitt Eds., en: *Interfacial Phenomena in Apolar Media*, Surfactant Sci. Ser. Vol. 21, Marcel Dekker, New York (1987).
 46. M. Zulauf; H.F. Eicke, *J. Phys. Chem.* 83, 480 (1979).
 47. M. Ueda; Z.A. Schelly, *Langmuir.* 4, 653 (1988).
 48. T.K. Da; A. Maitra, *Adv. Colloid. Interface Sci.* 59, 95 (1995).
 49. P.D. Fletcher, M.F. Galal, B.H. Robinson, *J. Chem. Soc. Faraday Trans I.* 80, 3307 (1984).
 50. V. Arcoleo; F. Aliotta; M. Goffredi; G. La Manna; V.T. Liveri, *Mat. Sci. Eng. C5*, 47 (1997).
 51. R. E Riter, J.R. Kimmel, E.P. Undiks, N.E. Levinger, *J. Phys. Chem. B.* 101, 8292 (1997).
 52. S. Ray and S. P. Moulik, *Langmuir.* 10, 2511 (1994).
 53. C.A.T. Laia, P. Lopez-Cornejo, S.M.B. Costa, J. d'Oliveira, J.M.G. Martinho, *Langmuir.* 14, 3531 (1998).
 54. Y. A. Shchipunov, E. V. Shumilina, *Materials Science and Engineering: C 3*, 43 (1995).
 55. R. D. Falcone; N. M. Correa; M. A. Biasutti; J. J. Silber, *Langmuir.* 16, 3070 (2000).
 56. K. Mukherjee, D. C. Mukherjee and S. P. Moulik, *J. Phys. Chem.* 98, 4713 (1994).
 57. D. G. Hayes; E. Gulari, *Langmuir.* 11, 4695 (1995).
 58. C. G. Elles and N. E. Levinger, *Chem. Phys. Letters.* 317, 624 (2000).
 59. R. D. Falcone, M. A. Biasutti, N. M. Correa, J. J. Silber, E. Lissi, E. Abuin, XIV Simposio Nacional de Química Orgánica (SINAQO). Rosario. Noviembre (2003).
 60. L. P. Novaki, N. M. Correa, J. J. Silber, and O. A. El Seoud, *Langmuir.* 16, 5573 (2000).
 61. O. A. El Seoud, N. M. Correa, and L. P. Novaki, *Langmuir.* 17, 1847 (2001).
 62. A. Martino, E.W. Kaler, *Langmuir.* 11, 779 (1995).
 63. L. P. Luisi, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 24, 439 (1985).
 64. D. Myers, *Surfactant Science and Technology*, 2nd Ed., VCH Publishers, Inc. (1992).
 65. F. MacRitchie, *Chemistry at Interfaces*, Academic Press, Inc. (1990).
 66. N. M. Correa, E. N. Durantini and J. J. Silber. *J. Org. Chem.* 64, 5757, (1999).
 67. N.M. Correa, E.N. Durantini, J.J. Silber, *J. Org. Chem.* 65, 6427 (2000).
 68. N.M. Correa, H. D. Zorzan, M. Chiarini, G. Cerichelli. *J. Org. Chem.* 69, 8224 (2004).
 69. N.M. Correa, H. D. Zorzan, L. D'Anteo, E. Lasta, M. Chiarini G. Cerichelli. *J. Org. Chem.* 69, 8231 (2004).
 70. N.M. Correa, E.N. Durantini, J.J. Silber. *J. Phys. Org. Chem.* 18, 121 (2005).
 71. N.M. Correa, E. N. Durantini, J. J. Silber. *J. Phys. Org. Chem.* 19, 805 (2006).
-

-
72. J. N. Israelachvili, D. J. Mitchell, B. W. Ninham, *J. Chem. Soc. Far. Trans. II.* 72, 1525 (1976).
 73. D.J. Mitchell, B.W. Ninham, *J. Chem. Soc. Faraday Trans II.* 77, 601 (1981).
 74. C. Tanford, *J. Phys. Chem.* 76, 3020 (1972).
 75. E. Sein, J.R. Laane, J. Buchert, S. Kielich, *J. Colloid interface Sci.* 72, 363 (1979).
 76. R.A. Day, B.H. Robinson, J.H.R. Clarke, J.V. Doherty, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.1;* 75, 132 (1979).
