



**O 2-(3'-HIDROXI-2'-PIRIDIL)BENCIMIDAZOL  
COMO SONDA FLUORESCENTE PARA O  
ESTUDO DE REACCIÓNS DE TRANSFERENCIA  
PROTÓNICA FOTOINDUCIDA**

---

*Traballo de fin de Grao*

**Lucía Corral Cid**

2017

GRAO EN QUÍMICA

Departamento de Química Física

*Universidade de Santiago de Compostela*

**M<sup>a</sup> Flor Rodríguez Prieto**, Catedrática de Química Física na Universidade de Santiago de Compostela, e **M<sup>a</sup> Carmen Ríos Rodríguez**, Profesora Titular de Química Física na Universidade de Santiago de Compostela, como titoras docentes do Traballo Fin de Grao en Química de **Lucía Corral Cid**,

AUTORIZAN a presentación do traballo titulado “O 2-(3'-hidroxi-2'-piridil)bencimidazol como sonda fluorescente para o estudo de reaccións de transferencia protónica fotoinducida.” como conclusión da labor realizada por esta alumna no Centro Singular de Investigación en Química Biolóxica e Materiais Moleculares da Universidade de Santiago de Compostela durante o curso 2016-2017.

Para que así conste, firmamos a presente en Santiago de Compostela, a 12 de Xullo de 2017.

M<sup>a</sup> Flor Rodríguez Prieto

M<sup>a</sup> Carmen Ríos Rodríguez

# Contidos

<b>1. RESUMO</b> .....	1
<b>2. INTRODUCCIÓN</b> .....	3
2.1. Transferencia protónica fotoinducida .....	4
2.1.1. <i>Fundamento</i> .....	4
2.1.2. <i>Antecedentes</i> .....	4
2.2. Sondas fluorescentes .....	5
2.3. 2-(3'-Hidroxi-2'-piridil)bencimidazol.....	6
<b>3. OBXECTIVOS E PLAN DE TRABALLO</b> .....	9
3.1. Obxectivos.....	9
3.2. Plan de traballo.....	9
<b>4. MÉTODOS E TÉCNICAS EXPERMENTAIS</b> .....	10
4.1. Preparación de disolucións.....	10
4.2. Medidas de absorción UV-Vis .....	10
4.3. Medidas de fluorescencia de estado estacionario.....	11
4.4. Medidas de tempos de vida de fluorescencia .....	13
4.4.1. <i>Técnica de reconto de fotóns individuais correlacionado co tempo</i> .....	13
4.5. Tratamento de datos .....	14
4.5.1. <i>Corrección de espectros de fluorescencia</i> .....	15
4.5.2. <i>Determinación de tempos de vida</i> .....	15
<b>5. RESULTADOS E DISCUSIÓN</b> .....	17
5.1. Medidas de absorción.....	17
5.1.1. Efecto do disolvente.....	17
5.1.2. Efecto da acidez .....	18
5.2. Medidas de fluorescencia .....	22
5.2.1. <i>Medio neutro</i> .....	22
a) Auga .....	22
b) Trifluoroetanol .....	23
c) Acetonitrilo .....	24
d) Etanol .....	25
5.2.2. <i>Medio básico</i> .....	26
5.2.3. <i>Medio ácido</i> .....	27
a) Acetonitrilo .....	27

b) Etanol .....	28
c) Auga .....	29
d) Trifluoroetanol .....	32
5.3. Medidas de fluorescencia resolta no tempo .....	35
5.3.1. <i>Trifluoroetanol medio neutro</i> .....	35
a) Axuste exponencial.....	35
5.3.2. <i>Trifluoroetanol medio ácido</i> .....	38
a) Axuste exponencial.....	38
b) Axuste a catro especies .....	39
<b>6. CONCLUSIÓNS</b> .....	44
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	48
<b>ANEXO I</b> .....	
<b>ANEXO II</b> .....	

## 1. RESUMO

A cuantiosa presenza de procesos de transferencia protónica en sistemas químicos e biolóxicos, fan do estudo da súa dinámica o obxecto de numerosas liñas de investigación actuais, especialmente centradas no emprego de sondas fluorescentes para este propósito. Neste traballo levouse a cabo a análise do comportamento do 2-(3'-hidroxi-2'-piridil)bencimidazol (HPyBI) en diversos disolventes e valores de pH mediante técnicas de espectroscopía electrónica UV-Vis e de fluorescencia, tanto en estado estacionario como resolta no tempo, permitindo unha achega ao efecto do medio sobre a química desta e outras sondas semellantes. Observouse o diferente comportamento da molécula en medio acuoso e trifluoroetanólico fronte ao resto de disolventes en medio neutro, presentando un equilibrio no estado fundamental entre a forma enólica e o seu tautómero cando unicamente a primeira se detecta no resto dos casos. Destaca así mesmo, a variabilidade no comportamento amosada en disolucións ácidas, onde pese a ser o catión enólico a única especie presente no estado fundamental, a potenciación das propiedades ácido-base no estado excitado altera notablemente a produción de distintas formas emisoras, especialmente no caso do trifluoroetanol, onde se observou un posible proceso de transferencia protónica intramolecular asistido polo disolvente, que se analizou en profundidade de xeito individual, confirmando tal hipótese.

\*\*\*

The important amount of proton transfer processes present in chemical and biological systems, make the study of their dynamics the goal of many lines of investigation, specially focused on using fluorescent probes for this purpose. In this work we investigated the behaviour of 2-(3'-hydroxy-2'-pyridyl)benzimidazole (HPyBI) in various solvents and acidities by means of UV-Vis absorption spectroscopy and steady-state and time-resolved fluorescence spectroscopy, letting us know about the effect of the environment on the chemistry of this and similar probes. The different behaviour of HPyBI in aqueous and trifluoroethanolic solution compared with other solvents was observed, showing a ground-state equilibrium between its enolic and tautomeric forms when only the former was detected in the ground-state. It was also relevant the diversity of behaviour shown in acidic solutions where in spite of only detecting the enolic cation in the ground state, its increased acid-base properties upon

excitation affected the produced emitting species, specially in the case of trifluoroethanol, where we observed a potential solvent-assisted proton transfer process, individually investigated and supported by evidence.

\*\*\*

La notable presencia de procesos de transferencia protónica en sistemas químicos y biológicos, hacen del estudio de su dinámica el objetivo de numerosas líneas de investigación actuales, especialmente centradas en el uso de sondas fluorescentes para este propósito. En este trabajo se llevó a cabo el análisis del 2-(3'-hidroxi-2'-piridil)bencimidazol (HPyBI) en distintos disolventes y valores de pH mediante técnicas de espectroscopía electrónica UV-Vis y de fluorescencia, tanto en estado estacionario como resuelta en el tiempo, permitiendo un acercamiento al efecto del medio sobre la química de esta y otras sondas similares. Se observó el diferente comportamiento de la molécula en medio acuoso y trifluoroetanólico frente al resto de disolventes, presentando un equilibrio en estado fundamental entre la forma enólica y su tautómero cuando únicamente la primera se detecta en el resto de los casos. Destaca así mismo, la variabilidad en el comportamiento observada en disoluciones ácidas, donde pese a ser el catión enólico la única especie detectada en estado fundamental, la potenciación de las propiedades ácido-base en el excitado afecta notablemente la producción de distintas formas emisoras, especialmente en el caso del trifluoroetanol, donde se observó un posible proceso de transferencia protónica fotoinducida asistido por el disolvente, que se analizó en profundidad de manera individual, confirmando tal hipótesis.

## 2. INTRODUCCIÓN

A riqueza e complexidade dun gran número de procesos clave en Química e Bioloxía radica nos distintos tipos de interaccións involucrando protóns que se producen no medio de reacción, por un xeral de carácter líquido, e que en función das propiedades deste, condicionan a maneira en que o soluto convive co disolvente. O estudo da dinámica molecular que dita estes procesos é polo tanto fundamental para poder desentrañar e aproveitar as peculiaridades destes fenómenos. Nesta liña, destacan pola súa relevancia na natureza e densidade de estudo os procesos de **transferencia protónica**, que analizados xa dende múltiples ópticas, continúan a ser obxecto de estudo de numerosas investigacións, como a que nos ocupa, debido á complexidade que os seus mecanismos presentan, a participación de enlaces de hidróxeno, e o marcado efecto do disolvente sobre estes<sup>1-5</sup>. Con isto, tales procesos pese a seren habitualmente analizados no estado fundamental de moitas especies<sup>1,2</sup>, son así mesmo esenciais no estado excitado, que adoita ser consecuencia da fotoexcitación da molécula involucrada<sup>3,6,7</sup>. Así, a transferencia protónica no estado excitado pode darse intermolecularmente, no caso de que o protón sexa cedido a unha molécula do medio, ou de forma intramolecular (proceso coñecido como ESIPT, segundo as siglas en inglés de *Excited-State Intramolecular Proton Transfer*), cando dous grupos, ácido e básico, dunha mesma especie molecular están involucrados na transferencia<sup>8,9</sup>. Este último caso, estreitamente ligado á disposición estrutural dos grupos na molécula, adoita levarse a cabo en tempos de reacción incluso equiparables aos movementos vibracionais<sup>10,11</sup> debido á contribución de enlaces de hidróxeno formados no proceso<sup>12</sup>, polo que é clave o uso de técnicas experimentais sensibles a dinámicas ultrarrápidas para o seu estudo.

Un dos fenómenos que fan especialmente interesante a análise da ESIPT, é o cambio que as propiedades físico-químicas de certas especies experimentan no estado excitado con respecto ás observadas no fundamental<sup>13</sup>, chegando a presentar fluorescencia dual ou desprazamentos anómalos da banda de emisión cara o vermello, especialmente en moléculas con enlaces de hidróxeno intramolecular<sup>14,15,16</sup>. Este feito é consecuencia da redistribución da densidade de carga trala excitación electrónica, que logra mudar considerablemente a química da molécula, especialmente as propiedades ácido-base, favorecendo a formación de novas especies tautoméricas trala transferencia protónica. Tales sustancias capaces de variar a acidez no estado excitado, poden clasificarse en

fotoácidos e fotobases<sup>17,18</sup> en función de se participan na cesión ou na captura dun protón do medio, respectivamente, amosando en ambos casos notable variación (diminución no caso do fotoácido e aumento na fotobase) de  $pK_a$ , o que lles confire características adecuadas para numerosas aplicacións: en bioquímica como sondas para o estudo de proteínas<sup>19,20</sup>; no campo dos materiais, como láseres químicos<sup>21,22</sup>, estabilizadores de polímeros<sup>23,24,25</sup> ou dispositivos orgánicos emisores de luz<sup>26,27</sup> e incluso como modelos para o estudo de mecanismos involucrados nas mutacións do ADN<sup>28</sup>.

## 2.1 Transferencia protónica fotoinducida

### 2.1.1 Fundamento

Os procesos de transferencia protónica fotoinducida, como xa se adiantou, son consecuencia da redistribución electrónica producida trala fotoexcitación da molécula, que en fotoácidos e fotobases se traduce na marcada alteración das propiedades ácido-base da especie no estado excitado. O cambio na distribución da carga será apreciable cando grupo funcional involucrado estea directamente unido á parte aromática da molécula, observándose efectivamente como grupos dadores, como alcohol, amino, tiol, tioéter, éter..., potencian a capacidade de ceder electróns trala excitación, do mesmo xeito que os grupos aceptores, carbonilo, carboxilo, amida, sulfona... aumentan a capacidade de captalos. É isto debido ao aumento da conxugación no primeiro estado excitado con respecto ao fundamental, xa que trala excitación, os orbitais  $\pi$  antienlazantes ( $\pi^*$ ) de baixa enerxía dos grupos aceptores reciben carga do anel aromático ( $\pi \rightarrow \pi^*$ ), facendo que o aumento da densidade electrónica incremente a súa tendencia a protonarse, volvéndose bases máis fortes, e consecuentemente se reflicta en que  $pK_a^* > pK_a$  (onde [\*] corresponde á denominación do estado excitado), mentres que no caso dos grupos dadores, os electróns libres que puidesen presentar, son promovidos a un orbital  $\pi$  dos aneis aromáticos perdendo así densidade electrónica no propio grupo, aumentando a súa acidez, e obténdose polo tanto ácidos máis fortes con  $pK_a^* < pK_a$ <sup>7,9</sup>.

### 2.1.2 Antecedentes

A primeira observación documentada dun proceso de transferencia protónica fotoinducida remóntase á primeira metade do século XX, pese a que se tardase máis dunha década en dar coa explicación acertada ao fenómeno. Weber<sup>29</sup>, en 1931, advirte o comportamento anómalo da 1-naftilamina-4-sulfonato trala análise dos dispares



resultados do estudo por espectroscopía de absorción fronte á emisión de fluorescencia da mostra. Mentres que o incremento do pH do medio non afectaba á forma do espectro de absorción do sulfonato, a fluorescencia amosaba un desprazamento notable dende a rexión azul-violeta ata o verde cando se pasaba do medio neutro á disolución basificada. Non foi ata 1949 sen embargo, que Förster<sup>30,31</sup> dá coa explicación ao fenómeno observado, atribuíndoo efectivamente a un proceso de transferencia protónica fotoinducida no estado excitado, e xustificando así o distinto comportamento da especie no estado fundamental, reflectido no espectro de absorción, fronte ao excitado, causante da emisión de fluorescencia. Pioneiro no seu campo, chega a presentar ao ano seguinte un método para calcular o novo  $pK_a$  da molécula no estado excitado ( $pK_a^*$ ) en función do seu valor no estado fundamental e as enerxías de transición electrónica 0-0 da forma protonada e desprotonada, que hoxe en día se segue a coñecer como o Ciclo de Förster.

O campo que na época comezaba a xurdir, foi proseguido por Weller<sup>32,33</sup> nos anos vindeiros, afondando na análise dos espectros do ácido salicílico e seus derivados metilados, o que a día de hoxe se reconece como a primeira análise detallada dun proceso de transferencia protónica intramolecular no estado excitado. En 1961 é o mesmo Weller quen publica unha primeira revisión do tema<sup>34</sup>, seguida polas contribucións de outros autores como Parker<sup>35</sup>, Ireland e Wyatt<sup>13</sup>, Klopffer<sup>36</sup>... E que se completou con revisións máis extensas abranguendo o enfoque intermolecular e intramolecular da man de Amaut e Formosinho<sup>7</sup> ou Demchenko<sup>37</sup>.

Non obstante, pese a que a natureza termodinámica destes procesos se presentaba cada vez máis accesible ao alcance dos estudos da época, a análise das cinéticas ultrarrápidas e cuantificación de constantes de velocidade de transferencia protónica tivo que agardar a que a capacidade das técnicas dispoñibles permitise a achega a procesos transcorridos en escalas de nanosegundos ata femtosegundos<sup>11</sup>. A día de hoxe as técnicas resoltas no tempo posibilitan un seguimento fiel das dinámicas do estado excitado, permitindo dar conta das complexas interaccións entre a especie fotoexcitada e o entorno e a maneira en que as súas propiedades, especialmente ácido-base, se ven afectadas con respecto ao estado fundamental.

## 2.2 Sondas fluorescentes

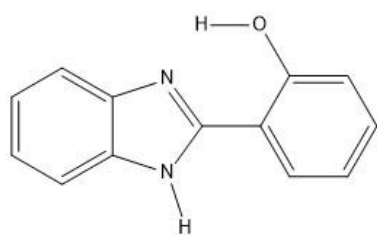
Como xa se veu anticipando, o feito de que as principais características do estudo da fluorescencia, como son o espectro, o rendemento cuántico, ou o tempo de

vida, se vexan afectadas sensiblemente polas interaccións da especie involucrada co seu entorno próximo<sup>8</sup>, fan que o emprego de moléculas emisoras, en especial colorantes fluorescentes orgánicos<sup>38</sup> se presente como unha ferramenta idónea para a obtención de información acerca de sistemas físicoquímicos, bioquímicos e biolóxicos ademais de sobre a dinámica das súas interaccións, especialmente no estado excitado<sup>39</sup>. Débese isto á especificidade e sensibilidade das características de fluorescencia xunto ao alcance espacial e temporal das técnicas fluorométricas modernas.

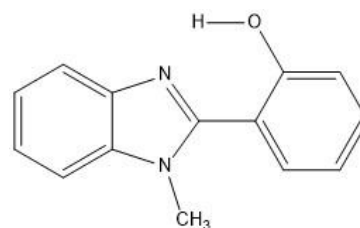
Dependendo así das particularidades do estudo a levar a cabo, será fundamental a escolla dunha sonda adecuada, e polo tanto debe ser exhaustivo o proceso de previa caracterización destas.

### 2.2.1 2-(3'-Hidroxi-2'-piridil)bencimidazol

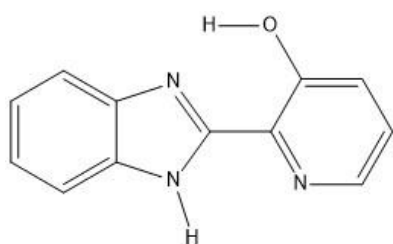
No que respecta ao estudo dos fenómenos de transferencia protónica fotoinducida, dende comezos dos anos 90, trabállase en profundidade na investigación de derivados do bencimidazol que experimenten transferencia protónica intramolecular no estado excitado dende un grupo hidroxilo a un nitróxeno aromático, especialmente hidroxifenil-<sup>40,41,42,43</sup> e hidroxipiridil<sup>44,45,46</sup>-bencimidazoles, pese a que benzoxazoles e benzotiazoles se presenten como alternativa en liñas de investigación análogas<sup>42,47</sup>.



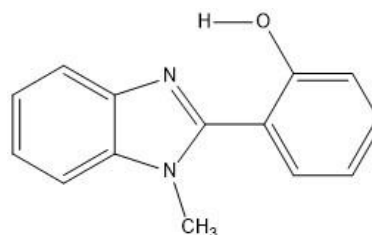
2-(2'-hidroxifenil)bencimidazol (**HBI**)



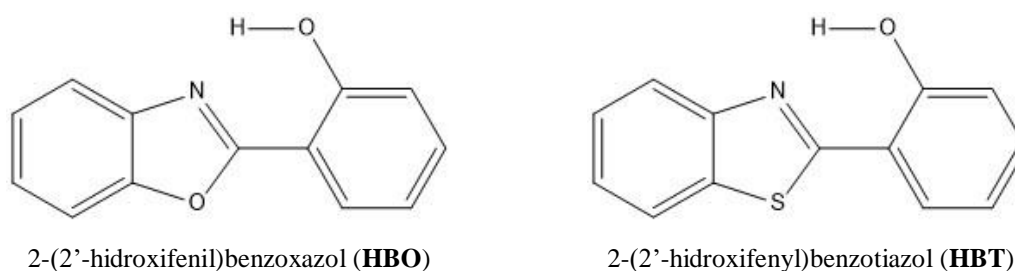
1-metil-2-(2'-hidroxifenil)bencimidazol (**MeHBI**)



2-(3'-hidroxi-2'-piridil)bencimidazol (**HPyBI**)



1-metil-2-(3'-hidroxi-2'-piridil)bencimidazol  
(**MeHPyBI**)

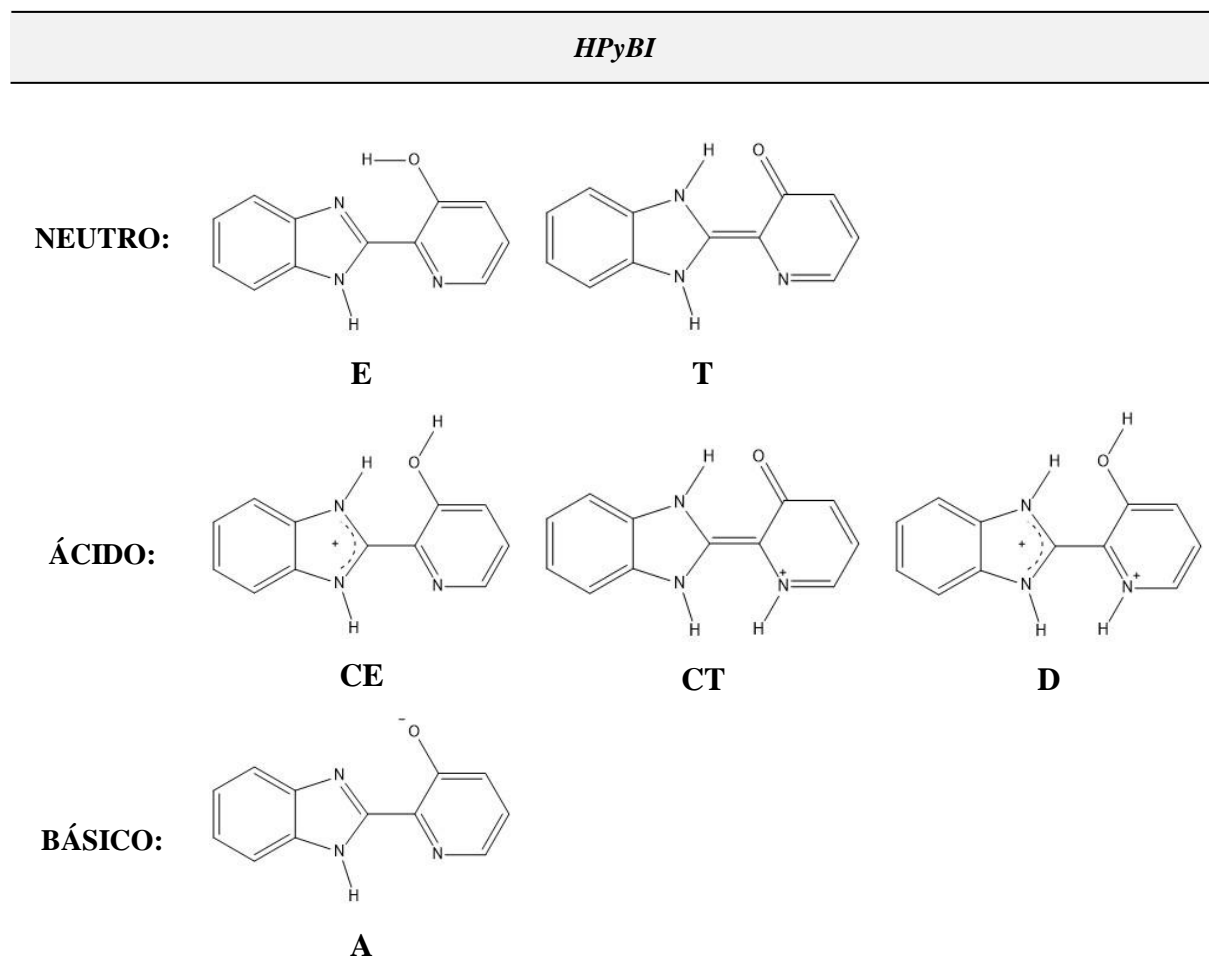


**Figura 2.1** . Estructuras moleculares das formas enólicas no estado fundamental de distintos exemplos de sondas fluorescentes para o estudo de procesos de ESIPT.

