

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA



Síntesis y estudio de derivados de 3H-fenoxazin-3-ona y aminometilantraceno en disolución y soportados sobre sólidos mesoporosos tipo MCM-41 para su aplicación como sensores moleculares ópticos.

TESIS DOCTORAL

Presentada por:
Ana Belén Descalzo López

Dirigida por:
Dr. D. Ramón Martínez Máñez
Dr. D. Juan Soto Camino
Valencia, 2004

OBJETIVOS Y ESTRUCTURA DE LA TESIS

El objetivo principal de esta tesis es el desarrollo de nuevos sensores moleculares ópticos, tanto en disolución como soportados sobre matrices sólidas. Esto implica la síntesis, caracterización, elucidación de mecanismos de respuesta y estudio de la aplicabilidad (ensayos con los iones de interés, determinación de constantes de estabilidad, etc.) de las sondas y materiales híbridos preparados. A continuación se enumeran los principales apartados en los que se divide esta tesis.

♦ En el primer capítulo se hace una breve introducción sobre la descripción de los sensores químicos moleculares ópticos, relacionada con el diseño de receptores (conceptos de química supramolecular) y de cromofluoróforos (cambios espectroscópicos inducidos por la coordinación de un ion) para el reconocimiento selectivo de una especie determinada.

Uno de los aspectos más novedosos de esta tesis incluye el soporte de los sensores moleculares en matrices inorgánicas mesoporosas de sílice que poseen unas características especiales. Se hará una actualización del tema sobre sensores soportados en distintos materiales, así como de las ventajas o propiedades adicionales que puede aportar al proceso de reconocimiento molecular la inmovilización de los ligandos en las matrices inorgánicas. Así mismo se realiza una breve descripción de la matriz sólida elegida (**UVM-7**), incluyendo el procedimiento sintético general.

♦ En el Capítulo II se describe la incorporación de un ligando fluorescente sencillo, un derivado del aminometilantraceno, en **UVM-7** para el reconocimiento de un anión de interés biológico, el ATP, en disolución acuosa. La respuesta de este tipo de ligandos es conocida y se pueden encontrar varios ejemplos en la bibliografía en los que se describen los mecanismos de respuesta en disolución (efectos de pH, coordinación de iones, etc). Además se sintetizará un derivado análogo en disolución como modelo para la comparación de los resultados obtenidos en disolución y con el material híbrido.

♦ El tercer capítulo describe el empleo de 7-amino-3H-fenoxazin-3-ona como una subunidad emisora de señal óptica, tanto por cambio de color como de

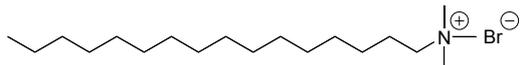
fluorescencia. Este fluoróforo permite la modulación de su respuesta mediante la modulación de sus propiedades electrónicas según se requiera su empleo como sensor de cationes o aniones.

Este capítulo se divide en dos apartados. En el apartado (A) se incluyen los estudios realizados en fase homogénea, tanto de compuestos modelo en una serie de disolventes (estudios solvatocrómicos) como de las sondas moleculares para iones (estudio de los cambios espectroscópicos inducidos por la coordinación de los iones, determinación de constantes de formación de los complejos, así como estudios con especies potencialmente interferentes) y el apartado (B), donde se describen los estudios en fase heterogénea de los materiales obtenidos mediante la incorporación de derivados de fenoxazinona en **UVM-7**, y su aplicación para la determinación de vapores y el reconocimiento de carboxilatos de cadena larga en disolución acuosa.

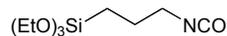
◆ En el Capítulo IV se emplea una estrategia original para la determinación del anión fluoruro en agua. Se trata de aprovechar la reacción selectiva de ataque de la sílice con fluoruro a pH ácido. Si la sílice está funcionalizada con moléculas cromo- o fluorogénicas, la disolución del sólido inducida por el anión provoca su liberación por lo que la presencia de fluoruro puede ser indicada por un aumento en el color / la fluorescencia de la disolución. El empleo de **UVM-7** como el soporte silíceo para el anclaje de las moléculas indicadoras permite que la determinación pueda llevarse a cabo en condiciones suaves y en tiempos relativamente cortos.

◆ En el último capítulo se describe el procedimiento experimental donde se incluye la síntesis y caracterización de los sensores moleculares y materiales híbridos. Aquí también se describen los procedimientos de medida así como la instrumentación empleada.