 77. S.S. Atik, J.K. Thomas, *J. Am. Chem. Soc.* 103, 3543 (1981).
 78. N.J. Bridge, P.D.I. Fletcher, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1;* 79, 2161 (1983).
 79. J. Lang, A. Jada, A. Malliaris, *J. Phys. Chem.* 92, 1946 (1988).
 80. H.-F. Eicke, y J. Rehak, *Helv. Chim. Acta.* 59, 2883 (1976).
 81. J. Peyrelasse, C. Boned, *J. Phys. Chem.* 89, 370 (1985).
 82. M. P. Pileni, *J. Phys. Chem.* 97, 6961 (1993).
 83. a) O.A. El Seoud, L.T. Okano, L.P. Novaki, G.K. Barlow, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* 100, 1147 (1996). b) L.P. Novaki, O.A. El Seoud, J.C.D. Lopes, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* 101, 1928 (1997). c) L.P. Novaki, O.A. El Seoud, *J. Colloid Interface Sci.* 202, 391 (1998).
 84. J. Faeder, B. M. Ladanyi, *J. Phys. Chem. B.* 104 (5), 1033 (2000).
 85. Q. Li; S. Weng; J. Wu; N. Zhou, *J. Phys. Chem. B.* 102, 3168 (1998).
 86. A. Goto; H. Yoshioka; M. Manabe; R. Goto, *Langmuir.* 11, 4873 (1995).
 87. S. Das; A. Datta; K. Bhattacharyya, *J. Phys. Chem. A.* 101, 3299 (1997).
 88. P. Baglioni; H. Nakamura; L. Kevan, *J. Phys. Chem.* 95, 3856 (1991).
 89. C. Boned; J. Peyrelasse; M. Moha-Ouchane, *J. Phys. Chem.* 90, 634 (1986).
 90. G. P. Onori; A. Santucci, *J. Phys. Chem.* 97, 5430 (1993).
 91. A. D'Aprano; A. Lizzio; V. Turco Liveri; F. Aliotta; C. Vasi; P. Migliardo, *J. Phys. Chem.* 92, 4436 (1988).
 92. N.M. Correa, M.A. Biasutti and J.J. Silber. *J. Colloid. Interface. Sci.* 172, 71 (1995).
 93. O. El Seoud, N.M. Correa, L.P. Novaki. *Langmuir.* 17(6), 1847 (2001).
 94. B. Baruah, J. Roden, M. Sedgwick, N. M. Correa, D. C. Crans N. E. Levinger. *J. Am. Chem. Soc.* 128(39), 12758 (2006).
 95. R. K. Murray , *Bioquímica de Harper*, Chapter 16. 22° Ed., El Manual Moderno, México, (1992).
 96. P. J. Davis, B.D. Fleming, K.P. Coolbear, K.M.W. Keough. *Biochemistry.* 7, 4466 (1981).
 97. P.R. Bergethon, *The Physical Basis of Biochemistry: The Foundations of Molecular Biophysics*, Ed. Springer Verlag; (1998).
-

-
98. W. Dowhan. *Annual Review of Biochemistry*. 66, 199 (1997).
99. D.P. Tieleman, M. Siewert-Jan. *J. AM. CHEM. SOC.* 128, 12462 (2006)
100. G. Battaglia, A.J. Ryan, S. Tomas. *Langmuir*. 22, 4910 (2006).
101. J. R. Lakowicz, en: *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 2nd Ed., Kluwer Academic, New York, New York (1999).