O interesante comportamento dunha destas sondas, o 2-(3'-hidroxi-2'-piridil)benzimidazol (**HPyBI**), obxecto de estudo deste traballo, foi analizado previamente en distintos disolventes e condicións de pH<sup>44,45</sup>, debido ao efecto decisivo destas variacións sobre os equilibrios tautoméricos no estado fundamental e á estabilidade das súas posibles formas no excitado. Observouse unha diferenza marcada entre os resultados obtidos en disolventes acuosos e non acuosos, amosando nos primeiros un equilibrio tautomérico entre a forma enólica **E** (**Figura 2.2**) da molécula e o correspondente tautómero **T** no estado fundamental, mentres que trala excitación, un proceso de ESIPT ultrarrápido provoca que unicamente sexa detectado este último, **T\***. En disolventes non acuosos sen embargo, tan só **E** existe no estado fundamental, para, a través de transferencia protónica intramolecular ultrarrápida, producir a forma tautomérica **T\*** no estado excitado.

Ademais, xa que a molécula presenta dous grupos nitroxenados básicos, o N do benzimidazol e o N piridílico, o comportamento fotoquímico da sonda en disolucións acidificadas verase determinado pola dinámica de protonación e os posibles distintos catións formados, que se identificaron como o monocatión enólico **CE**, o monocatión tautomérico **CT** e o dicatión **D**. Da mesma maneira, a altos valores de pH, as formas neutras desprotonanse para producir o anión **A**, que amosará así mesmo un comportamento particular. Do estudo destes equilibrios, obtivéronse os seguintes  $pK_a$  documentados<sup>45</sup>:  $pK_{a1} = -1,58$ ;  $pK_{a2} = 5,00$  e  $pK_{a3} = 8,57$ .

**Táboa 2.1.** Formas tautoméricas do HPyBI en medios neutro, ácido e básico xunto coa simboloxía asociadas a cada especie.



Este tipo de dinámicas e as circunstancias en que cada forma é detectada serán analizadas no presente traballo, a través de medicións espectroscópicas de absorción e fluorescencia en estado estacionario e resoltas no tempo.

### 3. OBXECTIVOS E PLAN DE TRABALLO

#### 3.1 Obxectivos

O principal obxectivo deste traballo é a caracterización químico-física do 2-(3'-hidroxi-2'-piridil)bencimidazol (**HPyBI**) como exemplo do estudo a través de medidas espectroscópicas, da estrutura e, como consecuencia, do comportamento, dunha sonda fluorescente en distintos medios de reacción. Pretende poñerse de manifesto ademais, a capacidade das técnicas empregadas para o seguimento e estudo de reaccións ultrarrápidas, neste caso procesos de transferencia protónica fotoinducida, a súa forte dependencia co medio e a posible proposición de mecanismos de reacción.

#### 3.2 Plan de traballo

Para levar a cabo este propósito, o traballo dividiuse nas seguintes tarefas:

- a) Realización de medidas de absorción do HPyBI en distintos disolventes e condicións:
  - i. Auga (medio neutro, ácido e básico).
  - ii. Acetonitrilo (medio neutro e ácido).
  - iii. Etanol (medio neutro e ácido).
  - iv. Trifluoroetanol (medio neutro e ácido).
  
- b) Realización de medidas de fluorescencia de estado estacionario do HPyBI en distintos disolventes e condicións:
  - i. Auga (medio neutro, básico e serie ácida).
  - ii. Acetonitrilo (medio neutro e ácido).
  - iii. Etanol (medio neutro e ácido).
  - iv. Trifluoroetanol (medio neutro e ácido).
  
- c) Análise de datos de fluorescencia resolta no tempo para o HPyBI en trifluoroetanol (medio neutro e ácido).
  
- d) Tratamento de datos e interpretación.

## 4. MÉTODOS E TÉCNICAS EXPERIMENTAIS

### 4.1 Preparación de disolucións

Empregouse unha disolución de HPyBI produto de síntese<sup>44</sup> previamente preparada, cunha concentración de  $\sim 1 \times 10^{-3}$  mol dm<sup>-3</sup> en metanol. A partir desta, e tomando a influencia do disolvente de partida como desprezable salvo excepcións nas que se procedeu á evaporación deste para a posterior redilución da mostra, preparáronse as distintas disolucións en auga, etanol, acetonitrilo e trifluoroetanol, todos eles de grao espectroscópico, na propia cubeta.

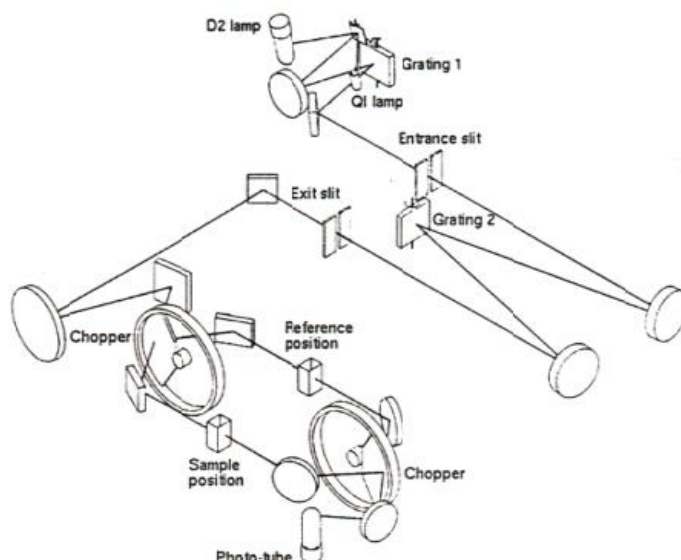
Para a análise en medio ácido empregáronse disolucións de HClO<sub>4</sub> previamente preparadas ( $1,34 \times 10^{-2}$  mol dm<sup>-3</sup>,  $5,16$  mol dm<sup>-3</sup>) e HCl ( $\sim 0,1$  mol dm<sup>-3</sup>) que se engadiron directamente na cubeta en función do pH requirido, calculado neste traballo como  $-\log[\text{HClO}_4]$  ou  $-\log[\text{HCl}]$  en función do ácido empregado, e seguindo a variación da concentración da disolución por pesada.

No caso das análises en medio básico empregouse así mesmo unha disolución previamente preparada de NaOH ( $2,66 \times 10^{-2}$  mol dm<sup>-3</sup>) que se engadiu da mesma maneira na propia cubeta e se seguiu por pesada.

A concentración das disolucións mantívose arredor de  $\sim 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup> para as medidas de absorción con intención de non superar o límite de cumprimento da lei de Beer e manter o sinal proporcional á concentración da mostra, e  $\sim 10^{-7}$  mol dm<sup>-3</sup> no caso das medidas de fluorescencia para de novo garantir a dependencia lineal da intensidade de fluorescencia (o número de contas) coa concentración da mostra.

### 4.2 Medidas de absorción UV-Vis

Os espectros de absorción rexistráronse cun espectrofotómetro de dobre feixe VARIAN modelo CARY 3E do que se amosa un esquema óptico na **Figura 4.1**.



**Figura 4.1.** Esquema dos compoñentes ópticos dun espectrofotómetro de absorción UV-Vis VARIAN modelo CARY E3.

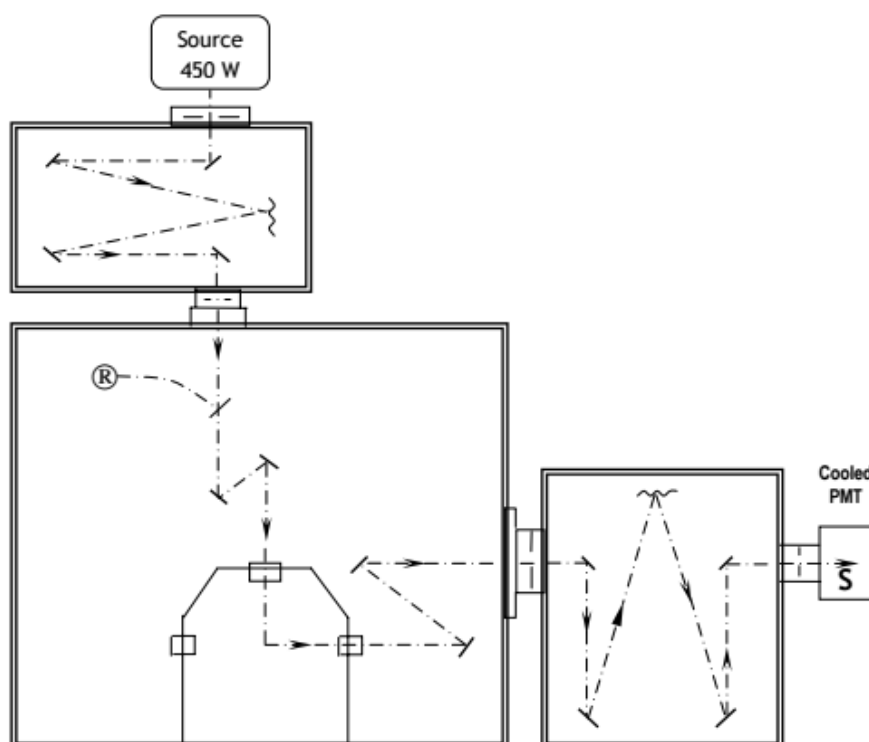
Como fonte de radiación emprega dúas lámpadas, de tungsteno e deuterio, para cubrir as rexións do espectro Visible e UV respectivamente. Permite así abranguer un intervalo de lonxitudes de onda de 900 a 190 nm, que se selecciona por medio dun premonocromador seguido da acción dun monocromador. Unha vez atravesados os elementos dispersivos, o feixe de excitación vese dividido en dous polo efecto dun *chopper* que dirixe a luz cara a mostra e a referencia. Un segundo *chopper* entón, en sincronía co primeiro, transmite o feixe seleccionado dende unha ou a outra ata o detector, neste caso un fotomultiplicador, que recolle o sinal.

Neste traballo, os espectros presentados rexistráronse a unha velocidade de 60nm/min (un dato cada 0,5 nm cun tempo de integración de 0,5 s) con fendas de 2 nm, trala toma dun branco co disolvente nas mesmas condicións. As cubetas empregadas tanto para a mostra como a referencia presentaban un paso de luz de 1 cm e dúas caras opostas pulidas.

### 4.3 Medidas de fluorescencia de estado estacionario

Os espectros de excitación e emisión de fluorescencia foron obtidos nun espectrofluorímetro SPEX, modelo Fluorolog-2 FL340 E1 T1 que emprega a técnica de recuento de fotóns e traballa controlado por un programa de software propio, DM3000F. A fonte de excitación é neste caso unha lámpada continua de Xe de 450W, á que acompañan os monocromadores de excitación e emisión. A actuación conxunta destes,

permitiu o rexistro de medidas diferentes en función de se é o monocromador de emisión ou de excitación o que se mantén fixo, obtendo deste xeito os espectros de excitación e emisión respectivamente. A referencia do equipo é unha disolución concentrada de Rodamina B en etilenglicol, que sendo recollida por un contador cuántico, permite a corrección de factores instrumentais no espectro. Os detectores finalmente son dous fotomultiplicadores. Pode observarse a disposición destes compoñentes na **Figura 4.2**.



**Figura 4.2.** Esquema dos compoñentes ópticos do espectrofluorímetro SPEX modelo Fluorolog-2 FL340 E1 T1.

Seleccionáronse de maneira xeral neste traballo (salvo excepcións que precisasen da adaptación destes parámetros) fendas de 0,5 mm para a excitación e de 0,2 mm para emisión, 0,5 s como tempo de integración e pasos de 0,5 nm. Realizouse ademais o rexistro dos espectros no modo de sinal/referencia para evitar o efecto de flutuacións das lámpadas e compensar as posibles variacións na intensidade do feixe de excitación dependentes da lonxitude de onda. De maneira complementaria, o modo *autocero* permite a corrección do espectro mediante a resta, ao inicio de cada medida, do ruído de fondo do equipo co obturador da excitación pecho durante 10 s. A detección



da fluorescencia realizouse a 90° respecto á dirección do feixe de excitación, polo que as cubetas empregadas, con 1 cm de paso de luz, amosaban 4 caras pulidas.

#### 4.4 Medidas de fluorescencia resolta no tempo

Os tempos de vida de fluorescencia obtivéronse mediante a técnica de recuento de fotóns individuais correlacionado co tempo ou TCSPC (*Time Correlated Single Photon Counting*) nun espectrómetro de Edinburgh Instruments modelo LifeSpec-ps. Como fonte de excitación emprega un láser de díodos de picosegundos, que compensa a potencia do seu feixe cun filtro atenuante regulable. Xa que este emite luz polarizada, o aparato equípase cun polarizador Glan Thompson que permite seleccionar a polarización trala cámara da mostra, ademais dun monocromador equipado con fendas de 0,5, 1 e 2mm. No que respecta ao detector, presenta un fotomultiplicador *Multichannel Plate* con velocidade de resposta inferior a 50 ps. Un analizador multicanle, cun máximo de 4096 canles de adquisición, de maneira complementaria operará neste caso a unha velocidade de repetición de 2,5 MHz.

##### 4.4.1 Técnica de recuento de fotóns individuais correlacionado co tempo<sup>8,9</sup>

A técnica TCSPC, densamente estudada na actualidade, preséntase como un dos métodos máis sensibles para a determinación de tempos de vida de fluorescencia. O seu fundamento, posible grazas aos compoñentes recollidos na **Figura 4.3**, baséase no recuento de fotóns correlacionados temporalmente cun pulso de excitación, que neste caso orixina un láser de díodos de picosegundos. Este pulso divídese inicialmente en dous, dirixíndose por unha parte cara a mostra, e incidindo no fotomultiplicador de inicio pola outra, o que dispara así o TAC (*Time to Amplitude Converter*). Este xera unha voltaxe que aumenta de xeito lineal co tempo, e que se detén cando o fotomultiplicador de parada detecta o primeiro fotón emitido pola mostra excitada. Un convertedor analóxico-dixital do analizador multicanle entón, da un valor numérico á voltaxe acumulada polo TAC, que é directamente proporcional ao intervalo de tempos entre o inicio e a parada. Este valor rexístrase como unha conta na canle correspondente, e tras repetir o experimento un gran número de veces, chega a obterse un histograma de probabilidades (**Figura 4.4**) onde o máximo da distribución presenta arredor de  $10^3$  contas.

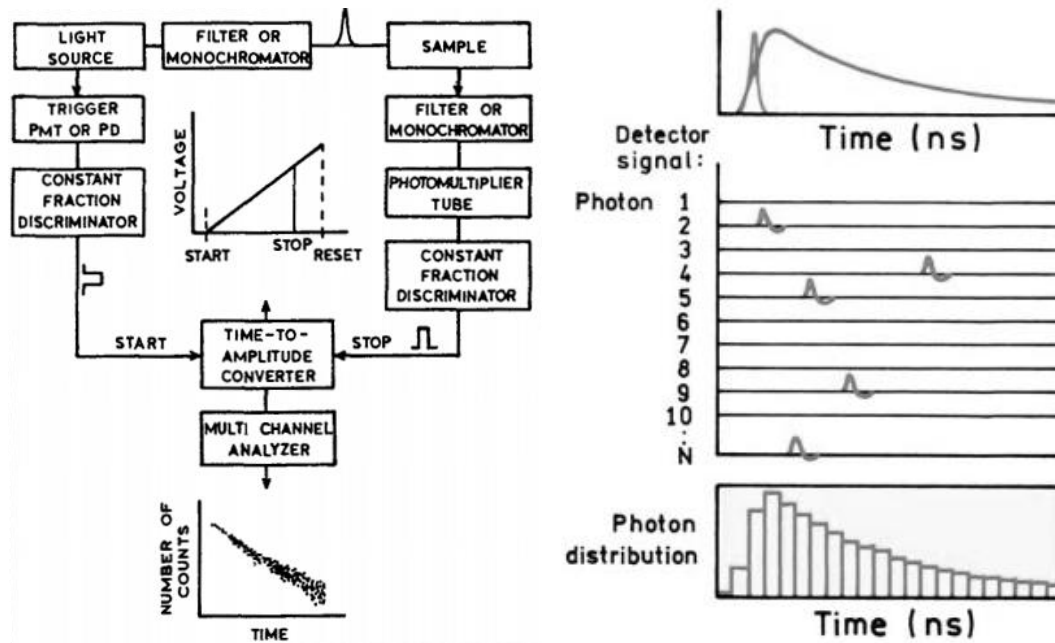


Figura 4.3 e 4.4. Esquema dun instrumento de recuento de fotóns individuais correlacionado co tempo e fundamento da formación do histograma de probabilidades<sup>9</sup>.

Como a probabilidade de que un fotón alcance o detector a tempo  $t$ , é proporcional á probabilidade de que o fotón sexa emitido a tempo  $t$ , o número de veces que o TAC rexistrou cada voltaxe reflicte o decaemento de fluorescencia, influído polo perfil da lámpada.

A pesar de que a técnica presente certas desvantaxes, como o efecto *pile-up*, producido cando máis dun fotón por pulso chega ao fotomultiplicador de parada, o que resultaría na obtención de tempos de vida máis curtos (debido a que solo se contabilizará o primeiro deles) de non manter a frecuencia de medida de fotóns regulada, as vantaxes que presenta fan da técnica unha das máis utilizadas no campo. Ademais da sensibilidade para detectar fotóns individuais, súmanse outros atributos como a forma coñecida do recuento de fotóns, que segue unha distribución de Poisson, coa desviación estándar definida como a raíz cadrada do número de contas.

#### 4.5 Tratamento de datos

O meirande parte dos datos experimentais obtidos nas medicións realizadas neste traballo tratáronse e dispuxéronse para a súa representación no programa SigmaPlot 12.5., salvo os axustes levados a cabo para os datos de fluorescencia resolta no tempo, que se realizaron en MATLAB.

