

Nueva estrategia analítica basada en espectroscopia de fluorescencia para la determinación de la concentración de agregación crítica de moléculas tipo anfifilo

Josefina Galván¹

¹Lugar de trabajo: Laboratorio de Desarrollo Analítico y Quimiometría, Química Analítica I, FCB-UNL

Director/a: Culzoni, María Julia

Codirector/a: Alcaraz, Mirta Raquel

Area: Ciencias Naturales

Palabras claves: anfifilos, tensoactivos, fluorescencia, CAC

INTRODUCCIÓN

Las moléculas de tipo anfifilo poseen la capacidad de formar agregados en solución acuosa, lo que es una propiedad de gran interés desde el punto de vista químico y biológico. Estos compuestos están comprendidos por una cabeza hidrofílica y un grupo hidrófobo, que pueden formar agregados supramoleculares alterando la polaridad e hidrofobicidad del medio en el que están inmersos. Esta propiedad hace que los anfifilos sean de especial interés para diversas aplicaciones, incluyendo las aplicaciones farmacológicas como la autoasociación, la solubilización mejorada de fármacos poco solubles en agua, la encapsulación, la liberación y la citotoxicidad reducida de los fármacos. Por ello, es muy importante conocer la concentración de anfifilo a la que se forman agregados moleculares, es decir, la concentración de agregación crítica (CAC). Entre las técnicas mayormente reportadas para la determinación de CAC se encuentran conductividad, voltametría, calorimetría, técnicas de dispersión, tensión superficial, UV / vis, entre otras.

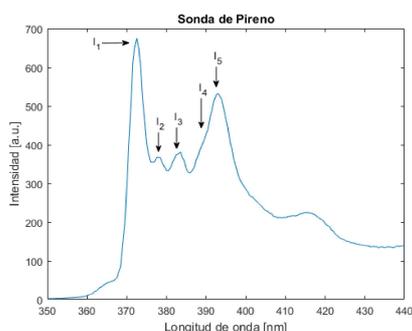


Figura 1: Espectro de emisión de fluorescencia de PYR en solución acuosa ($\lambda_{excitación}=335$ nm).

Por otro lado, las técnicas espectroscópicas de fluorescencia se caracterizan por ser altamente sensibles brindando una notable selectividad de una amplia variedad de compuestos, a pesar de su sencillez ya que no se requiere de instrumentación sofisticada. Asimismo, es capaz de proveer importante información fisicoquímica de los compuestos analizados a partir de la lectura y el análisis de sus espectros de excitación y emisión de fluorescencia. Una de las sondas fluorescentes mayormente utilizada para los análisis de fluorescencia es el pireno (PYR), que es un compuesto de la familia de los hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH). El PYR actúa como

Título del proyecto: CAI+D 2016 Tipo I PI y PACT: "Desarrollo de biosensores selectivos para marcadores tumorales basados en nanopartículas de oro funcionalizadas y detección fluorescente y UV-Vis. Aplicación al diagnóstico de la Leucemia Linfocítica Aguda"
Instrumento: espectrofotómetro de fluorescencia Cary Eclipse Agilent
Año convocatoria: 2019
Organismo financiador: UNL
Director/a: Culzoni, María Julia



sonda hidrófoba y se utiliza para evaluar cambios en micropolaridad en solución. Cuando es irradiado con una luz de longitudes de onda ~ 335 nm se obtiene un espectro de emisión de fluorescencia que presenta cinco bandas vibrónicas características (**Figura 1**), siendo la primera (I_1) la más sensible a un entorno polar, mientras que la tercera (I_3) es la más sensible a un entorno más hidrófobo.

La información complementaria brindada por las bandas 1 y 3 del espectro de emisión de fluorescencia acerca de la polaridad e hidrofobicidad del medio resulta útil para la estimación de parámetros fisicoquímicos de las moléculas tipo anfifilo. En este sentido, la relación entre la intensidad de las bandas 1 y 3 (I_1/I_3) permite obtener datos característicos del comportamiento de agregación de las moléculas tipo anfifilo debido al cambio del entorno que generan al formar los agregados moleculares. De esta manera, es posible estimar, por ejemplo, su concentración de agregación crítica (CAC).

En este trabajo presentamos una nueva metodología analítica para la determinación de CAC de anfifilos de diversa naturaleza (catiónica, aniónica y neutra) en solución acuosa, basado en el comportamiento del PYR como sonda fluorescente.