102. J. A. Barltrop; J. D. Coyle, *Principles of Photochemistry*; Wiley & Sons: New York, (1978).
103. A.E. Lutskii, V.V. Prezhdo, L.I. Degtereva, V.G. Gordienko, *Usp. Khim.* 51, 1398 (1982).
104. C. Reichardt, *Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry*. 2nd Ed. VCH, Germany (1990).
105. C.N.R. Rao, S. Singh, V.P. Enthilnathan, *Chem. Soc. Rev.* 5, 297 (1976).
106. M. Jauquet, P. Laszlo, *Influence of Solvents in Spectroscopy*, en M.R.J. Dack (Ed.): *Solutions and Solubilities.*, Vol VIII, Part I of A. Weissberg (Ed): *Techniques of Chemistry*. Wiley Interscience. N.Y, (1975).
107. E. Lippert, Z. Elektrochem, Ber. Bunsenges, *Phys. Chem.*, 61, 962 (1957).
108. M.B. Lay, C.J. Drummond, P.J. Thistlethwaite, F.J. Grieser, *J. Colloid Interface Sci.* 128, 602 (1989).
109. E. M. Kosower, *J. Am. Chem. Soc.* 80, 3253 (1958).
110. J. Shorter, *Correlation Analysis in Organic Chemistry-An introduction to Linear Free Energy Relationships*. Clarendon Press, Oxford (1973).
111. E. Cassasas, N. Dominguez, G. Fonrodona, A. de Juan, *Anal. Chim. Acta.* 283, 548 (1993).
112. M.J. Kamlet, J-L. Abboud, R.W. Taft, *J. Am. Chem. Soc.* 99, 6027 (1977).
113. R.W. Taft, J-L Abboud, M.J. Kamlet, M.H. Abraham, *J. Solution Chem.* 14, 153 (1985).
114. M.J. Kamlet, J-L Abboud, M.H. Abraham, R.W.J. Taft, *J. Org. Chem.* 48, 2877 (1983).
115. T.M. Krygowski, W.R. Fawcet, *J. Am. Chem. Soc.* 97, 2143 (1975).
116. R.C. Dougherty, *Tetrahedron Lett.* 385 (1975).
117. I.A. Koppel, I.A. Palm, *Organic Reactivity.* 8, 296 (1971).
118. C.G. Swain, M.S. Swain, A.L. Powel, S. Aluni, *J. Am. Chem. Soc.* 105, 502 (1985).
119. Manual del equipo *Edinburgh Instrument FL-9000* (1982).
120. A. Kawski, *Critical Reviews in Analytical Chemistry.* 23(6), 459 (1993).
121. N. Wittouck; M. Negri, M. Ameloot; F.C. De Schryver. *J. Am. Chem. Soc.* 116, 23 (1994).
122. E. Bardez, E. Monnier, B. Valeur, *J. Colloid Interface Sci.* 112, 200 (1986).
123. E. Abuin, E. Lissi, en *14th International Conference on Physical Organic Chemistry, Florianopolis*, Santa Catarina, Brazil (1998).
-

-
124. H.-F. Eicke, P.E. Zinsli, *J. Colloid. Interface Sci.* 65, 131 (1978).
125. M. A. Biasutti, S. De Feyter, S. De Backer, G. B. Dutt and F. C. De Schryver, M. Amelot, P. Schlichting, K. Müllen. *Chem. Phys. Letters.* 248, 13 (1996).
126. L. Brand; J. R. Knutson; L. Davenport; J. Beechem; R. E. Dale; D. G. Walbridge; A. A. Kowalzyk, in *Spectroscopy and the Dynamics of Molecular Biological Systems*; P. M. Bayley, R. E. Dale. Eds.: Academic Press: London (1985).