#### 4.5.1 Corrección de espectros de fluorescencia

A natureza non ideal dos equipos espectrofluorimétricos empregados, debida a factores como a dependencia da intensidade da luz, a sensibilidade dos monocromadores ou fotomultiplicadores coa lonxitude de onda, fai da corrección posterior á obtención dos espectros tanto de excitación como de emisión, unha necesidade para que os datos reflectan a realidade da medida obtida. Con isto, o espectro verdadeiro  $F(\tilde{\nu})$  podería expresarse como:

$$F(\tilde{\nu}) = C(\tilde{\nu})F'(\tilde{\nu}) \quad (4.1)$$

onde  $F'(\tilde{\nu})$  representa o espectro que o equipo rexistra e  $C(\tilde{\nu})$  é a función de corrección. Estas últimas son proporcionadas pola casa comercial, tralo calibrado do equipo fronte a un estándar. Sen embargo é precisa a revisión da súa validez a cada tanto, debido ao efecto do uso na óptica do equipo.

Cabe destacar ademais, que a pesar de que a maioría dos espectros aparecen representados en escala de lonxitude de onda (nm), dado que é así como os espectrofotómetros e espectrofluorímetros operan, nalgúns casos en que fose interesante visualizar a enerxía da transición electrónica, realizouse a transformación a número de onda, debido á proporcionalidade desta coa enerxía dos fotóns a través de  $E = hc\tilde{\nu}$  mentres que  $E = hc/\lambda$ .

#### 4.5.2 Determinación de tempos de vida<sup>8,9</sup>

Trala excitación dunha mostra, a emisión de fluorescencia consecuente segue unha distribución temporal  $F(t)$ , que ven dada pola integral de convolución do pulso de excitación da lámpada,  $L(t)$ , coa resposta temporal de fluorescencia  $D(t)$  que tería se o sistema se excitase cun pulso moi breve.

$$F(t) = \int_0^t L(t')D(t - t')dt \quad (4.2)$$

Dado que  $F(t)$  e  $L(t)$  se coñecen experimentalmente, o propio programa de Edinburgh Instruments é capaz de obter  $D(t)$  mediante o método de reconvolucións interactivas por mínimos cadrados, baseándose na suposición de modelos de decaemento para poder calcular un  $F(t)$  e comparalo co experimental.

Como o decaemento de fluorescencia adoita poder describirse como unha suma de exponenciais,

$$D(t) = \sum_{i=1}^n \alpha_i e^{-t/\tau_i} \quad (4.3)$$

adaptando os valores dos parámetros implicados no perfil temporal, consegue obterse un axuste adecuado, que se pode apreciar visualmente na representación dos residuos ponderados, resultado de facer a diferenza entre o axuste  $F_c(t)$  e a función experimental  $F(t)$ , normalizados respecto a desviación estándar dos puntos.

$$R(t) = \frac{F_c(t) - F(t)}{\sigma(t)} \quad (4.4)$$

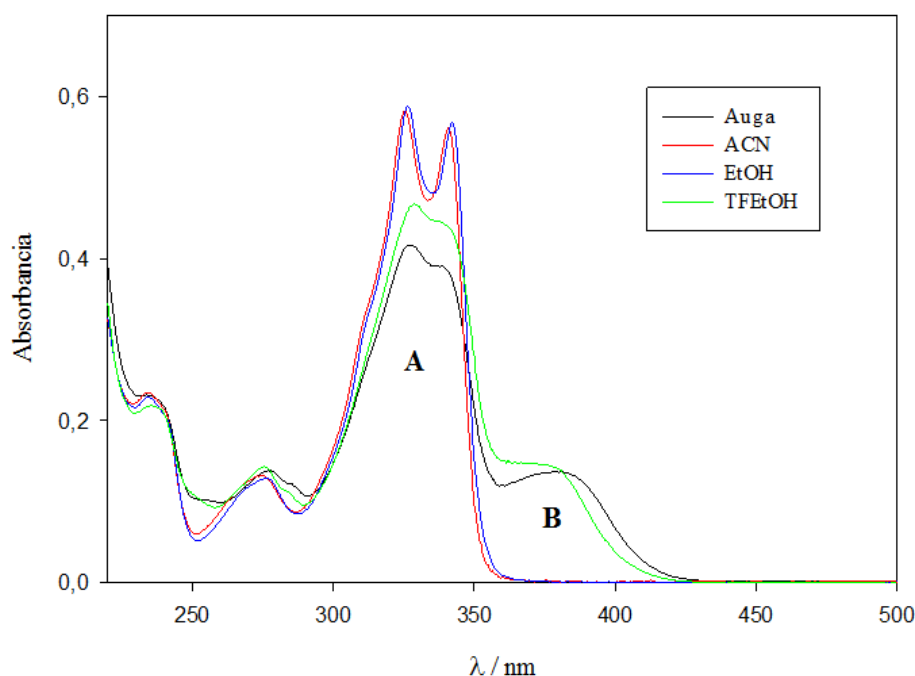
Obsérvase así a adecuada distribución aleatoria destes en torno a cero.

## 5. RESULTADOS E DISCUSIÓN

### 5.1 Medidas de absorción

#### 5.1.1 Efecto do disolvente

Deuse inicio ao estudo coa toma de medidas de absorción UV-Vis do HPyBI en distintos disolventes e condicións de pH. Na **Figura 5.1**, recóllense os espectros correspondentes ao medio neutro, observándose diferenzas claras entre, por unha banda, o acetonitrilo máis o etanol, fronte ao trifluoroetanol e a auga.



**Figura 5.1.** Espectros e absorción do HPyBI en distintos disolventes neutros.

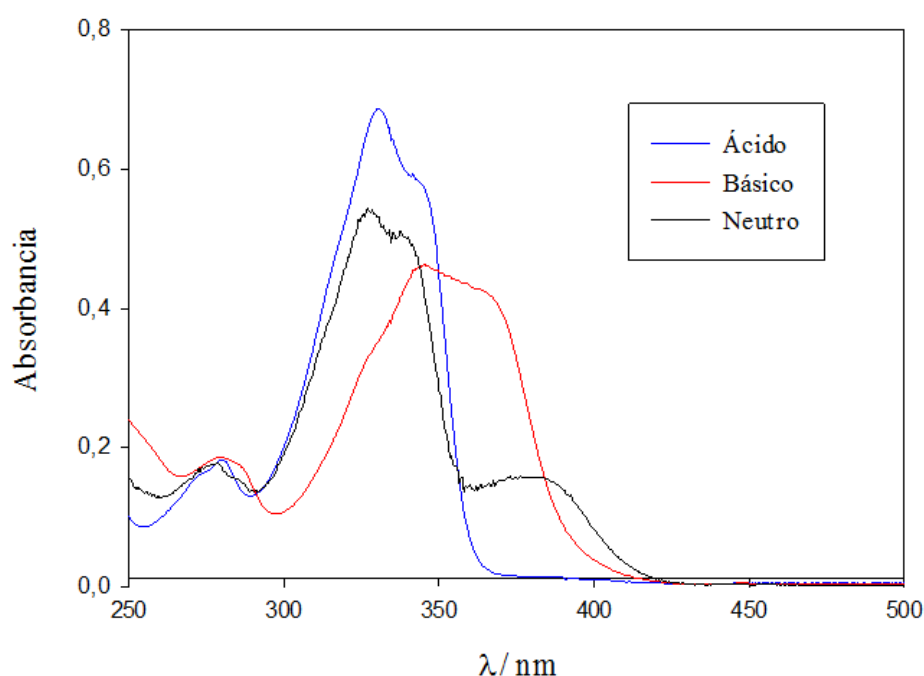
No caso dos dous primeiros, en azul e vermello, obsérvase unha banda principal A con dous picos diferenciados a 327 e 342 nm que en trifluoroetanol e auga, en negro e verde, perde estrutura vibracional e diminúe en intensidade. Máis aínda, no caso dos dous últimos, aparece unha segunda banda B a 380 nm, ausente no caso de acetonitrilo e etanol, o que suxire a presenza dunha segunda especie en equilibrio no estado fundamental responsable de dito sinal<sup>I</sup>. A posibilidade de que esta fose ocasionada pola forma protonada ou desprotonada estudouse no apartado seguinte, descartando tal hipótese. Esta situación analizouse tamén en detalle en publicacións anteriores<sup>44</sup>, onde

<sup>I</sup> O uso das letras A e B para referirse ás bandas con máximos en ~335 e 380 nm respectivamente, manterase para facilitar a comprensión ao longo da redacción deste traballo.

se confirma a través cálculos semiempíricos (AM1), comparativas con outras moléculas semellantes que tamén experimentan ES IPT e a posterior análise da emisión e tempos de vida de fluorescencia (estudos tamén levados a cabo neste traballo), que a forma enólica **E** (responsable da banda A), é a especie máis estable no estado fundamental en disolventes menos polares como acetonitrilo e etanol, mentres que en medio acuoso neutro existe en equilibrio co tautómero **T** (responsable da banda B), explicación que polo tanto se pode aplicar por coincidencia de máximos ao caso do trifluoroetanol, non contemplado na bibliografía.

### 5.1.2 Efecto da acidez

Analizouse por outra banda a dependencia do espectro de absorción coa variación da acidez do medio (**Figura 5.2**), a valores de pH 3 e 12 no caso das disolucións ácida e básica, para asegurar que a meirande parte das especies involucradas fosen a forma monoprotónada no medio ácido e a desprotonada no básico.



**Figura 5.2.** Espectros de absorción UV-Vis do HPyBI en medios ácido (pH=3) en azul, básico (pH=12) en vermello e neutro en negro.

Do mesmo xeito que se observou noutros bencimidazoles<sup>40-46</sup>, o espectro a pH=3 debe corresponder ao catión protonado no N do bencimidazol (posición con  $pK_a=5,00^{45}$ ), xa que é sabido que nestas moléculas a protonación sobre este N non

afecta apenas á posición do espectro. Pola súa parte, o espectro a pH=12 atribúese ao anión desprotonado no grupo hidroxilo, posición con  $pK_a$  documentado 8,57<sup>45</sup>.

Así, como se anticipara, é posible descartar a hipótese de que o fenómeno responsable da banda B, observada en medio neutro, sexa atribuíble a procesos de protonación ou desprotonación, xa que non se corresponde cos espectros do catión ou anión.

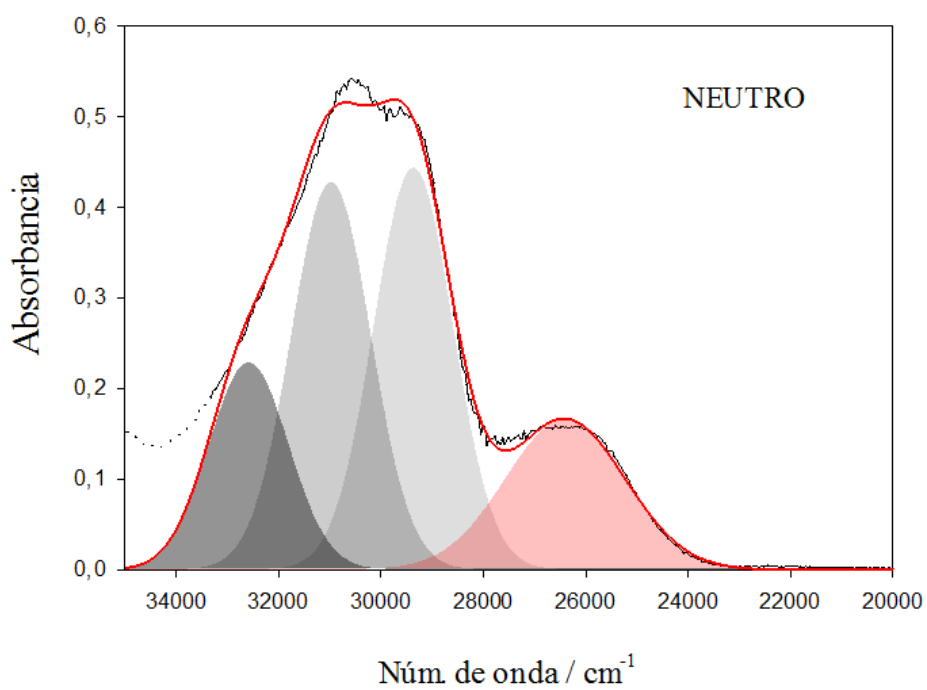
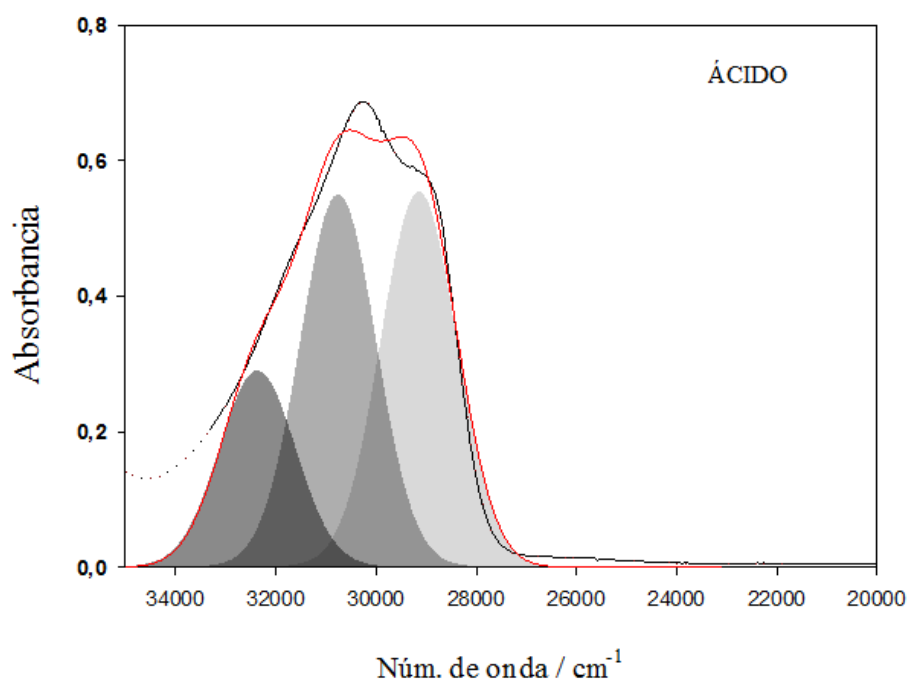
De maneira adicional, levouse a cabo a descomposición da banda de absorción asociada á principal transición electrónica  $S_0 \rightarrow S_1$  nas funcións gaussianas representadas a continuación (5.1), con obxecto de estudar en detalle a estrutura interna do espectro nos tres medios presentados (**Figuras 5.3, 5.4 e 5.5**). Supoñemos polo tanto para a banda A tres compoñentes vibracionais equiespaciadas (por unha distancia  $c$ ) da mesma anchura, e unha compoñente adicional para a banda B.

$$g_1 = e^{\left(-\frac{x-x_0}{b}\right)^2}, \quad g_2 = e^{\left(-\frac{x-x_0+c}{b}\right)^2}, \quad g_3 = e^{\left(-\frac{x-x_0+2c}{b}\right)^2}, \quad g_4 = e^{\left(-\frac{x-x_1}{d}\right)^2} \quad (5.1)$$

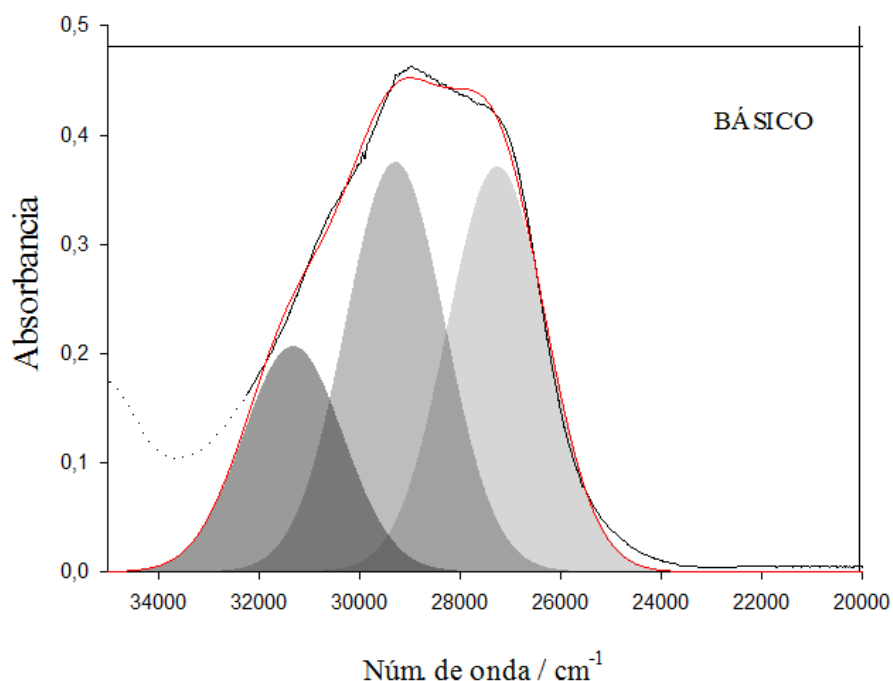
Nas expresións empregadas,  $x$  corresponde ao número de onda,  $x_0$  ao máximo da primeira banda (A) e  $x_1$  ao máximo da segunda (B) no espectro do medio neutro;  $b$  é a anchura da primeira banda (A),  $c$ , a separación entre funcións gaussianas expresada como incremento en números de onda, e  $d$ , a anchura da segunda banda unicamente presente no medio neutro (B). Partindo desta base, axustouse cada espectro na súa totalidade á combinación das contribucións de cada gaussiana segundo as funcións:

$$f_1 = a_1g_1 + a_2g_2 + a_3g_3 + a_4g_4, \quad f_2 = a_1g_1 + a_2g_2 + a_3g_3, \quad (5.2)$$

onde  $f_1$  representa unicamente o medio neutro, e  $f_2$  se utilizou para tanto o medio básico como ácido. Representáronse as contribucións das funcións gaussianas para cada caso, mostrando a validez da descomposición e do axuste, do cal se recolleron os parámetros obtidos na **Táboa 5.1**.







**Figura 5.3, 5.4, e 5.5.** Descomposición dos espectros de absorción UV-Vis do HPyBI en disolución acuosa neutra, básica e ácida. As liñas en cor negra corresponden aos espectros experimentais, e as vermellas aos resultados do axuste. As áreas en tonalidades grises representan as gaussianas obtidas da descomposición da banda A, e a área vermella, corresponde á gaussianaxustada para a banda B.

**Táboa 5.1.** Parámetros obtidos do axuste da banda de absorción principal en funcións gaussianas para os medios neutro, básico e ácido.

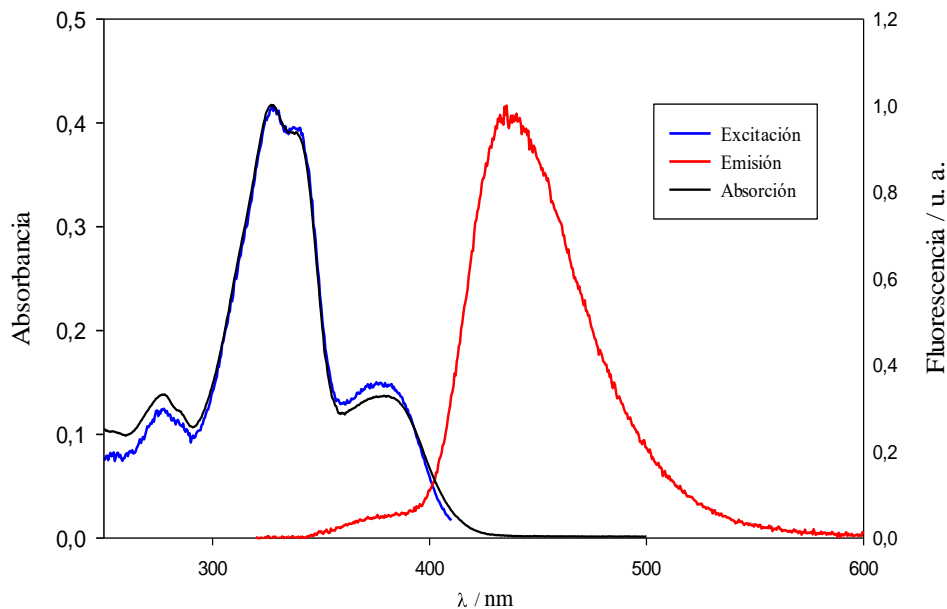
	<i>Neutro</i>	<i>Básico</i>	<i>Ácido</i>
$x_0 / (10^4 \text{ cm}^{-1})$	2,93883(91)	2,7280(10)	3,0775(19)
$b / (10^3 \text{ cm}^{-1})$	1,098(11)	1,340(10)	1,069(12)
$c / (10^3 \text{ cm}^{-1})$	-1,607(10)	-2,026(11)	-1,606(12)
$a_1 / 10^{-1}$	4,433(30)	3,712(23)	2,891(80)
$a_2 / 10^{-1}$	4,277(40)	3,752(31)	5,490(74)
$a_3 / 10^{-1}$	2,285(48)	2,064(37)	5,530(57)
$a_4 / 10^{-1}$	1,668(13)	-	-
$x_1 / (10^4 \text{ cm}^{-1})$	2,6413(17)	-	-
$d / (10^{-3} \text{ cm}^{-1})$	1,660(23)	-	-

## 5.2 Medidas de fluorescencia<sup>II</sup>

### 5.2.1 Medio neutro

#### a) Auga:

Obsérvanse na **Figura 5.6** as medidas realizadas en auga, tanto de excitación e emisión de fluorescencia en cores azul e vermella, como de absorción, representada por unha liña negra (código de cores que se mantén na totalidade das figuras representadas neste epígrafe, agás excepcións pertinentemente especificadas).