OBJETIVOS

- Desarrollar y optimizar una metodología analítica basada en espectroscopia de fluorescencia para la determinación de CAC de moléculas tipo anfifilo.
- Validar el método desarrollado para asegurar su confiabilidad en términos de robustez y exactitud.

METODOLOGÍA

Para llevar a cabo el ensayo, se procedió a preparar una solución stock de PYR 80 $\mu\text{mol/L}$ en solución 20 % de metanol. Para las mediciones diarias, se realizó una dilución de la solución stock en agua obteniendo una solución de PYR de 2 $\mu\text{mol/L}$. Cabe destacar que a esta concentración de PYR no se observa formación de excímeros. La solución de anfifilo se preparó por disolución de una masa exacta en agua, obteniendo la concentración específica para cada compuesto evaluado. Los anfifilos analizados en este trabajo fueron C_{16}TAB (catiónico), SDBS (aniónico) y Brij-35 (neutro).

Para las mediciones se utilizó un espectrofotómetro de fluorescencia Cary Eclipse Agilent. Para el desarrollo del experimento, se colocaron 2 ml de la solución de PYR 2 $\mu\text{mol/L}$ en cubeta de cuarzo de 1x1-cm de paso óptico. Luego, se realizaron agregados sucesivos de pequeño volúmenes de la solución de anfifilo concentrada sobre la solución inicial de PYR y se registraron los espectros de emisión a cada nivel de concentración obtenida. Los datos obtenidos se analizaron y se obtuvieron las gráficas de titulación a fin de obtener parámetros fisicoquímicos del sistema.

RESULTADOS

En soluciones acuosas, a valores de concentración de anfifilo inferiores a su CAC el PYR se encuentra en un entorno polar debido a que las moléculas de anfifilo se encuentran dispersas en solución. Ante el aumento de la concentración, el PYR se encuentra en un entorno más hidrófobo debido a la inminente formación del agregado molecular. Por encima de la CAC, la sonda se encuentra completamente incorporada en la región hidrófoba del agregado debido a su carácter apolar. Los cambios de polaridad del entorno de la sonda

generan cambios en la relación I_1/I_3 que pueden ser fácilmente observables en las gráficas de I_1/I_3 vs. concentración de anfífilo. Estas gráficas muestran un comportamiento sigmoideo típico, cuyo punto de inflexión se utiliza como estimador de la CAC.

A continuación se muestran los espectros de emisión del PYR obtenidos a distintas concentraciones de anfífilo, como así también, las curvas de I_1/I_3 vs. concentración de anfífilo para los distintos casos.

Titulación C₁₆TAB (catiónico)

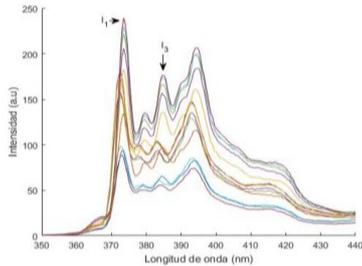


Figura 3: Espectros de emisión de fluorescencia de PYR ante el aumento de la concentración de C₁₆TAB

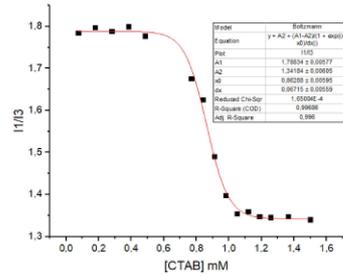


Figura 4: Valores de I_1/I_3 en función de la concentración de C₁₆TAB (cuadrados negros) y curva de Boltzmann ajustada (línea roja)

Titulación SDBS (aniónico)

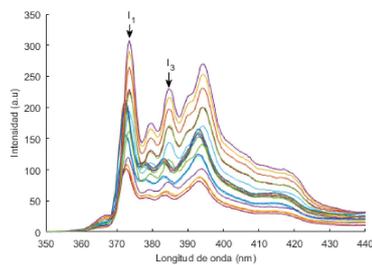


Figura 5: Espectros de emisión de fluorescencia de PYR ante el aumento de la concentración de SDBS

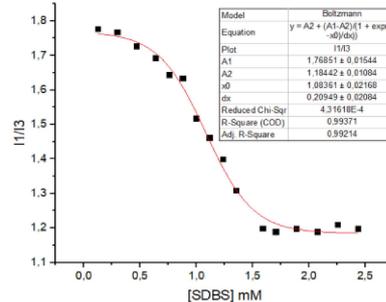


Figura 6: Valores de I_1/I_3 en función de la concentración de SDBS (cuadrados negros) y curva de Boltzmann ajustada (línea roja)