127. A. Divenere, G. Mei, N. Rosato, A. F. Agro, G. Gilardi; *Acta Physica Polonica A.* 91 (4), 731. (1997).
128. C. R. Mateo, A. A. Souto, F. Amat-Guerri and A. U. Acuña, *Biophys. J.* 71, 2177 (1996).
129. C. R. Mateo, M. P. Lillo, J. C. Brochon, M. Martinez, J. Sanz and A. U. Acuña, *J. Phys. Chem.* 97, 3486, (1993).
130. E. Bucci; R. Steiner, *Biophys. Chem.* 30, 199 (1988).
131. G. R. Fleming, *Chemical Applications of Ultrafast Spectroscopy*, Oxford University Press: New York (1986).
132. M. Hof, P. Lianos, A. Laschewsky, *Langmuir.* 13, 2181 (1997).
133. A. Chattopadhyay, S. Mukherjee, H. Raghuraman, *J. Phys. Chem. B.* 106, 13002 (2002).
134. A. Chattopadhyay. *Chemistry and Physics of Lipids.* 122, 3 (2003).
135. A. Chattopadhyay, S. Mukherjee. *Biochemistry.* 32, 3804 (1993).
136. S. Mukherjee,; A. Chattopadhyay. *Biochemistry.* 33, 5089 (1994).
137. S. Mukherjee,; A. Chattopadhyay. *J. Fluoresc.* 5, 237 (1995).
138. D. Koppel, D. Schaefer, *Appl. Phys. Lett.* 22, 36, (1973).
139. A.J. Bard y Faulkner. *Electrochemical Methods, Fundamental and Applications*, John Wiley and Sons. New York 1980.
140. A. J. Arvia, S.L. Marchiano. *Los Fenomenos de Transporte en Electroquímica*; CIC, Bs. As. Argentina, Monografía 1972.
141. Newman *J. Electroanal. Chem.* 6, 187, (1973).
142. C. Tobias, W.M. Eisemberg, C.R. Wilke *J. Electrochem. Soc.* 99, 359, (1952).
143. E. Gileadi, E. Kirowa-Eisner., J. Penciner. *Interfacial Electrochemistry, an Experimental Approach.* Addison-Wesley Pub. Co. Massachusetts USA. 1975
144. R.S. Nicholson, I Shain. *Anal. Chem.* 36, 36, (1964).
145. R.S. Nicholson *Anal. Chem.* 37, 1351, (1965).
146. M.L. Olmstead, R.S. Nicholson. *Anal. Chem.* 41, 851, (1969).
147. G. Weber, F.J. Farris. *Biochem.* 18, 3075 (1979).
148. J. Catalan, P. Perez, J. Laynez, F.G. Blanco. *J. Fluoresc.* 1, 215 (1991).
-