**Figura 5.6.** Espectros normalizados de excitación (en azul) e emisión (en vermello) de fluorescencia xunto coa absorción (en negro) para o HPyBI en medio acuoso neutro.

En medio acuoso neutro, advírtese a coincidencia case exacta entre o espectro de excitación, independentemente da lonxitude de onda de emisión empregada e o de absorción. Con isto, e en base ás análises realizadas anteriormente (*subepígrafe 5.1.1*) sobre as medidas de absorción, onde se confirmaba a presenza no estado fundamental dun equilibrio entre a forma enólica **E** e o tautómero **T**, conclúese de novo que son estas especies as causantes do sinal de excitación. Pola súa parte, o espectro de emisión presentou independencia xeral fronte á lonxitude de onda empregada para realizar o

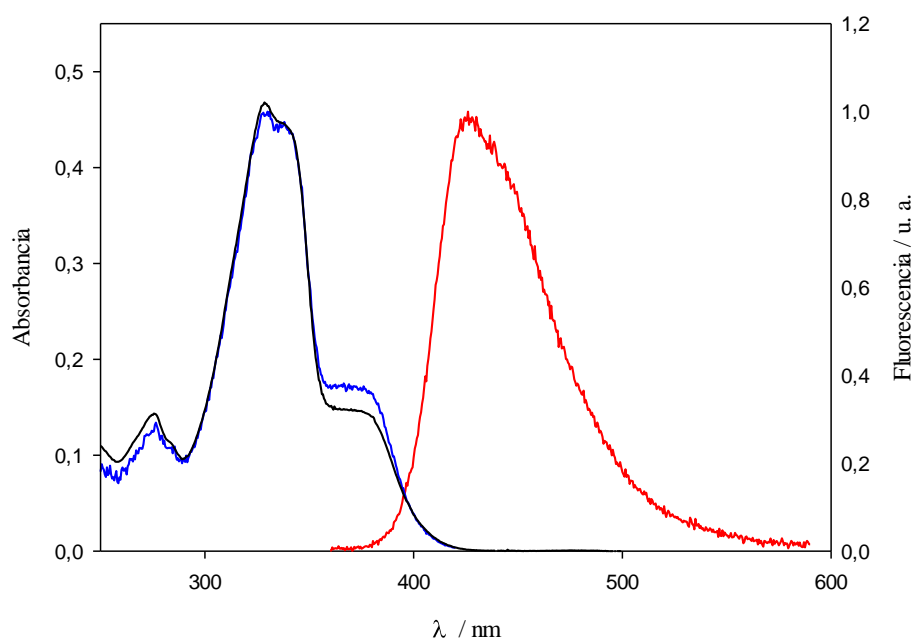
<sup>II</sup> Debe terse en conta, que no caso de que as medidas rexistradas de emisión e excitación non dependan da lonxitude de onda empregada, os espectros representados neste traballo serán os medidos ás lonxitudes de onda correspondentes aos máximos de intensidade. De non ser así, será aclarado oportunamente.

registro salvo certa emisión leve arredor de 370 nm cando se excitou na banda A, feito que pode ser atribuíble a certo grupo de moléculas nas que a transferencia protónica estea polo xeral impedida por enlaces de hidróxeno preexistentes entre a forma enólica e o disolvente, ou que están en conformación rotamérica (co grupo piridilo xirado 180°).

O solapamento da banda B de excitación co espectro de emisión con máximo a 450 nm, evidencia pola súa parte o feito de que unha mesma especie sexa responsable do sinal en estado fundamental e excitado, que neste caso atribuímos polo tanto ao tautómero ( $\mathbf{T} \rightarrow \mathbf{T}^*$ ), identificado previamente como responsable da banda B. Esta hipótese corroborouse con información recollida en publicacións previas<sup>44,45</sup>, onde tamén se fai referencia ao mecanismo tras este comportamento: xa que a especie enólica  $\mathbf{E}$  non é detectada no estado excitado como tal, esta debe de sufrir un proceso de tautomerización ultrarrápido a través de transferencia protónica intramolecular para producir o tautómero  $\mathbf{T}^*$  ( $\mathbf{E}^* \rightarrow \mathbf{T}^*$ ), que si é recoñecido (**Esquema 5.1**).

b) Trifluoroetanol:

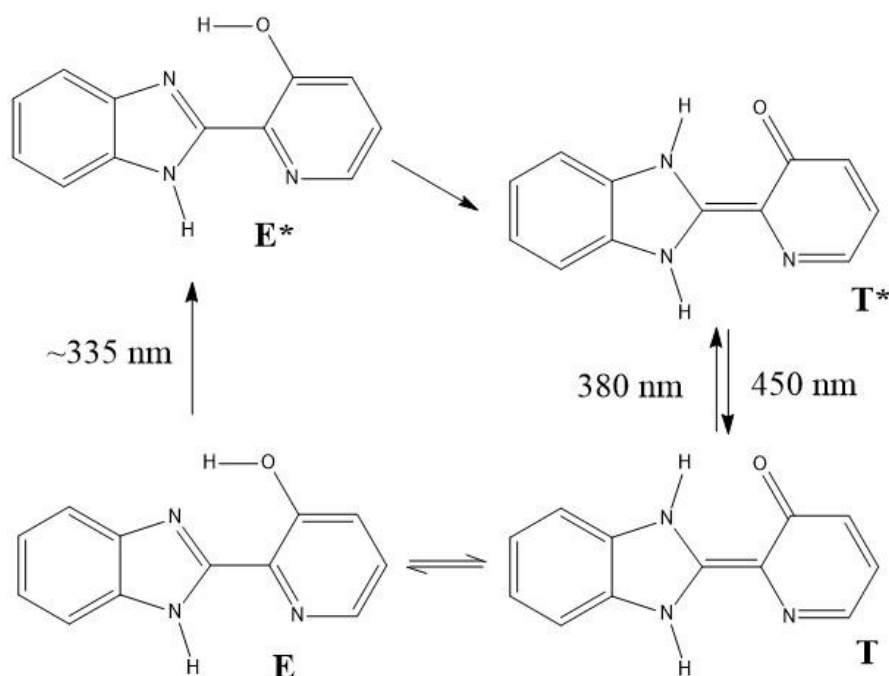
Empregando trifluoroetanol como disolvente (**Figura 5.7**), obtivéronse resultados moi semellantes aos rexistrados no medio acuoso neutro.



**Figura 5.7.** Espectros normalizados de excitación (en azul) e emisión (en vermello) de fluorescencia xunto coa absorción (en negro) para o HPyBI en trifluoroetanol neutro.

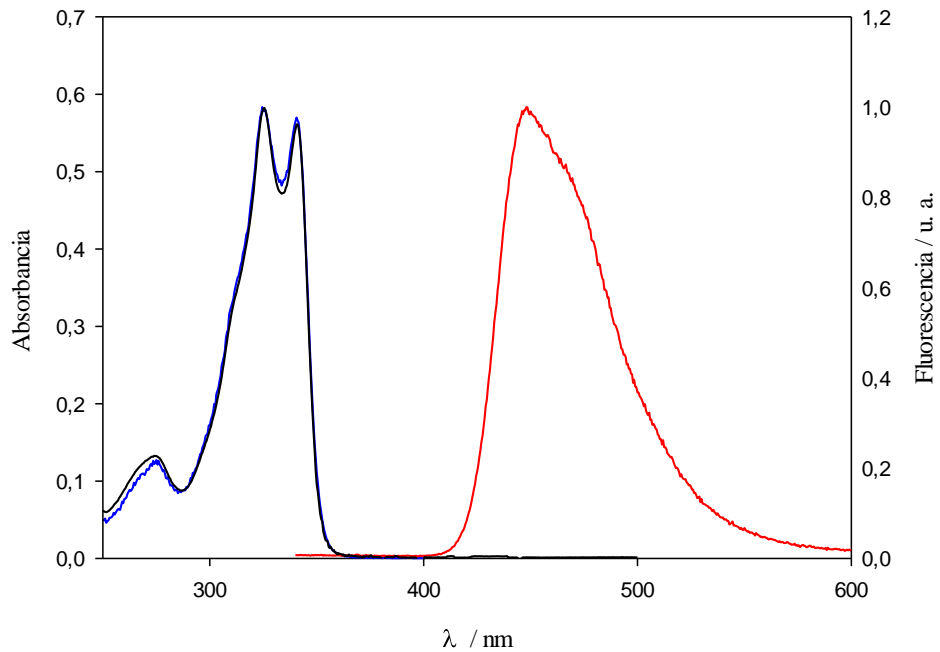
Atribúese a posición das dúas bandas de excitación de novo a un equilibrio no estado fundamental da forma enólica e o seu tautómero, sendo este último a especie presente en estado excitado e cuxa formación se atribúe tanto á excitación de **T** (**T**→**T**<sup>\*</sup>) como á tautomerización ultrarrápida de **E**<sup>\*</sup> (**E**<sup>\*</sup>→**T**<sup>\*</sup>) a través de transferencia protónica intramolecular (**Esquema 5.1**).

**Esquema 5.1.** Mecanismo de excitación e desactivación do HPyBI en medio acuoso e trifluoroetanol neutro.



c) Acetonitrilo:

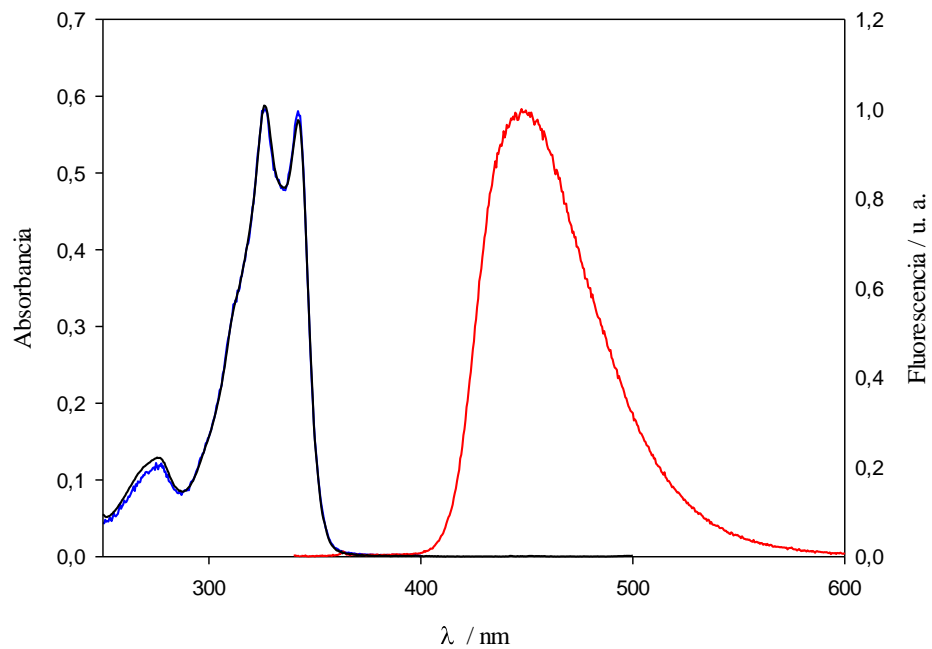
Cando o disolvente é acetonitrilo sen embargo, a situación torna (**Figura 5.8**). Os espectros de absorción e excitación seguen sendo coincidentes, mais neste caso a súa forma varía advertíndose ademais un desprazamento de Stokes anómalo entre este e a emisión, o que suxire a diferente natureza das moléculas responsables de cada un destes fenómenos. A banda de excitación B asociada ao tautómero **T**, desaparece en acetonitrilo, poñendo de manifesto a presenza única da forma enólica **E** no estado fundamental (dada a posición xa identificada en apartados anteriores da súa banda, A, a  $\sim 335$  nm), que non estará presente porén, no estado excitado, xa que debido á posición da banda de emisión, podemos atribuíla unicamente ao tautómero excitado **T**<sup>\*</sup>. Proponse unha vez máis para este a formación a partires da transferencia protónica intramolecular dende a especie enólica excitada (**E**<sup>\*</sup>→**T**<sup>\*</sup>) (**Esquema 5.2**).



**Figura 5.8.** Espectros normalizados de excitación (en azul) e emisión (en vermello) de fluorescencia xunto coa absorción (en negro) para o HPyBI en acetonitrilo neutro.

d) Etanol:

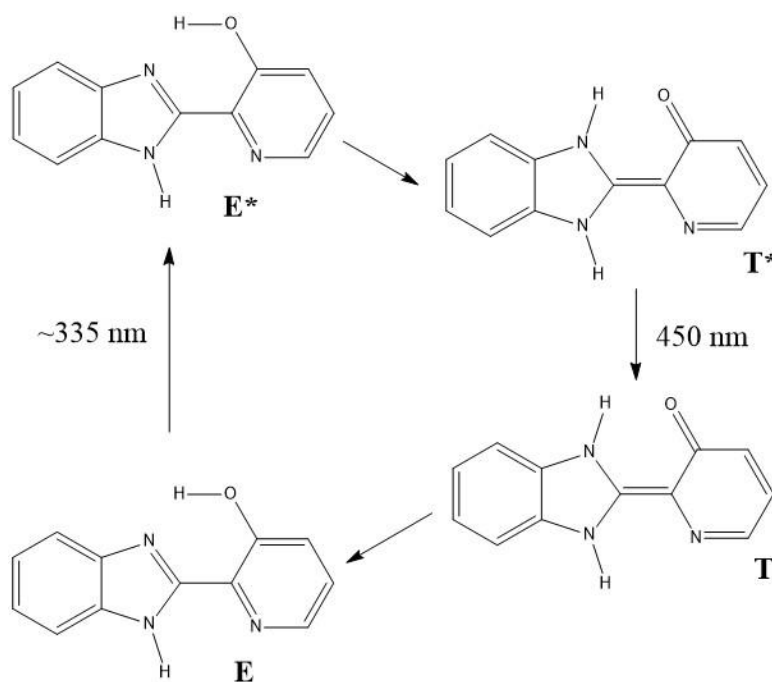
Para o caso do HPyBI en etanol, a situación é análoga á observada en acetonitrilo neutro (**Figura 5.9**).



**Figura 5.9.** Espectros normalizados de excitación (en azul) e emisión (en vermello) de fluorescencia fronte á absorción (en negro) para o HPyBI en etanol neutro.

A molécula adopta a forma enólica **E** no estado fundamental namentres que no primeiro estado excitado, é a forma tautomérica **T\*** quen emite (**Esquema 5.2**).

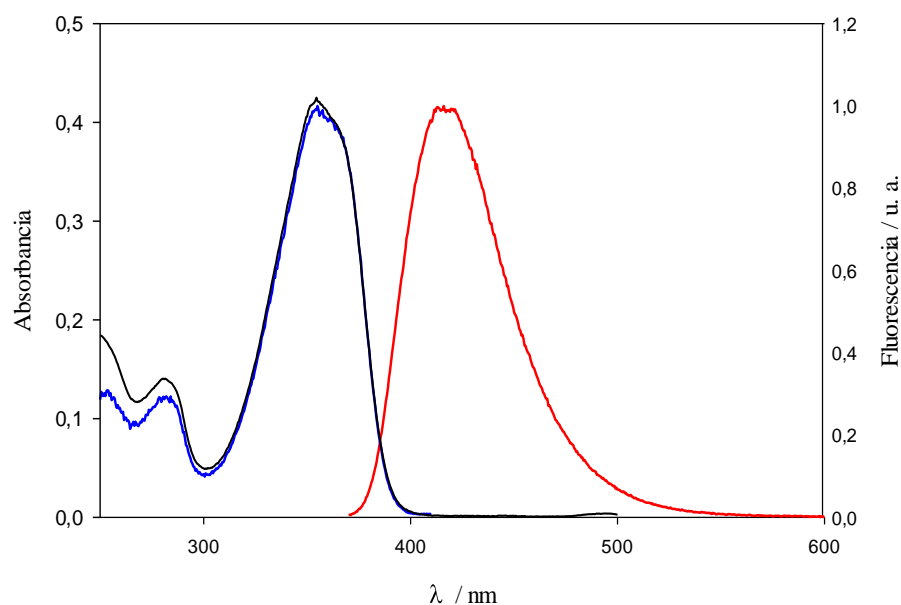
**Esquema 5.2.** Mecanismo de excitación e desactivación do HPyBI en etanol e acetonitrilo neutros.



### 5.2.2 Medio básico

A análise en medio básico limitouse ao emprego de auga como disolvente por mor da dificultade presentada para alcanzar tales valores de pH en acetonitrilo ou mesmo alcohois, amén de que o comportamento aniónico do HPyBI non presenta as peculiaridades propias da molécula en medio ácido, polo que o estudo en auga resulta suficiente para exemplificar tales resultados.

Cando a disolución acuosa se basifica (pH = 11,3), volve a observarse o solapamento entre os espectros de excitación e emisión. Sen embargo, como cabía esperar, a posición das bandas non coincide coa observada no medio neutro, e podemos atribuílas, debido ao cambio de pH, á presenza da forma aniónica da molécula, sendo estable tanto no estado fundamental coma no primeiro estado excitado (**Figura 5.10**).



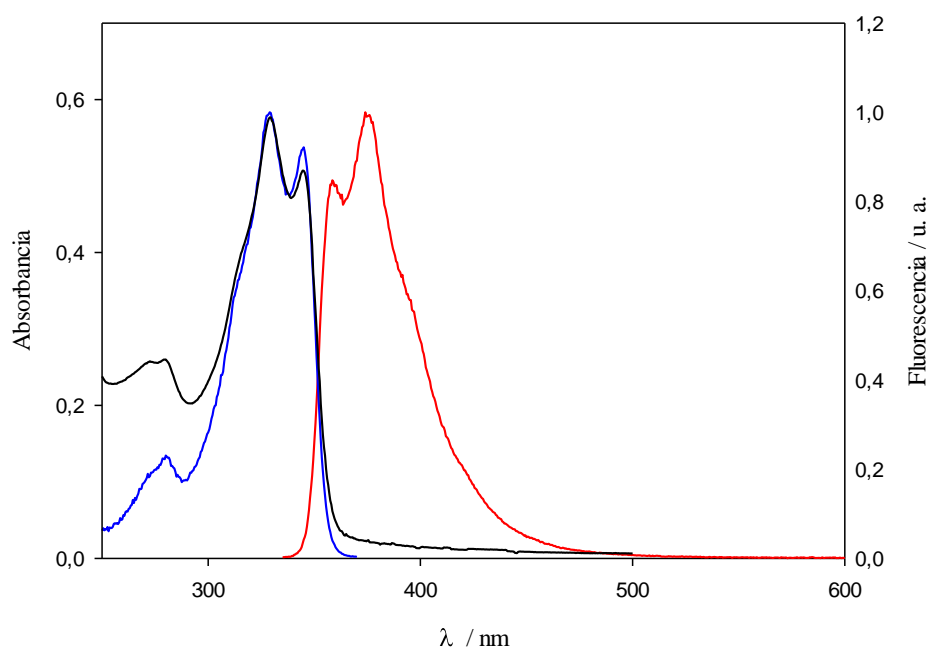
**Figura 5.10.** Espectros normalizados de excitación (en azul) e emisión (en vermello) de fluorescencia xunto coa absorción (en negro) para o HPyBI en medio acuoso básico.