Titulación BRIJ (neuro)

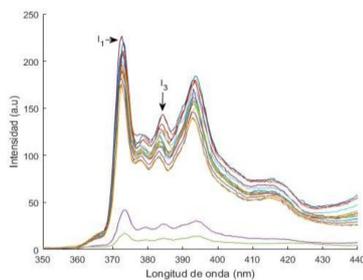


Figura 7: Espectros de emisión de fluorescencia de PYR ante el aumento de la concentración de Brij 35

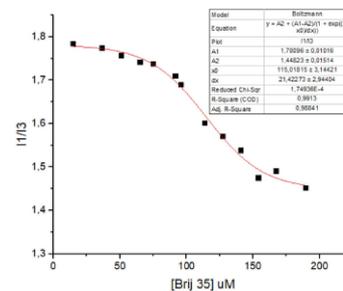


Figura 8: Valores de I_1/I_3 en función de la concentración de Brij-35 (cuadrados negros) y curva de Boltzmann ajustada (línea roja)



Para la determinación de la CAC, se utilizó la ecuación sigmoidea de Boltzmann para modelar la relación I_3/I_1 en función de la concentración de anfifilo. A partir de la gráfica, se obtuvieron dos valores de CAC: uno correspondiente al punto de inflexión (X_0) y otra en ($X_0 + 2 \Delta X$), siendo ΔX un parámetro que relacionado con el rango de la variable independiente donde ocurre el cambio abrupto de la variable dependiente. Para la selección del valor de CAC más adecuado, se utilizó la relación $X_0/ \Delta X$ según el siguiente criterio:

- $(X_0/ \Delta X) < 10 = CAC = X_0$;
- $(X_0/ \Delta X) > 10 = CAC = X_0 + 2\Delta X$;

De los valores brindados por las gráficas correspondientes a cada anfifilo se pudieron obtener las CAC, las que se detallan en la **Tabla 1**.

Tabla 1: valores de CAC obtenidos utilizando el método desarrollado y los reportados en bibliografía

Anfifilo	CAC experimental (mmol/L)	CAC reportado (mmol/L)
CTAB	0,80-0,83	0,80-1,20
SDBS	0,91-1,08	1,00-1,50
Brij 35	0,11-0,13	0,09- 0,11

CONCLUSIONES

El método desarrollado se presenta como un método analítico sencillo, robusto y eficiente para la determinación de CAC de anfifilos de distinta naturaleza que puede ser utilizado como método alternativo a los utilizados como referencia. Los resultados obtenidos son comparables con los reportados en la bibliografía, demostrando la aplicabilidad del método a sistemas anfifílicos de diversa naturaleza.

Como perspectiva futura, se prevé utilizar este método para la determinación de CAC de sistemas anfifílicos más complejos del tipo gemini en medio acuoso de diversa composición para su posterior evaluación como transportador selectivo de sustancia de interés biológico.

BIBLIOGRAFÍA

Aguiar, J., Carpena, P., Molina-Bolivar, J. A., & Ruiz, C. C. (2003). On the determination of the critical micelle concentration by the pyrene 1: 3 ratio method. *Journal of Colloid and Interface Science*, 258(1), 116-122.

Kalyanasundaram, K., & Thomas, J. K. (1977). Environmental effects on vibronic band intensities in pyrene monomer fluorescence and their application in studies of micellar systems. *Journal of the American Chemical Society*, 99(7), 2039-2044.

Mitsionis, A. I., & Vaimakis, T. C. (2012). Estimation of AOT and SDS CMC in a methanol using conductometry, viscometry and pyrene fluorescence spectroscopy methods. *Chemical Physics Letters*, 547, 110-113.

Mohr, A., Talbiersky, P., Korth, H. G., Sustmann, R., Boese, R., Bläser, D., & Rehage, H. (2007). A new pyrene-based fluorescent probe for the determination of critical micelle concentrations. *The Journal of Physical Chemistry B*, 111(45), 12985-12992.

Ray, G. B., Chakraborty, I., & Moulik, S. P. (2006). Pyrene absorption can be a convenient method for probing critical micellar concentration (cmc) and indexing micellar polarity. *Journal of colloid and interface science*, 294(1), 248-254.

Sahoo, L., Sarangi, J., & Misra, P. K. (2002). Organization of amphiphiles, part 1: Evidence in favor of pre-micellar aggregates through fluorescence spectroscopy. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 75(4), 859-865.