-
149. F. Moreno, S. Corrales, P. Sevilla, F.G. Blanco, C. Diaz, J. Catalán. *Helv. Chim. Acta.* 84, 3306 (2001).
150. A. Balter, W. Nowak, W. Pawelkiewicz, A. Kowalczyk. *Chem. Phys. Letters.* 143, 565 (1988).
151. M. Ueda, Z.A. Schelly. *Langmuir.* 5, 1005 (1989).
152. C.E. Bunker, T.L. Bowen, Y-P. Sun. *Photochem. Photobiol.* 4, 499 (1993).
153. S. Sun, M.P. Heitz, S.A. Perez, L.A. Colón, S. Bruckenstein, F. Bright, *Appl. Spectrosc.* 51, 1316 (1997).
154. K.K. Flora, J.D. Brennan. *J. Phys. Chem. B.* 105, 12003 (2001).
155. P. Ilich, F.G. Prendergast. *J. Phys. Chem.* 93, 4441 (1989).
156. M.B. Moressi, M.A. Zón,; H. Fernández. *Can. J. Chem.* 80, 1232, (2002).
157. R.S. Nicholson, I. Shain. *Anal. Chem.* 36, 706, (1964).
158. N.M. Correa, E.N. Durantini, J.J. Silber. *Journal of Colloid and Interface Science.* 240, 573 (2001).
159. H. Ephardt, P. Fromherz. *J. Phys. Chem.* 97, 4540 (1993).
160. P. Fromherz. *J. Phys. Chem.* 99, 7188 (1995).
161. A.L. Lusk, P.W. Bohn. *Langmuir.* 16, 9131 (2000).
162. E. Stathatos, P. Lianos. *Langmuir.* 13, 259 (1997).
163. J-L Abboud, R. Notario. *Pure Appl. Chem.* 71, 645 (1999).
164. R.D. Falcone. *Tesis Doctoral*, Universidad Nacional de Río Cuarto (2004).
165. D.M. Togashi, S.M.B. Costa, A.J.F.N. Sobral, A.M.d'A.R. Gonsalves. *J. Phys. Chem. B.* 108, 11344 (2004)
166. R.D. Falcone , M.A. Biasutti, J.J. Silber, N. M. Correa. *Langmuir.* 18, 2039 (2002).
167. N.M. Correa, N. Levinger. *J. Phys. Chem. B.* 110, 13050 (2006).
168. R. E. Riter, E.P. Undiks, N.E. Levinger. *J. Am. Chem. Soc.* 120, 6062 (1998)
169. E. Abuin; E. Lissi; R. Duarte; J.J. Silber; M.A. Biasutti. *Langmuir.* 18, 8340. (2002).
170. R.D. Falcone, N.M. Correa, M.A. Biasutti, J.J. Silber. *J. Colloid Int. Sci.* 296, 356 (2006).
171. Encinas, M.V.; Lissi, E. *Chem. Phys. Lett.* 132, 545 (1986).
172. L.F. Aguilar, E. Abuin, E. Lissi. *Arch. Biochem. Biophys.* 388, 231 (2001).
173. Lissi, E.; Abuin, E. in *Solubilization in surfactant Aggregates*, Eds Christian, S.D.; Scamehorn, J.F., Marcel Decker, Inc.; New York, (1995).
174. P. L-G. Chong, S. Capes, P. Wong. *Biochemistry.* 28, 8358 (1989).
175. T. Parasassi, G. De Stasio, G. Ravagnan, R.M. Rusch, E. Gratton, *Biophys. J.* 60, 179 (1991).
-

65848

176. E.K. Krasnowska, L.A. Bagatolli, E. Gratton, T. Parasassi. *Biochim. Biophys. Acta.* 1511, 330 (2001).
177. J.W. Zeng, P.L. Chong. *Biochemistry.* 30, 9485 (1991).
178. P. L-G. Chong. *Biochemistry.* 27, 399 (1988).
179. E.K. Krasnowska, E. Gratton, T. Parasassi. *Biophys. J.* 74, 1984 (1998).
180. R.M. Kannuck, J.M. Bellama, R.A. Durst. *Anal. Chem.* 60, 142 (1988).
181. P. D' Orazio, G. Rechnitz. *Anal. Chem.* 49, 2083 (1977).
182. A. T. Jenkins, J. A. Olds. *Chem. Comm.* 2106 (2004).
183. M. Ikonen, L. Murtomäki, K Kontturi. *J. Electroanal. Chem.* 602, 189 (2007).
184. C. Letizia, P. Androzzzi, A. Scipioni, C. La Mesa, A. Bonincontro, E. Spignone. *J. Phys. Chem. B* 111, 898 (2007).
185. A. Bonincontro, C. La Mesa, C. Proietti, G. Risuleo, *Biomacromolecules* 8, 1824, (2007).
186. A. Bonincontro; M. Falivene, C. La Mesa, G. Risuleo, M. Ruiz Peña. *Langmuir* 24, 1973 (2008).
187. J. Kim, M. Lee. *J. Phys. Chem. B.* 103, 3378 (1999).
188. A.S.R. Koti, N. Periasamy, *J. Fluoresc.* 10, 177 (2000).
189. J.M. Muller, G. Van Ginkel, E.E. Van Faasen. *Biochemistry.* 35, 488 (1996).
190. R.B. Lentz. *Chemistry and Physics of Lipids.* 64, 99 (1933).
191. I. Konopasek, M. Kvasnicka, P. Herman, H. Linnertz, T. Obsil, J.V., J. Svobodova, C. Strzalka, L. Mazzanti, E. Amler. *Chemical Physics Letters.* 293, 429 (1998).