### 5.2.3 Medio ácido

As medidas levadas a cabo neste apartado fixéronse baixo as condicións de  $\text{pH} = 3.66$ , salvo excepcións debidamente notificadas.

#### a) Acetonitrilo:

Comezando a análise polo caso da disolución do HPyBI en acetonitrilo acidificada (**Figura 5.11**), observamos que as bandas de excitación e emisión amosan un desprazamento de Stokes normal. Neste caso, debido á similitude do espectro de absorción e excitación, arredor de 330 nm, cos da forma enólica **E** en medio neutro (*subepígrafe 5.2.1*, apartado *c*), e tendo en conta as condicións de  $\text{pH}$ , podemos afirmar que a molécula se presenta monoprotónada como catión enólico **CE** ( $\text{p}K_a = 5,00$ )<sup>45</sup>, tanto no estado fundamental como no excitado, xa que as bandas de excitación e emisión se solapan, sendo a súa forma **CE\*** polo tanto, a responsable da banda de emisión.

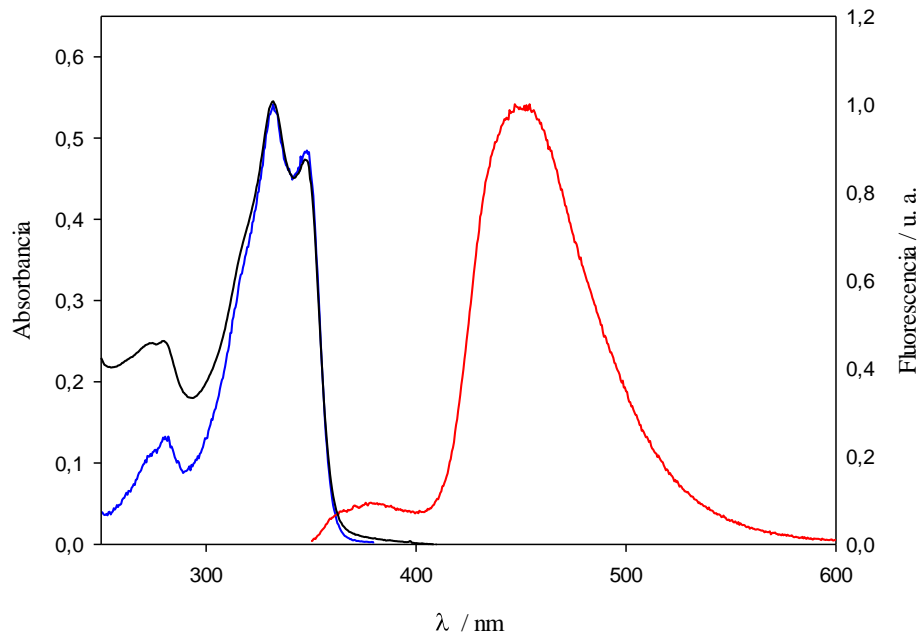


**Figura 5.11.** Espectros normalizados de excitación (en azul) e emisión (en vermello) de fluorescencia xunto coa absorción (en negro) para o HPyBI en acetonitrilo ácido.

b) Etanol:

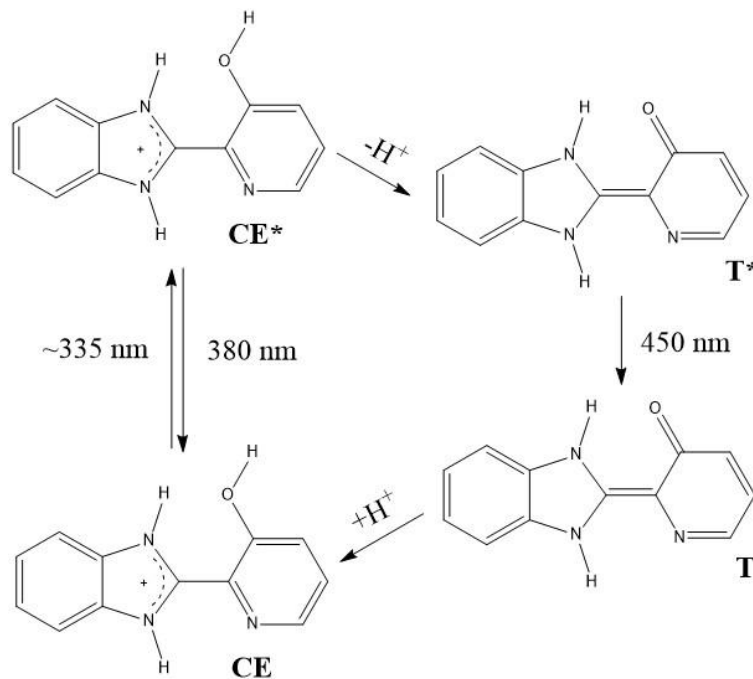
Cando o disolvente é etanol en medio ácido (**Figura 5.12**), prodúcese de novo a mesma situación no que respecta ao espectro de excitación, unha vez máis, coincidente co de absorción e atribuído á forma de catión enólico **CE** pola posición da banda en analogía co caso anterior. Sen embargo, a emisión de fluorescencia nesta ocasión presenta dúas bandas que suxiren a presenza de dúas estruturas emisoras diferentes. A primeira e menor delas, ao aparecer solapando a excitación do catión enólico **CE**, pode atribuírse á mesma especie **CE\*** emitindo dende o estado excitado, o que se confirma pola coincidencia ademais, coa banda de emisión de **CE\*** observada anteriormente en acetonitrilo. Sen embargo, a segunda banda, máis intensa e desprazada cara o vermello (a 450 nm), coincide de maneira case exacta coa posición xa identificada da emisión do tautómero excitado **T\*** (*subepígrafe 5.2.1*), polo que, como se propuxo en estudos previos, no estado excitado se debe dar un proceso de desprotonación (consecuencia do aumento da acidez do grupo) para permitir o paso de **CE\*** a **T\*** (**Esquema 5.3**).





**Figura 5.12.** Espectros normalizados de excitación (en azul) e emisión (en vermello) de fluorescencia xunto coa absorción (en negro) para o HPyBI en etanol ácido.

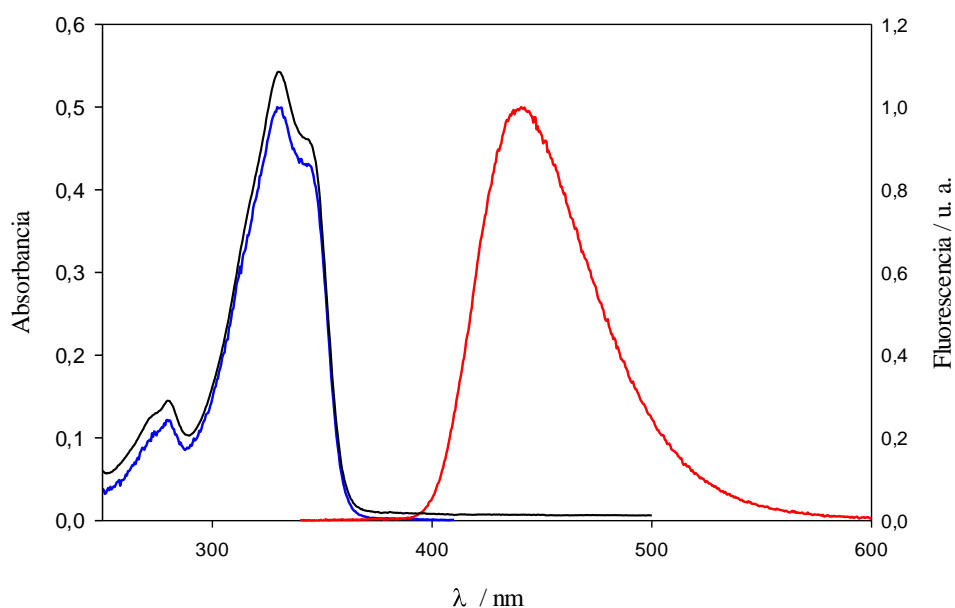
**Esquema 5.3.** Mecanismo de excitación e desactivación do HPyBI en etanol acidificado.



c) Auga:

Empregando auga como disolvente en medio ácido (**Figura 5.13**), a pesar de que os espectros de absorción e excitación seguen a aparecer na posición atribuída ao catión enólico **CE** a 330nm, un desprazamento anómalo de Stokes separa a banda de emisión,

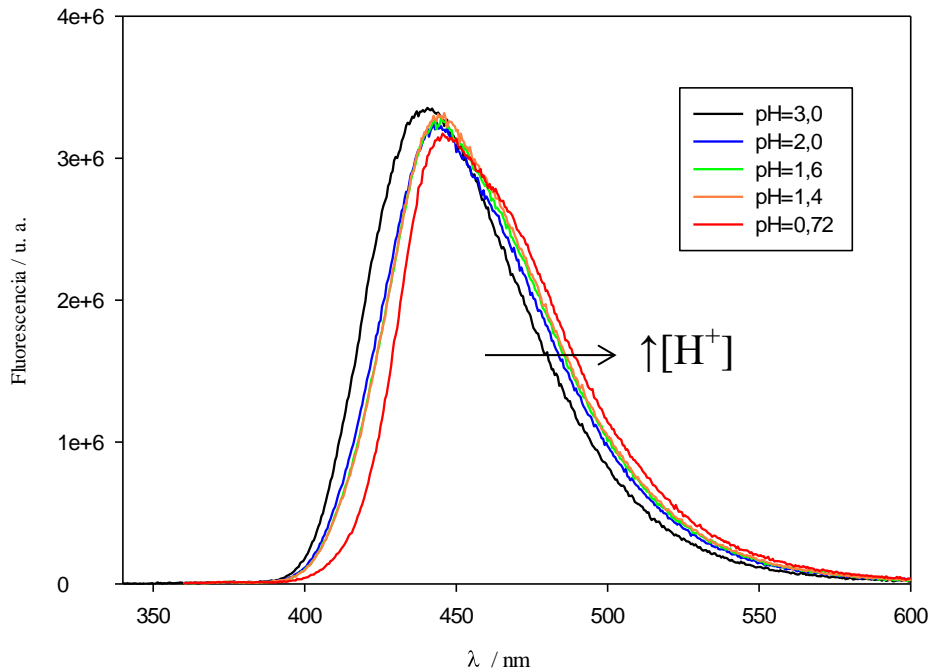
poñendo de manifesto a diferenza entre a especie presente no estado fundamental e a emisora dende o estado excitado. Como sucedía coa segunda banda do espectro de emisión en etanol, a posición é coincidente coa da forma do tautómero excitado **T\*** para, neste caso, a emisión en medio ácido acuoso.



**Figura 5.13.** Espectros normalizados de excitación (en azul) e emisión (en vermello) de fluorescencia xunto coa absorción (en negro) para o HPyBI en medio acuoso ácido.

En vista desto, leváronse a cabo unha serie de medidas a distintos pHs onde se estudou o efecto sobre o espectro de emisión do aumento de acidez do medio (**Figura 5.14**), xa que de ser o tautómero **T\*** a única posible especie emisora presente no estado excitado, a forma deste espectro debería manterse invariable fronte ao cambio.

Engadíronse para este propósito cantidades sucesivas de HCl ( $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ ) e HClO<sub>4</sub> ( $5,16 \text{ mol dm}^{-3}$ ).

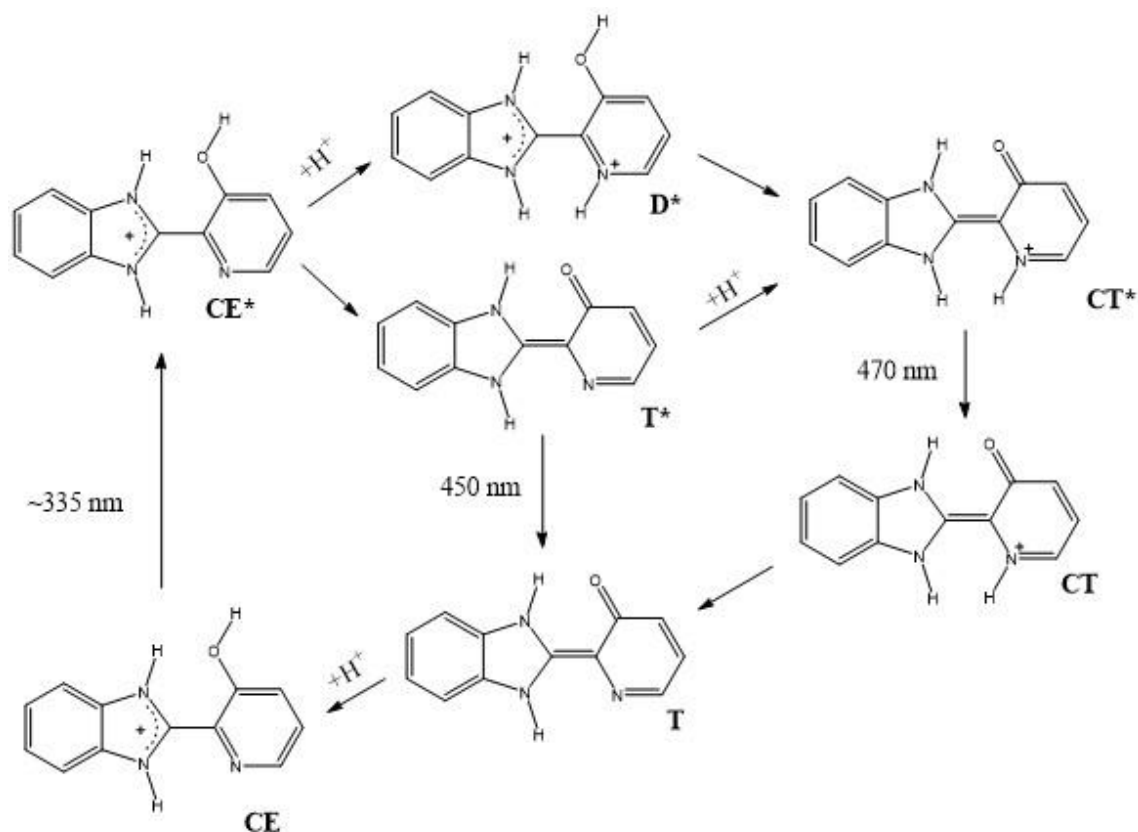


**Figura 5.14.** Espectros de emisión rexistrados a distintos pH.

Observouse así unha dependencia clara, manifestada nun desprazamento cara o vermello da banda a medida que se produce a diminución do pH. Este feito é atribuíble á aparición progresiva dunha nova especie dependente da concentración de  $H^+$ , que descartado o dicatión  $D^*$ , debido ao baixo valor do  $pK_a$  da segunda protonación (-1,58)<sup>45</sup>, e o catión enólico  $CE^*$ , por desemeianza entre o seu máximo a 370 nm e o da banda observada a ~470 (a pesar de ser esta a única especie presente no estado fundamental), se asigna a  $CT^*$ , como resultado da protonación de  $T^*$  tralo aumento da basicidade no estado excitado do nitróxeno piridínico. Esta hipótese corroborouse coa información de publicacións previas sobre o tema<sup>45</sup>, onde se fai referencia ademais, á contribución á presenza de  $CT^*$  no estado excitado como resultado da rápida desprotonación do dicatión  $D^*$  formado a partir de  $CE^*$ , trala protonación deste. Como se detalla no estudo, o dicatión  $D^*$  presenta un tempo de vida moi curto, ou polo menos inferior á resolución do equipo xa que non se detecta fluorescencia emitida dende tal forma. Propuxéronse así dúas vías para a obtención de  $CT^*$  no estado excitado, por unha parte a desprotonación de  $CE^*$  para dar  $T^*$ , tamén emisora, e que a través do quenching por protóns produce o catión tautomérico; e por outra banda a protonación de  $CE^*$  para dar o dicatión  $D^*$  que axiña se desprotona para dar así mesmo  $CT^*$  (Esquema 5.4). En definitiva, o espectro de emisión para a dilución de HPyBI en

medio acuoso ácido será resultado das contribucións de **T\*** e **CT\***, variantes en función do pH da disolución.

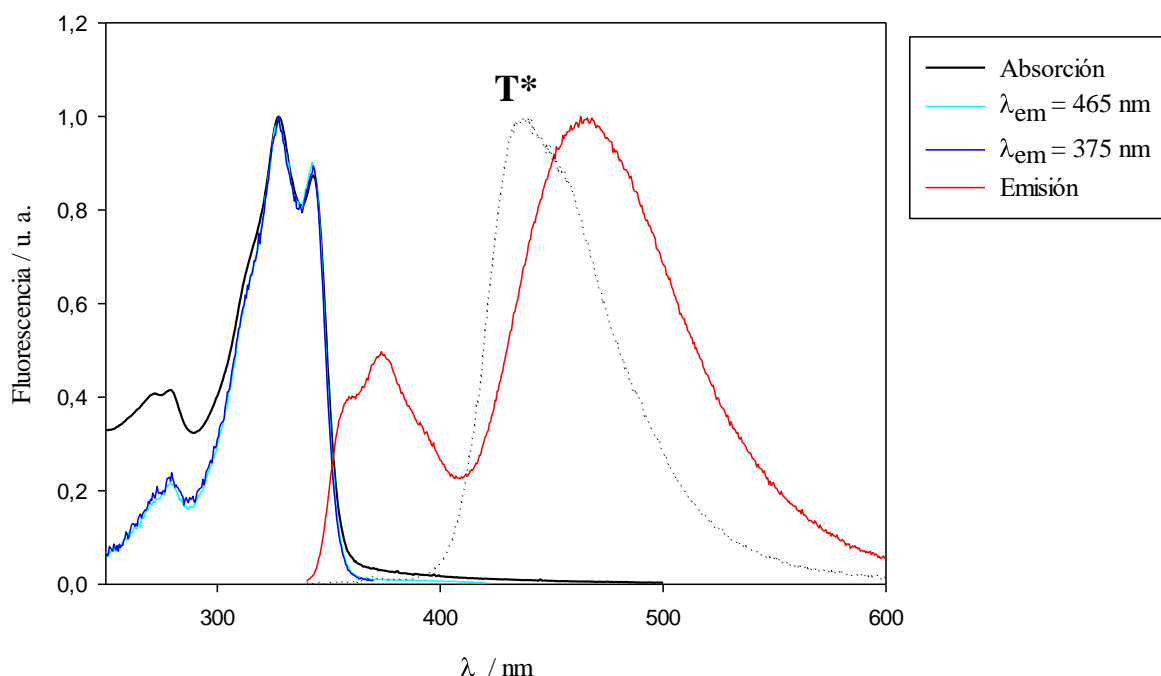
*Esquema 5.4. Mecanismo de excitación e desactivación do HPyBI en medio acuoso ácido.*



d) Trifluoroetanol:

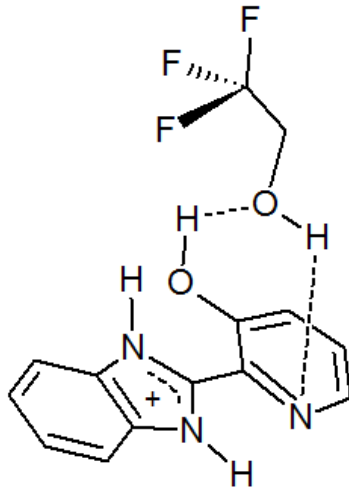
O comportamento do HPyBI en trifluoroetanol acidificado, é sen embargo singular (**Figura 5.15**). Obsérvase que unha vez máis, o catión enólico **CE** é a especie máis estable no estado fundamental, debido á posición, xa coñecida, dos seus espectros de absorción e excitación a 330 nm, que ademais é independente da lonxitude de onda empregada para o seu rexistro. Sen embargo, o espectro de emisión presenta dúas bandas diferenciadas, aparecendo unha delas, de menor intensidade, solapando ao espectro de excitación. Atribuímos polo tanto este fenómeno á presenza do catión enólico **CE\***, que convivirá no estado excitado con outra especie responsable da segunda banda. Así e todo, a pesar de que a primeira vista semellase que se está a repetir a situación do HPyBI en etanol acidificado (*subepígrafe 5.2.3*, apartado *b*), onde as especies fluorescentes no estado excitado eran tanto o **CE\*** como a forma

tautomérica excitada, neste caso, o máximo desta segunda banda, non coincide co atribuído a  $T^*$ , a 440 nm, senón que está lixeiramente desprazado cara o vermello (465 nm). Porén, debido á análise levada a cabo previamente en medio acuoso sobre o efecto do pH (*subepígrafe 5.2.3*, apartado *c*), coñecemos a posibilidade de que sexa o catión tautomérico  $CT^*$ , cuxa banda aparece a 470 nm efectivamente desprazada cara o vermello con respecto a  $T^*$ , a especie emisora de fluorescencia en trifluoroetanol, xunto con  $CE^*$ .



**Figura 5.15.** Espectros normalizados de excitación (en azul) e emisión (en vermello) de fluorescencia xunto coa absorción (en negro) para o HPyBI en trifluoroetanol ácido, comparados co espectro de emisión do HPyBI en trifluoroetanol neutro (en liña de puntos).

Para que este fose o caso, debería levarse a cabo un proceso de transferencia protónica intramolecular directo entre o  $H^+$  do grupo hidroxilo e o nitróxeno da posición piridílica, sen pasar pola especie intermedia  $T^*$ , que non se detecta como emisora de fluorescencia no espectro. Proponse polo tanto un proceso asistido polo disolvente (**Figura 5.16**), no que o trifluoroetanol, debido á súa estrutura molecular e carácter ácido condicionado pola electronegatividade do grupo trifluorometilo, é capaz de obrar como ponte entre os grupos involucrados na transferencia protónica, o que daría explicación á maneira directa en que se produce o fenómeno.

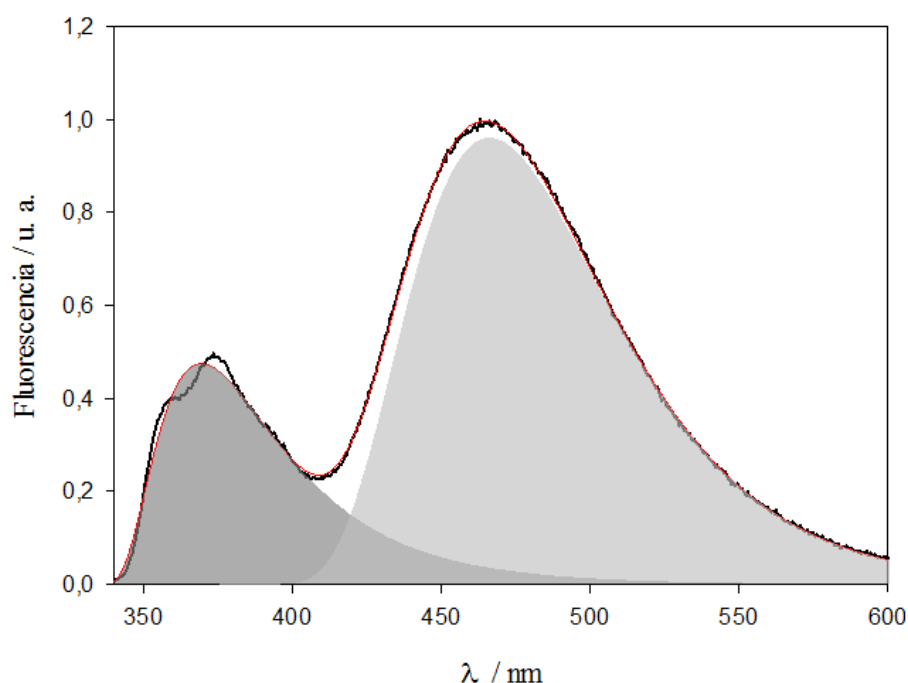


**Figura 5.16.** *Proceso de transferencia protónica asistida polo trifluoroetanol que obra como ponte entre o hidroxilo e o nitróxeno piridínico do catión enólico do HPyBI (advirtase que as distancias de enlace non responden a valores optimizados).*

Levou-se a cabo ademais o axuste do espectro de emisión a dúas funcións logaritmo normal<sup>48</sup> co fin de visualizar as diferentes contribucións a este das especies presentes no estado excitado, **CE\*** e **CT\***. Utilizando as funcións (5.3) e (5.4), púidose obter a representación gráfica (**Figura 5.17**) onde se observa a validez do axuste e a participación de ambas formas.

$$f = h e^{-\ln(2)\left(-\frac{\ln(M)}{b}\right)^2} \quad (5.3) \quad \text{onde} \quad M = 1 + \frac{2b(x-x_0)}{d} \quad (5.4)$$

Nas expresións empregadas para levar a cabo o axuste, o  $h$  representa a intensidade de fluorescencia relativa máxima,  $b$  o parámetro de asimetría,  $x$  é a lonxitude de onda,  $x_0$  a lonxitude de onda do máximo e  $d$  a anchura de banda.



**Figura 5.17.** Espectro experimental de emisión do HPyBI en trifluoroetanol acidificado representado por unha liña negra, fronte ao axuste logarítmico total en vermello e para cada banda en tons grises.

**Táboa 5.2.** Parámetros  $x_0$ ,  $d$ ,  $b$  e  $h$  obtidos do axuste das dúas bandas do espectro de emisión do HPyBI en trifluoroetanol ácido a dúas funcións logaritmo normal.

	<b>Banda 1</b>	<b>Banda 2</b>
<b><math>x_0</math> / nm</b>	369,39(15)	465,764(88)
<b><math>d</math> / nm</b>	48,49(32)	80,12(18)
<b><math>b</math></b>	0,674(15)	0,4434(36)
<b><math>h</math></b>	0,4746(18)	0,9602(22)

### 5.3 Medidas de fluorescencia resolta no tempo

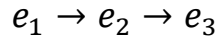
Debido ao seu singular comportamento e á falta de estudos previos afondando no proceso levado a cabo neste medio, realizáronse as análises de fluorescencia con resolución temporal para o caso da disolución de HPyBI en trifluoroetanol, tanto no medio neutro como ácido.

#### 5.3.1 Trifluoroetanol neutro

##### a) Axuste exponencial

Representados na **Figura 5.18**, obsérvanse os resultados de fluorescencia resolta no tempo obtidos para a disolución de HPyBI en trifluoroetanol neutro. Os datos

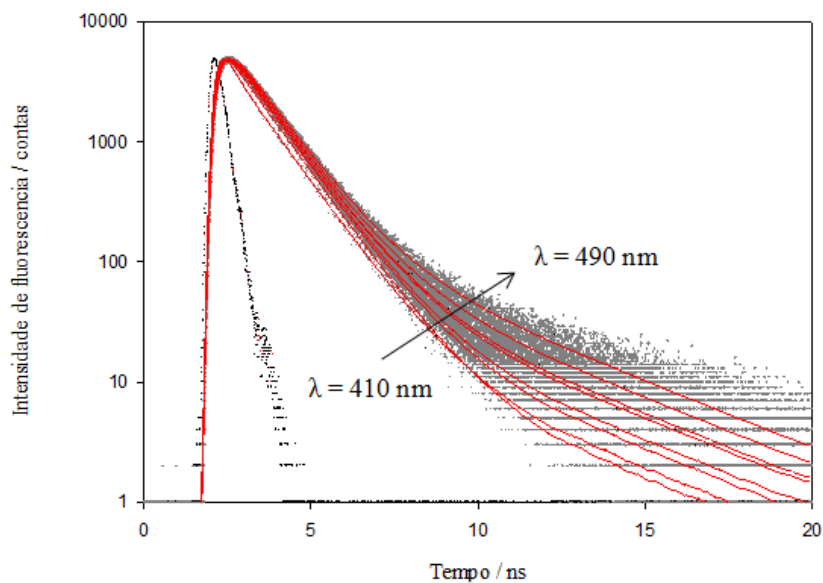
experimentais, representados en gris, amosaron un comportamento multiexponencial sinal dunha cinética complexa, de xeito que se axustaron a tres exponenciais, representando o resultado de dito axuste en vermello, segundo a seguinte formulación:



De maneira que o decaemento de fluorescencia se pode expresar como un sumatorio de exponenciais segundo:

$$F(t, \lambda) = \sum_{i=1}^3 a_i(\lambda) \cdot e^{-t/\tau_i} \quad (5.5)$$

onde  $\tau_i$  son os tempos de vida e  $a_i$  factores preexponenciais. A partir do axuste a esta función puidéranse obter os valores recollidos na **Táboa 5.3** para os tempos de vida.



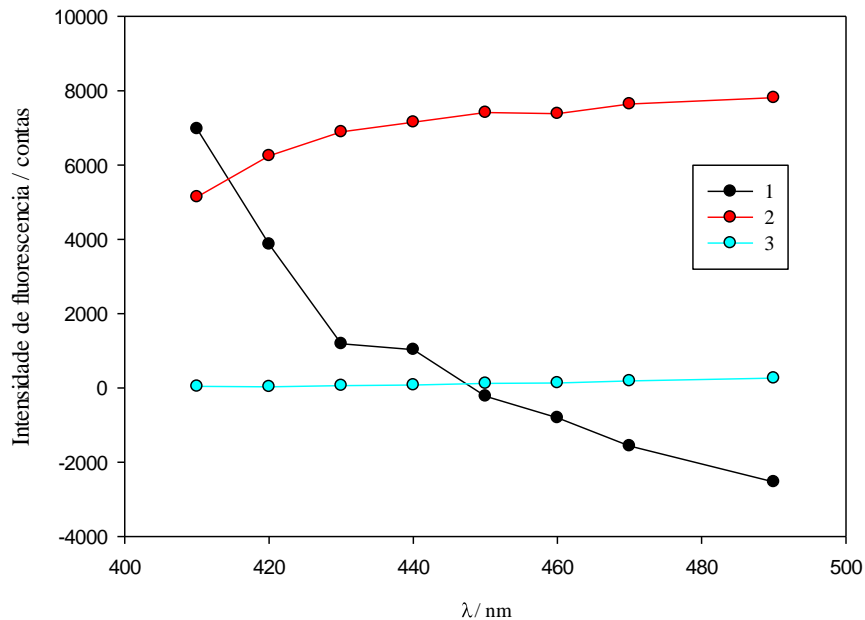
**Figura 5.18.** Decaemento de fluorescencia para o HPyBI en trifluoroetanol neutro. Representados en gris os datos experimentais, en negro o perfil de excitación e en vermello o resultado dos axustes obtidos para cada lonxitude de onda dende 410 a 490 nm, en intervalos de 10 nm salvo no último caso no que se da un salto de 20 nm. Os residuos ponderados para cada lonxitude de onda recóllense no **Anexo 1**.

**Táboa 5.3.** Valores dos tempos de vida  $\tau_1$ ,  $\tau_2$  e  $\tau_3$  obtidos (cun erro do 10%) para o HPyBI en trifluoroetanol neutro resultado do axuste triexponencial.

$\tau_1$ / ns	$\tau_2$ / ns	$\tau_3$ / ns
0,16	1,00	3,87

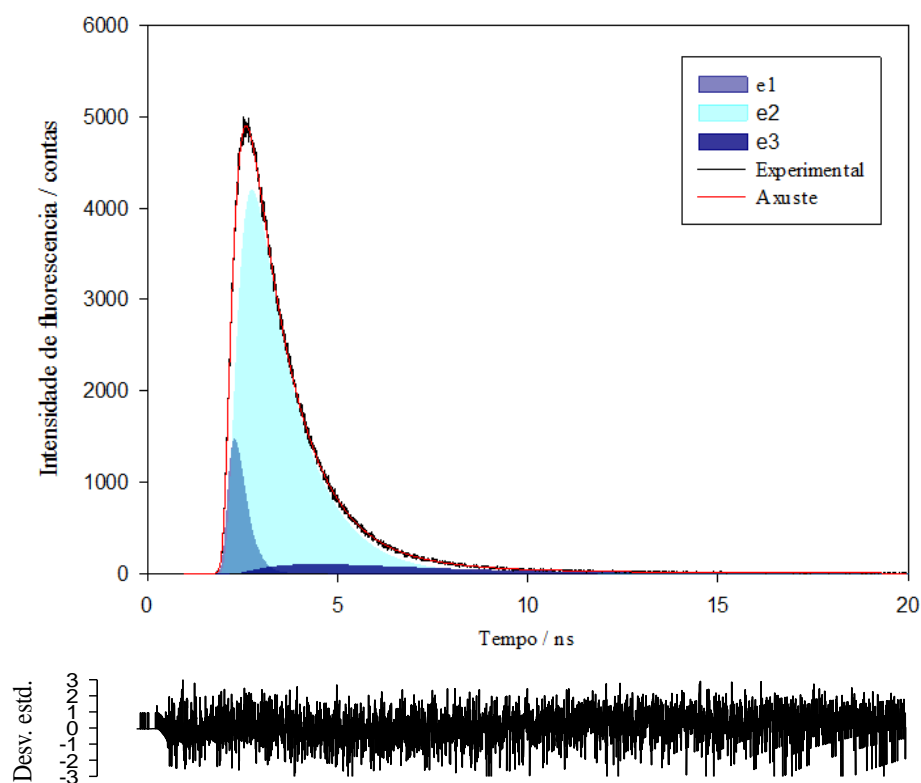


Ademais, segundo os datos representados na **Figura 5.19**, onde se recollen as amplitudes para cada unha das exponenciais involucradas en función da variación da lonxitude de onda, podemos analizar como se produce a contribución de cada unha delas. Así, obsérvase que a medida que aumenta  $\lambda$ , a contribución de  $e_1$  comeza a diminuír chegando a valores negativos o que implica a consecución de  $e_2$ , mentres que  $e_3$  sen embargo só comeza a contribuír a maiores lonxitudes de onda.



**Figura 5.19.** Contribucións de cada unha das exponenciais implicadas no axuste en función da lonxitude de onda. Representada en negro,  $e_1$ , en vermello  $e_2$ , e en azul  $e_3$ .

Como exemplo visual da validez do axuste, na **Figura 5.20** pode observarse a contribución de cada unha das exponenciais para a medida realizada a 490 nm, onde se evidencia este mesmo fenómeno.



**Figura 5.20.** Contribucións de cada unha das exponenciais propostas ao axuste global da mostra excitada a 490 nm, en vermello. Représéntase o código de cores na lenda. Baixo a gráfica, os residuos ponderados.

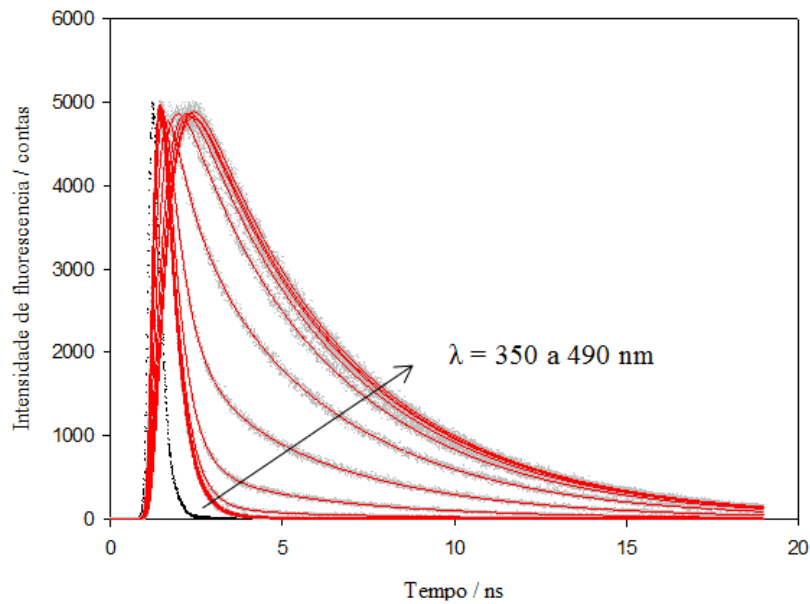
### 5.3.2 Trifluoroetanol ácido

#### a) Axuste exponencial

Do mesmo xeito ca no caso do medio neutro, para o HPyBI en trifluoroetanol acidificado con  $[H^+] = 1,5 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$  (observándose que a variación de 10 e 100 ordes de magnitude non afectaron á medida) os datos experimentais (**Figura 5.21**) mostrando un comportamento non monoexponencial, axustáronse a catro exponenciais como sigue,

$$e_1 \rightarrow e_2 \rightarrow e_3 \rightarrow e_4$$

de xeito que o axuste global respondera unha vez máis a (5.5) neste caso con  $i = 4$ . Obtivéronse así os tempos de vida  $\tau_1$ ,  $\tau_2$ ,  $\tau_3$  e  $\tau_4$  recollidos na **Táboa 5.4**.



**Figura 5.21.** Decaemento de fluorescencia para o HPyBI en trifluoroetanol ácido ( $[H^+] = 1.5 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ ). Representados en gris os datos experimentais, en negro o perfil de excitación e en vermello o resultado dos axustes obtidos para cada lonxitude de onda dende 350 a 490 nm, en intervalos de 10 nm. Os residuos ponderados para cada lonxitude de onda recóllense no **Anexo 1**.

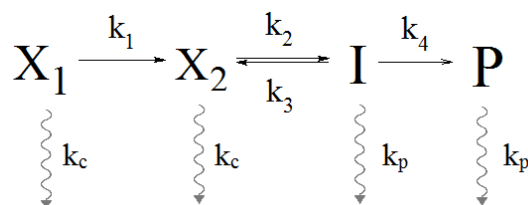
**Táboa 5.4.** Valores dos tempos de vida  $\tau_1$ ,  $\tau_2$ ,  $\tau_3$  e  $\tau_4$  obtidos (cun erro do 10%) para o HPyBI en trifluoroetanol ácido ( $[H^+] = 1.5 \cdot 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ ) resultado do axuste tetraexponencial.

$\tau_1 / \text{ns}$	$\tau_2 / \text{ns}$	$\tau_3 / \text{ns}$	$\tau_4 / \text{ns}$
0,175	0,392	1,020	4,603

b) Axuste a un modelo de especies

Paralelamente, para corroborar os resultados obtidos en relación ao mecanismo proposto de transferencia protónica asistida polo disolvente, propúxose un método de axuste alternativo apoiándose no modelo de comportamento presentado no **Esquema 5.5**.

**Esquema 5.5.** Mecanismo de reacción proposto para o HPyBI en trifluoroetanol ácido.



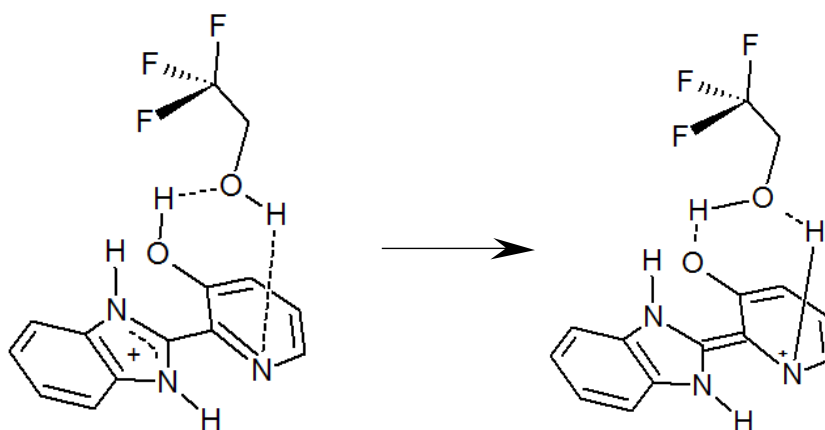
onde as especies  $X_1$  e  $X_2$  corresponden aos primeiros estadios da achega do trifluoroetanol ao HPyBI como catión enólico  $CE^*$  ( $X_1$ ), adquirindo o disolvente a conformación axeitada para a formación dunha ponte que se comeza a formar ( $X_2$ , na **Figura 5.22**) entre o hidroxilo e o nitróxeno piridífico. O I, representa o intermedio que se forma co trifluoroetanol virtualmente unido ao HPyBI (**Figura 5.22**), momentos previos á formación de P, o produto, cando a molécula de disolvente se separa unha vez realizada a transferencia protónica para producir o catión  $CT^*$ .

En base ao desenvolvemento deste modelo recollido no **Anexo II**, obtivéronse as constantes para os procesos de activación e desactivación involucrados no mecanismo proposto, recollidas na **Táboa 5.5.**, e os tempos de vida a partir destas (**Táboa 5.6**).

**Táboa 5.5.** Valores das constantes de velocidade  $k_1$ ,  $k_2$ ,  $k_3$ ,  $k_4$ ,  $k_c$  e  $k_p$  do proceso de ESIPT para o HPyBI asistido polo trifluoroetanol en medio ácido ( $[H^+] = 1.5 \cdot 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ ) obtidas cun erro do 10% como resultado do axuste ao modelo de catro especies.

$k_1 / \text{ns}^{-1}$	$k_2 / \text{ns}^{-1}$	$k_3 / \text{ns}^{-1}$	$k_4 / \text{ns}^{-1}$	$k_c / \text{ns}^{-1}$	$k_p / \text{ns}^{-1}$
2,13	4,10	0	1,16	0,49	0,50

Cabe destacar o valor 0 de  $k_3$ , indicativo de que o paso de  $X_2$  a I é realmente irreversible (**Figura 5.22**):

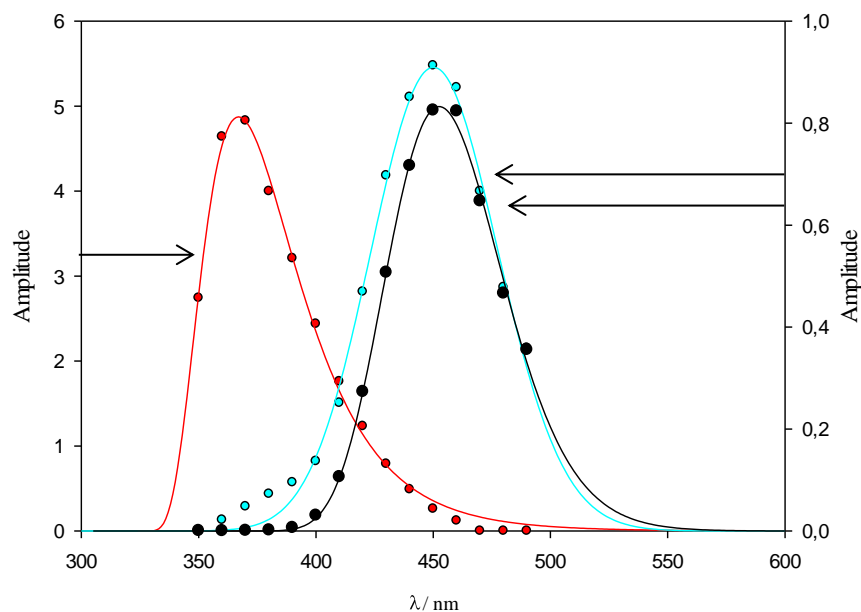


**Figura 5.22.** Proceso de evolución da especie  $X_2$  a I (advirtase que as distancias de enlace non responden a valores optimizados).

**Táboa 5.6.** Valores dos tempos de vida  $\tau_1$ ,  $\tau_2$ ,  $\tau_3$  e  $\tau_4$  obtidos para o HPyBI en trifluoroetanol ácido.

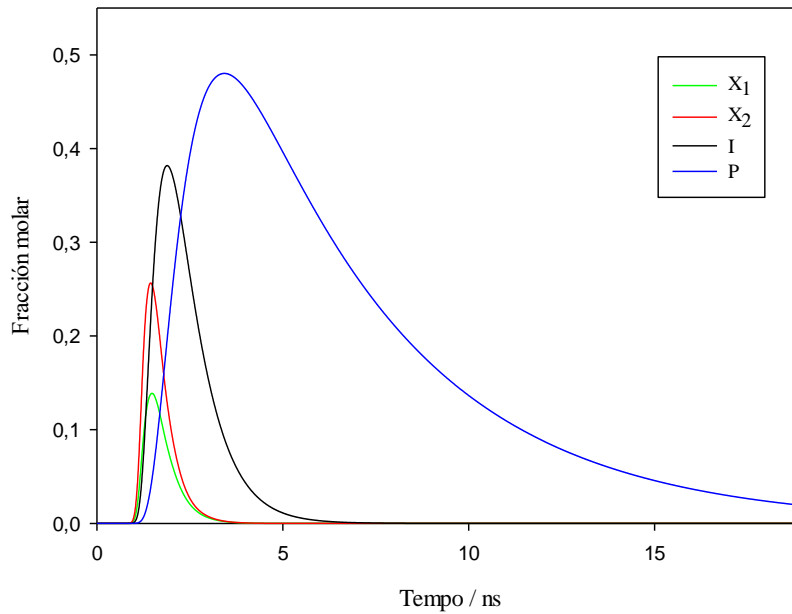
$\tau_1 / \text{ns}$	$\tau_2 / \text{ns}$	$\tau_3 / \text{ns}$	$\tau_4 / \text{ns}$
0,217	0,381	0,725	4,570

Reafírmase polo tanto a validez do mecanismo de transferencia protónica intramolecular no estado excitado asistida polo disolvente, proposto no *Subepígrafe* 5.2.3, apartado *d*, xa que a suposición das catro especies  $X_1$ ,  $X_2$ , I, e P correspondentes ás distintas fases en que se puidese levar a cabo dito proceso, non só cadra na obtención de tempos de vida similares ao modelo tetraexponencial senón que a posición de cada unha das especies coincide de maneira acertada coas bandas do espectro de emisión do HPyBI en trifluoroetanol ácido (**Figura 5.23**). Así,  $X_1$ ,  $X_2$ , emiten arredor de 370 nm, na mesma rexión que se rexistra a banda asociada ao catión enólico  $CE^*$ , que segundo este modelo estaría a adquirir a conformación adecuada para a transferencia protónica co disolvente. Pola súa parte, ratificando a hipótese, a emisión do intermedio I e o produto P (que podemos atribuír xa ao  $CT^*$ ) coinciden coa banda correspondente ao catión tautomérico, dando conta da última fase do proceso de transferencia protónica intramolecular tralo paso do intercambio do protón dende a posición hidroxílica ao N piridínico e separación da molécula do disolvente.



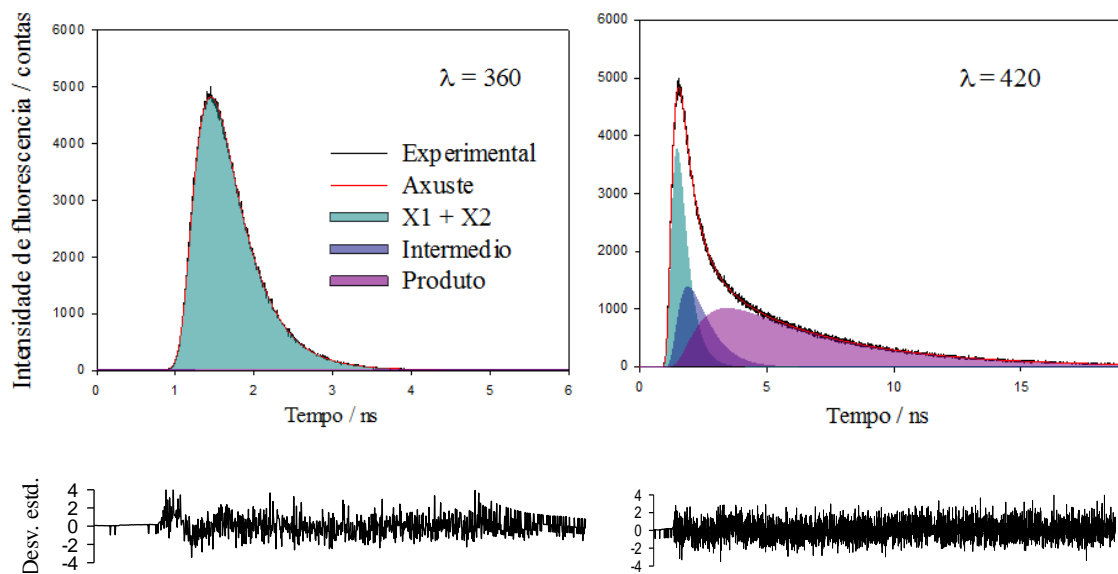
**Figura 5.23.** Contribución de cada unha das especies involucradas no axuste en función da lonxitude de onda. Représéntanse en vermello as especies  $X_1$ ,  $X_2$ , en azul o intermedio I e en negro o P. Adaptouse a representación de forma que o eixo esquerdo corresponde á amplitude as especies  $X_1$ ,  $X_2$ , mentres que o dereito pertence a I e P.

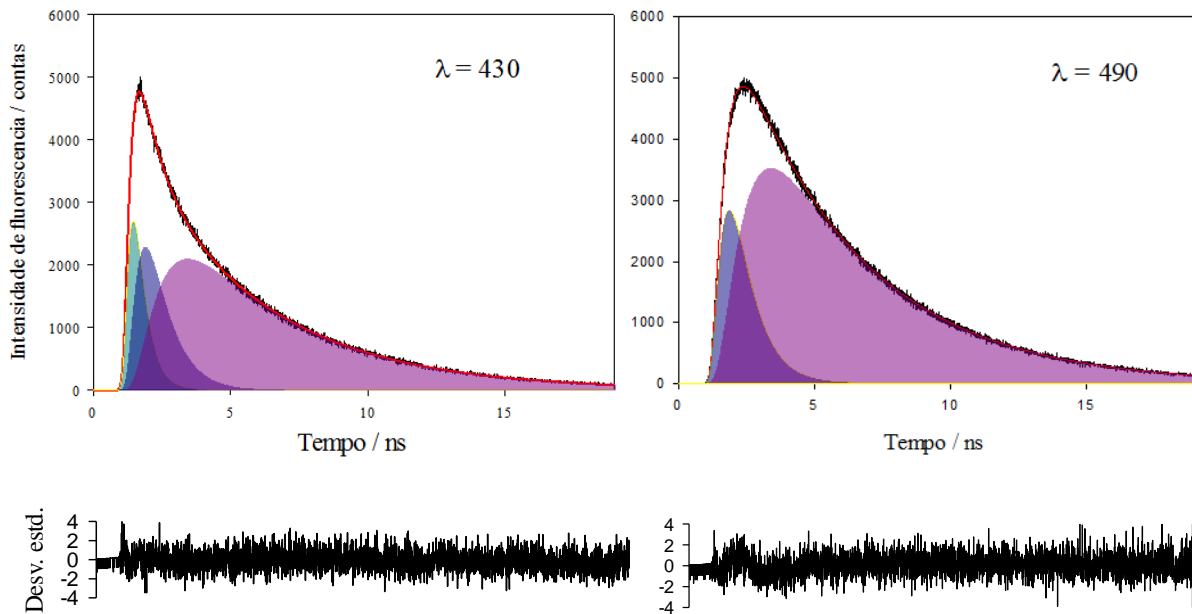
De xeito complementario, é posible visualizar a evolución temporal destas especies (**Figura 5.24**) de maneira que se observa como partindo de  $X_1$  e  $X_2$ , estas dan paso ao intermedio I e finalmente ao produto P, que se mantén no tempo.



**Figura 5.24.** Evolución temporal das especies que conforman o modelo de axuste:  $X_1$  (en verde),  $X_2$  (en vermello),  $I$  (en negro) e  $P$  (en azul,) representadas como a fracción molar de cada unha, obtidas como resultado do axuste a catro especie, en función do tempo de medida transcorrido.

Recolléronse por último, de xeito individual, as contribucións das especies involucradas no modelo a distintas lonxitudes de onda (**Figura 5.25**) co fin de visualizar detalladamente a maneira en que o proceso proposto neste traballo xustifica a información obtida a través de tanto medidas de fluorescencia en estado estacionario como resolta no tempo.





**Figura 5.25** . Decaementos de fluorescencia para o HPyBI en trifluoroetanol ácido ( $[H^+] = 1,5 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ ) en negro, o axuste global combinación do aporte de cada especie en vermello, e as contribucións independentes de cada unha: representadas en azul turquesa  $X_1$  e  $X_2$ , en azul escuro o intermedio I, e en morado o produto P.

Obsérvase así, do mesmo xeito que se recollía na **Figura 5.19**, como a menores lonxitudes de onda (360 nm) a contribución é case completamente atribuíble ás especies  $X_1$  e  $X_2$ , mentres que o decaemento destas torna máis rápido conforme o valor da lonxitude de onda aumenta, aparecendo entón as contribucións de I e P, acompañadas do agardado incremento na súa intensidade a lonxitudes de onda máis altas (490 nm).

## 6. CONCLUSIÓNS

Neste traballo estudouse o comportamento do 2-(3'-hidroxi-2'-piridil)bencimidazol (HPyBI) a través de medidas de absorción UV-Vis e fluorescencia de estado estacionario e con resolución temporal en varios disolventes e valores de pH, investigando os procesos de transferencia protónica involucrados en cada caso. A análise dos resultados obtidos permitiu extraer as seguintes conclusións:

- 1) En medio acuoso e trifluoroetanólico neutro, a forma enólica **E** do HPyBI atópase en equilibrio co correspondente tautómero **T** no estado fundamental. No estado excitado sen embargo, a única especie presente é **T\***, formada a partir da súa propia excitación máis a tautomerización ultrarrápida de **E\***.
- 2) En acetonitrilo e etanol neutros sen embargo, a especie máis estable no estado fundamental é **E** de maneira exclusiva, que a través dun proceso de transferencia protónica intramolecular produce **T\***, de novo a única forma presente no estado excitado.
- 3) En medio acuoso básico, o HPyBI adopta a forma aniónica **A** desprotonada no grupo hidroxilo, tanto no estado fundamental coma no excitado.
- 4) O HPyBI en disolución ácida presentase no estado fundamental como a súa forma protonada no N benzimidazólico, **CE**, independentemente do disolvente empregado.
- 5) En acetonitrilo acidificado, o **CE** excítase e emite unicamente como tal dende o estado excitado.
- 6) Empregando etanol como disolvente e medio ácido, o catión enólico **CE** é a forma máis estable no estado fundamental. A excitación desta produce **CE\***, capaz de emitir como tal dende o estado excitado, e así mesmo de producir **T\*** a través da desprotonación do grupo hidroxilo, consecuencia do aumento da súa acidez.
- 7) En medio acuoso ácido, o catión enólico **CE** trala excitación segue dous camiños de desactivación, sufrindo por unha banda desprotonación do grupo hidroxilo (producindo **T\***, tamén emisor de fluorescencia) seguido da protonación no N piridínico, dando así **CT\*** (a segunda especie emisora); e experimentando por outra parte a protonación no N piridínico primeiro para producir o dicatión **D**, que trala desprotonación do hidroxilo, da así mesmo **CT\***.



- 8) O HPyBI en trifluoroetanol ácido experimenta un proceso de transferencia protónica intramolecular asistida polo disolvente, que permite o paso directo de **CE\*** a **CT\*** grazas á intervención do trifluoroetanol como ponte.

\*\*\*

In this work we studied the behaviour of 2-(3'-hydroxy-2'-pyridyl)benzimidazole (HPyBI) by means of UV-Vis absorption and steady-state and time-resolved fluorescence in various acidities and solvents, investigating the proton transfer processes involved in each case. Through the discussion of the obtained results we reached the following conclusions:

- 1) In neutral water and trifluoroethanol, HPyBI shows a ground-state equilibrium between its enolic form **E** and tautomer **T**. However in the excited state, the only present form is **T\***, also yielded from **E\*** through ultrafast tautomerization.
- 2) Nevertheless, in neutral acetonitrile and ethanol the most stable species in the ground state is exclusively **E**, which can yield **T\*** through intramolecular proton transfer, again the only form present in the excited state.
- 3) In basic aqueous solution, HPyBI adopts the anionic form **A** deprotonated at the hydroxyl group, both in the ground and excited state.
- 4) HPyBI is always found as the protonated cation at the benzimidazole N, **CE**, in the ground state of acidified solutions, independently of the solvent used.
- 5) In acidified acetonitrile, **CE** is excited and can only emit as itself from the excited state.
- 6) Using acidified ethanol as solvent, the enolic cation **CE** is the most stable form in the ground state. The excitation of this form yields both **CE\*** (which emits as such from the excited state) and **T\***, through deprotonation of the hydroxyl group as a consequence of its increased acidity.
- 7) In acidified water the enolic cation **CE** can undergo two deactivation processes after excitation: the deprotonation of the hydroxyl group (yielding **T\***, which shows fluorescence) followed by the protonation at the pyridyl N, giving **CT\*** (the second emitting form); and on the other hand, it can experiment the protonation of the pyridyl N first to yield the dication **D**, that can be deprotonated at the hydroxyl group to yield **CT\*** as well.

- 8) HPyBI in acidified trifluoroethanol undergoes a solvent-assisted intramolecular proton transfer process, allowing the direct conversion of **CE\*** into **CT\*** through a bridge union between the molecule and the fluoroethanol.

\*\*\*

En este trabajo se estudió el comportamiento del 2-(3'-hidroxi-2'-piridil)bencimidazol (HPyBI) a través de medidas de absorción UV-Vis y fluorescencia de estado estacionario y con resolución temporal en varios disolventes y valores de pH, investigando los procesos de transferencia protónica involucrados en cada caso. El análisis de los resultados obtenidos permitió extraer las siguientes conclusiones:

- 1) En medio acuoso y trifluoroetanólico neutro, la forma enólica **E** del HPyBI se encuentra en equilibrio con el correspondiente tautómero **T** en el estado fundamental. En el estado excitado sin embargo, la única especie presente es **T\***, formada a partir de la excitación de **T** junto con la tautomerización ultrarrápida de **E\***.
- 2) En acetonitrilo y etanol neutros sin embargo, la especie más estable en el estado fundamental es **E** de manera exclusiva, que a través de un proceso de transferencia protónica intramolecular produce **T\***, de nuevo la única forma presente en el estado excitado.
- 3) En medio acuoso básico, el HPyBI adopta la forma aniónica **A** desprotonada en el grupo hidroxilo, tanto en el estado fundamental como en el excitado.
- 4) El HPyBI en disolución ácida se presenta en el estado fundamental como la forma protonada en el N benzimidazólico, **CE**, independientemente del disolvente utilizado.
- 5) En acetonitrilo acidificado, **CE** se excita y emite únicamente como tal desde el estado excitado.
- 6) Utilizando etanol como disolvente en medio ácido, el catión enólico **CE** es la forma más estable en el estado fundamental. La excitación de ésta, produce **CE\***, capaz de emitir como tal desde el estado excitado, y así mismo de producir **T\*** a través de la desprotonación del grupo hidroxilo, consecuencia del aumento de su acidez.
- 7) En medio acuoso ácido, el catión enólico **CE** tras la excitación, sigue dos caminos de desactivación, sufriendo por unha parte la desprotonación del grupo hidroxilo (produciendo **T\***, también emisor de fluorescencia) seguido de la

protonación en el N piridínico, dando así **CT\*** (la segunda especie emisora); y experimentando por otra parte la protonación en el N piridínico primero, para producir el dicatión **D**, que tras la desprotonación del hidroxilo, da así mismo **CT\***.

- 8) El HPyBI en trifluoroetanol ácido experimenta un proceso de transferencia protónica intramolecular asistida por el disolvente, que permite el paso directo de **CE\*** a **CT\*** gracias a la intervención del trifluoroetanol como puente.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Simmons, E. L. 1977. The kinetics of proton-transfer reactions in aprotic solvents. *Prog. React. Kinet.*, **8**, 161-183.
2. Bell, R. P. 1973. *The Proton in Chemistry*. 2ª ed.; Chapman and Hall. Londres.
3. Pérez-Lustres, J. L. et al. 2007. Ultrafast proton transfer to solvent: molecularity and intermediates from solvation and diffusion-controlled regimes. *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 5408–5418.
4. Kresge, A. J. 1975. What makes proton transfer fast?. *Acc. Chem. Res.*, **8**, 354-360.
5. Douhal, A.; Lahmani, F.; Zewail, A. H. 1996. Proton-transfer reaction dynamics. *Chem. Phys.*, **207**. 477-498.
6. Shizuka, H. 1985. Excited-state proton-transfer reactions and proton-induced quenching of aromatic compounds. *Acc. Chem. Res.*, **18**, 141-147.
7. Arnaut, L. G.; Formosinho, S. J. J. 1993. Excited-state proton transfer reactions I. Fundamentals and intermolecular reactions. *Photochem. Photobiol. A: Chem.*, **75**, 1-20.
8. Valeur, B. 2002. *Molecular Fluorescence Principles and Applications*. Wiley-Vch, Alemania
9. Lakowicz, J.R. 1999. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 2ª ed., Plenum Press. Nova York, Boston, Londres, Dordrecht, Moscú.
10. Kumpulainen, T.; Lang, B.; Rosspeintner, A.; Vauthey, E. 2016. Ultrafast Elementary Photochemical Processes of Organic Molecules in Liquid Solution. *Chem. Rev.* [Online early access]. DOI: 10.1021/acs.chemrev.6b00491. Publicado online: Dec 13, 2016. <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.chemrev.6b00491> (Consulta: Xul 6, 2017)
11. Laermer, T.; Elsaesser, T.; Kaiser, W. 1988. Femtosecond spectroscopy of excited-state proton transfer in 2-(2'-hydroxyphenyl)benzothiazole. *Chem. Phys. Lett.*, **148**. 119-124
12. Elsaesser, T.; Bakker, H. J. 2002. *Ultrafast Hydrogen Bonding Dynamics and Proton Transfer Processes in the Condensed Phase*; Kluwer Acad. Pub.; Dordrecht, Holanda,.
13. Ireland, J. F.; Wyatt, P. A. H. 1976. Acid-Base Properties of Electronically Excited States of Organic Molecules. *Adv. Phys. Org. Chem.*, **12**, 131-221.
14. Penedo, J. C. 1998. *Transferencia protónica fotoinducida inter- e intramolecular en derivados del benzimidazol. Influencia de la tautomería e isomería conformacional* (tese doutoral). Universidade de Santiago de Compostela. España.
15. García, I. 2009. *Equilibrios tautoméricos e procesos de transferencia protónica fotoinducida no 2-(6'-hidroxi-2'-piridil)benzimidazol* (tese doutoral). Universidade de Santiago de Compostela. España
16. Novo, M. 1987. *Estudio de los espectros electrónicos del 2-(2'-piridil)benzimidazol. Procesos fotofísicos y transferencia protónica fotoinducida* (tese doutoral). Universidade de Santiago de Compostela. España.

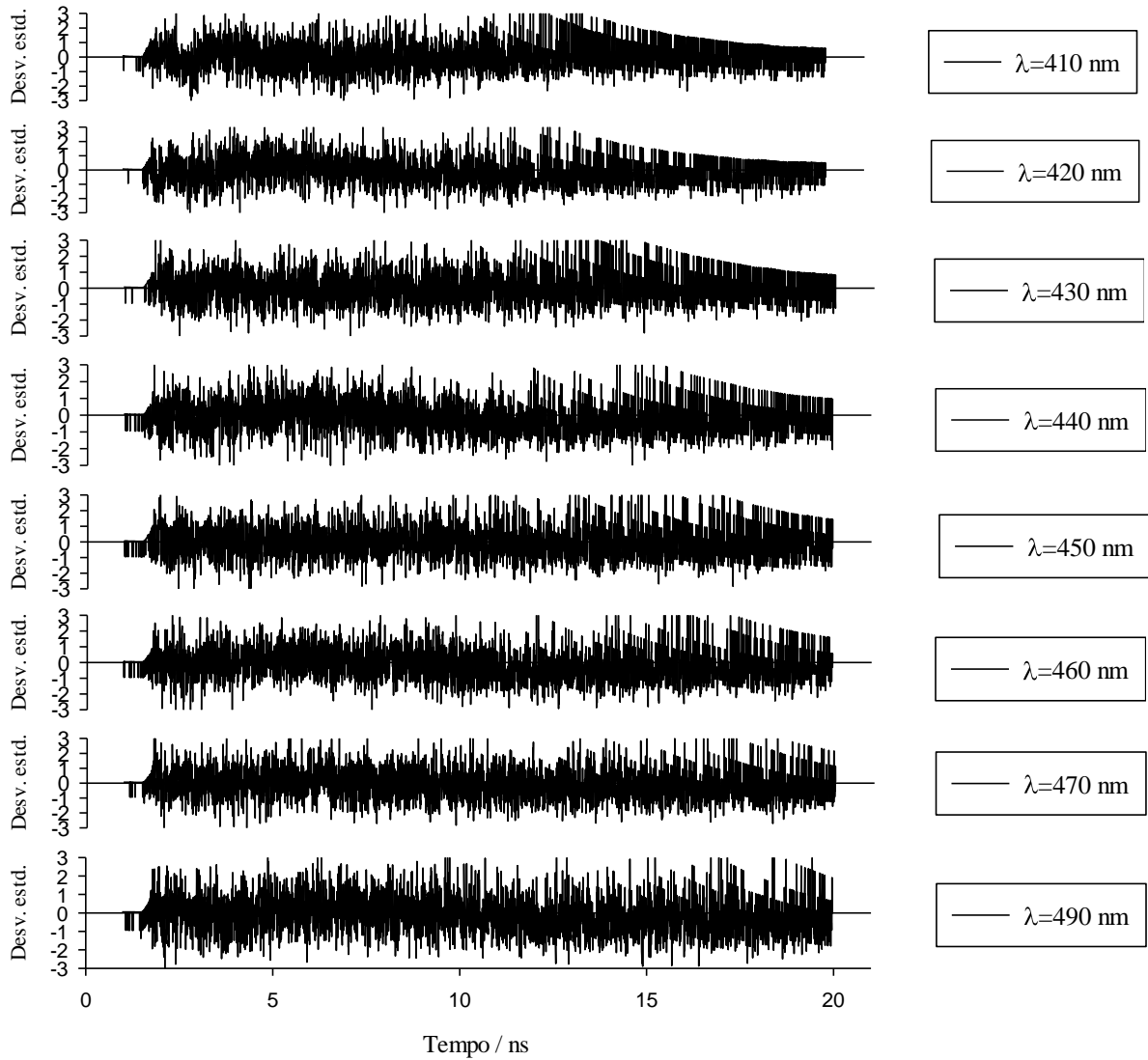
17. Wan, P.; Sukla, D. 1993. Utility of acid-base behavior of excited-states of organic molecules. *Chem. Rev.*, **93**, 571-584.
18. Domcke, W.; Sobolewski, A.L. 2003. Unraveling the Molecular Mechanisms of Photoacidity. *Science*, **302**, 1693-1694.
19. Laws, W. R.; Posner, G. H.; Brand, L. 1979. A covalent fluorescence probe based on excited-state proton transfer. *Arch. Biochem. Biophys.*, **103**, 88-100.
20. Robusch, F. S. et al. 2005. Synthesis and spectroscopic characterisation of new ESIPT fluorescent protein probes. *Photochem. Photobiol. Sci.* **4**, 254-259.
21. Chou, P.; McMorro, D.; Aartsma, T. J.; Kasha, M. 1984. The proton-transfer laser. Gain spectrum and amplification of spontaneous emission of 3-hydroxyflavone. *J. Phys. Chem.* **88**, 4596-4599.
22. Acuña, A. U. et al. 1991. Proton-transfer lasing from solid organic matrices. *Chem. Phys. Lett.*, **187**, 98-102.
23. Catalán, J. et al. 1990. Photoinduced intramolecular proton transfer as the mechanism of ultraviolet stabilizers: a reappraisal. *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 747-759.
24. Smith, T. P. et al. 1992. Ultrafast studies on proton transfer in photostabilizers. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, **65**, 165-175.
25. Fluegge, A. P. et al. 2007. Probing the intramolecular hydrogen bond of 2-(2-Hydroxyphenyl) benzotriazoles in polar environment: a photophysical study of UV absorber efficiency. *J. Phys. Chem. A.*, **111**, 9733-9744
26. Park, S.; Seo, J.; Kim, S.H.; Park, S.Y. 2008. Tetraphenylimidazole-Based Excited-State Intramolecular Proton-Transfer Molecules for Highly Efficient Blue Electroluminescence. *Adv. Funct. Mater.*, **18**, 726-731.
27. Kwon, J. E.; Park, S. Y. 2011. Advanced Organic Optoelectronic Materials: Harnessing Excited-State Intramolecular Proton Transfer (ESIPT) Process. *Adv. Mater.*, **23**, 3615-3642.
28. Goodman, M.F. 1995. DNA models. Mutations caught in the act. *Nature*, **378**, 237-238.
29. Weber, K. 1931. Close connection between extinction of fluorescence and retardation of photochemical reactions, *Z. Phys. Chem.*, **315**, 18-44.
30. Förster, T. 1949. Fluoreszenzspektrum und Wasserstoffionenkonzentration. *Naturwissenschaften.*, **36**, 186-187.
31. Förster, T. 1950. Fluorescence spectrum and hydrogen-ion concentration. *Z. Elektrochem.*, **54**, 531.
32. Weller, A. 1955. Fluorescence of salicylic acid and related compounds. *Naturwissenschaften*, **42**, 175-176.
33. Weller, A. 1956. Fluorescence shifts to naphthols. *Elektrochem. Angew. Phys. Chem.* , **60**, 662-668.
34. Weller, A. 1961. Fast reactions of excited molecules. *Progr. React. Kinet.*, **1**, 189-214.

35. Parker, C. A. 1968. *Photoluminescence of Solutions*. Elsevier Publishing Company, Amsterdam, Londres, Nova York.
36. Klöpffer, Intramolecular Proton Transfer in Electronically Excited Molecules. *W. Adv. Photochem.* 1977, **10**, 311.
37. Demchenko, A. P.; Tang, K.; Chou, P. 2013. Excited-state proton coupled charge transfer modulated by molecular structure and media polarization. *Chem. Soc. Rev.*, **42**, 1379-1408.
38. Dsouza, R. N.; Pischel, U.; Nau, W. M. 2011. Fluorescent Dyes and Their Supramolecular Host/Guest Complexes with Macrocycles in Aqueous Solution. *Chem. Rev.*, **111**, 7941-7980.
39. Schäferling, M. 2012. The art of fluorescence imaging with chemical sensors. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **51**, 3532-54.
40. Mosquera, M.; Penedo, J. C.; Ríos, M. C.; Rodríguez, F. 1996. Photoinduced Inter- and Intramolecular Proton Transfer in Aqueous and Ethanolic Solutions of 2-(2'-Hydroxyphenyl)benzimidazole: Evidence for Tautomeric and Conformational Equilibria in the Ground State. *J. Phys. Chem.*, **100**, 5398-5407.
41. Douhal, A.; Amat-Guerri, F.; Lillo, M. P.; Acuña, A. U. 1994. Proton transfer spectroscopy of 2-(2'-hydroxyphenyl)imidazole and 2-(2'-hydroxyphenyl)benzimidazole dyes. *Photochem. Photobiol. A*, **78**, 127-138.
42. Das, K. et al. 1994. Excited-state intramolecular proton transfer in 2-(2'-hydroxyphenyl)benzimidazole and-benzoxazole: effect of rotamerism and hydrogen bonding. *J. Phys. Chem.*, **98**, 9126-9132.
43. Rodríguez, F.; Penedo, J. C.; Mosquera, M. 1998. Solvent control of molecular structure and excited-state proton-transfer processes of 1-methyl-2-(2'-hydroxyphenyl)- benzimidazole. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, **94**, 2775-2782.
44. Rodríguez, F.; Ríos, M. C.; Mosquera, M.; Ríos, M. A. 1994. Ground- and Excited-State Tautomerism in 2-(3'-Hydroxy-2'-pyridyl)benzimidazole. *J. Phys. Chem.*, **98**, 8666-8672.
45. Mosquera, M.; Ríos, M. C.; Rodríguez, F. 1997. Competition between Protonation and Deprotonation in the First Excited Singlet State of 2-(3'-Hydroxy-2'-pyridyl)benzimidazole in Acidic Solutions. *J. Phys. Chem.*, **101**, 2766-2772.
46. Ríos, M. C.; Rodríguez, F.; Mosquera, M. 1998. Conformational effects on the photoinduced proton-transfer processes in 1-methyl-2-(3'-hydroxy-2'-pyridyl)benzimidazole. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **1**, 253-260
47. Suwattanamala, A.; Ruangpornvisuti, V. 2009. Isomeric structures of benzimidazole, benzoxazole, and benthioazole derivatives, their electronic properties and transformations. *Struct. Chem.*, **20**, 619-631.
48. Siano, D. B.; Metzler, D.E. 1969. Band Shapes of the Electronic Spectra of Complex Molecules. *J. Chem. Phys.* **51**, 1856-1861.

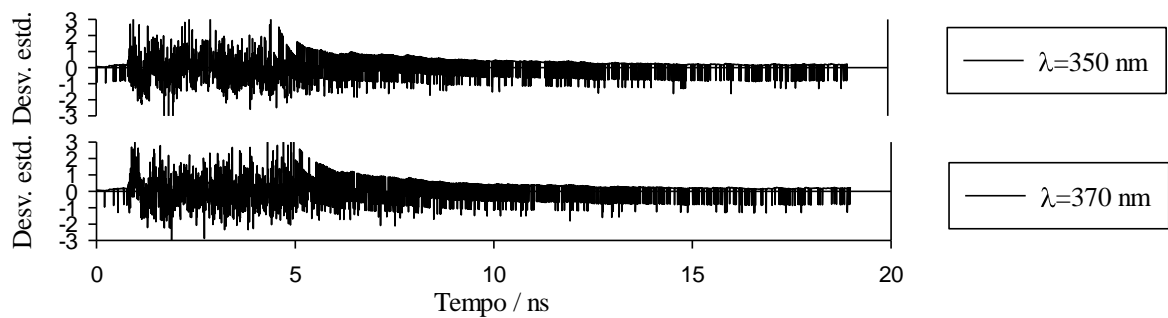
## ANEXO I: Residuos ponderados

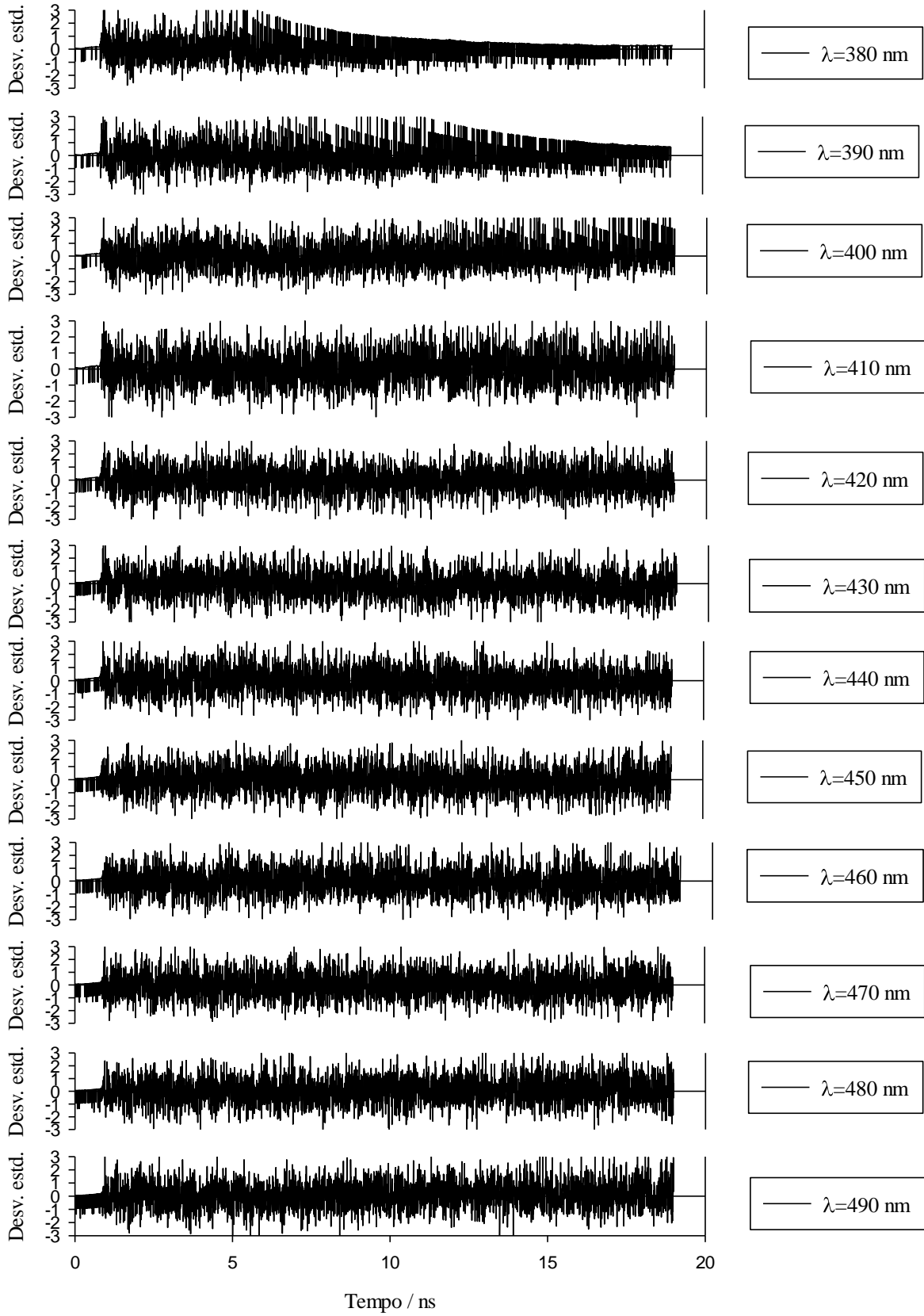
Preséntanse a continuación os residuos ponderados para os decaementos de fluorescencia do HPyBI en trifluoroetanol neutro e ácido.

- *Medio neutro:*



- *Medio ácido:*



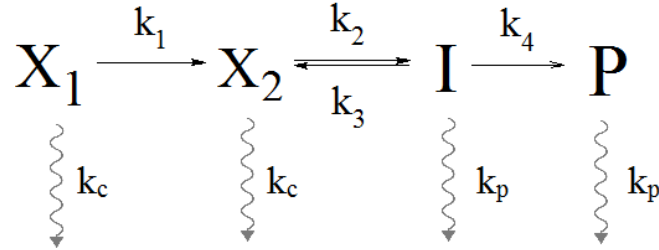




## ANEXO II: Desenvolvemento do modelo de axuste a catro especies

Como se propón no apartado *b)* da *Subepígrafe 5.2.3*, o comportamento do HPyBI en trifluoroetanol ácido axústase a un modelo de reacción intervindo catro especies,  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $I$  e  $P$ , tal que:

*Esquema I.1 (5.5): Mecanismo de reacción proposto para o HPyBI en trifluoroetanol ácido.*



Deste xeito, pode describirse a contribución de cada especie ao sistema total, tendo en conta os procesos de desactivación de cada una delas, e que matricialmente se pode expresar como segue (I.1),

$$-\frac{d}{dt} \begin{pmatrix} X_1 \\ X_2 \\ I \\ P \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} (k_1 + k_c) & 0 & 0 & 0 \\ -k_1 & (k_2 + k_c) & -k_3 & 0 \\ 0 & -k_2 & (k_4 + k_p) & 0 \\ 0 & 0 & -k_4 & k_p \end{pmatrix} \times \begin{pmatrix} X_1 \\ X_2 \\ I \\ P \end{pmatrix} \quad (\text{I.1})$$

dando lugar a que o comportamento fluorescente de cada especie corresponde así mesmo a unha suma de exponenciais, en función dos posibles procesos de decaemento de cada unha:

$$X_1 = \alpha e^{-t/\tau_1} \quad (\text{I.2})$$

$$X_2 = a_1 e^{-t/\tau_1} + a_2 e^{-t/\tau_2} + a_3 e^{-t/\tau_3} \quad (\text{I.3})$$

$$I = b_1 e^{-t/\tau_1} + b_2 e^{-t/\tau_2} + b_3 e^{-t/\tau_3} \quad (\text{I.4})$$

$$P = c_1 e^{-t/\tau_1} + c_2 e^{-t/\tau_2} + c_3 e^{-t/\tau_3} + c_4 e^{-t/\tau_4} \quad (\text{I.5})$$

É posible entón obter os resultados para  $\tau_1$ ,  $\tau_2$ ,  $\tau_3$  e  $\tau_4$  tendo en conta que tanto estes valores coma os factores preexponenciais son función das constantes, e que

$a_i + b_i + c_i = 1 - \alpha$  onde  $\alpha$  é a fracción molar obtida como resultado do axuste e que neste caso corresponde a 0,381.

Así, a partir das ecuacións descritas, puideron obterse coa axuda do software MATLAB as expresións relacionando as constantes do proceso cos tempos de vida, de xeito que os autovalores da matriz dos procesos de desactivación de cada especie corresponden ás inversas dos tempos de vida, e os autovectores ás amplitudes dos factores preexponenciais. Recolléronse con isto os valores resultantes na **Figura 5.24**, **Táboa 5.5** e **Táboa 5.6**.