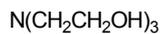
◆ Por último, se incluye un apéndice con la descripción de los procesos de fisisorción (relacionado con el cálculo de la superficie específica en los sólidos mesoporosos mediante el método BET) y quimisorción (en relación con la isoterma de Langmuir empleada para la deducción de las ecuaciones que evalúan la interacción de los aniones estudiados, ATP y carboxilatos de cadena larga, con los materiales híbridos), así como una tabla con algunos de los parámetros empleados de la bibliografía.



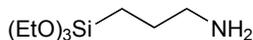
CTABr
(bromuro de cetiltrimetilamonio)



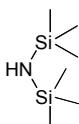
ICPTES
(3-(isocianatopropil)trietoxisilano)



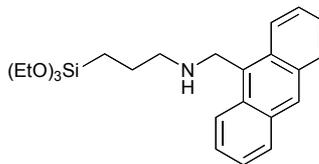
TEAH₃ (trietanolamina)



APTES
(3-(aminopropil)trietoxisilano)



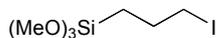
HMDS
(1,1,1,3,3,3-hexametilidisilazano)



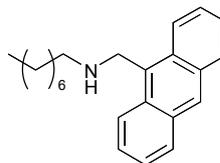
AnTES (N-(9-antrilmetil)-N-[3-(trietoxisilil)propil]amina)



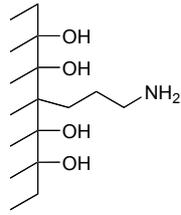
TEOS (tetraetoxisilano)



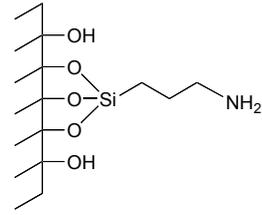
IPTMES
(3-(yodopropil)trimetoxisilano)



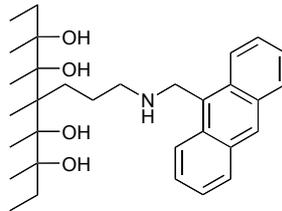
AnN1C8 (N-(9-antrilmetil)-N-(*n*-octil)amina)



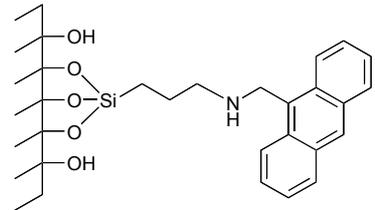
U-NH₂(X)-Co



U-NH₂(X)-Gr



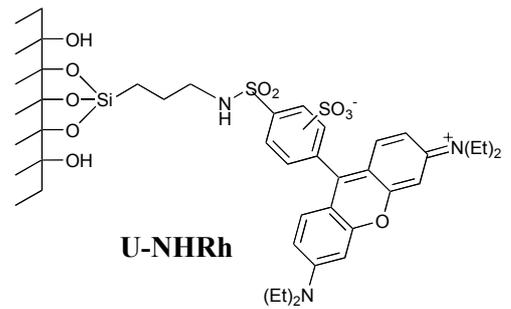
U-NHAn(X-Y)-Co



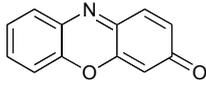
U-NHAn(X-Y)-Gr
U-AnTES(Z)-Gr

Códigos:

- **U**: hace referencia a **UVM-7**.
- **X**, **Y** y **Z** se refieren al porcentaje en moles (con respecto a los moles de sílice total) de cada reactivo empleado para la funcionalización del material.
- **Co**: indica que el material híbrido ha sido obtenido por cohidrólisis.
- **Gr**: indica que el sólido se ha obtenido mediante métodos post-sintéticos (*grafting*).



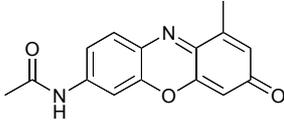
U-NHRh



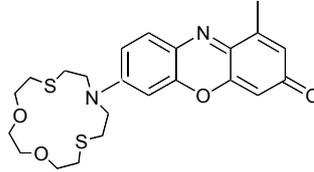
FenxH
(3H-fenoxazin-3-ona)



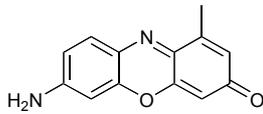
FenxJulo (7-(7-julolidin-3-ona)-3H-fenoxazin-3-ona)



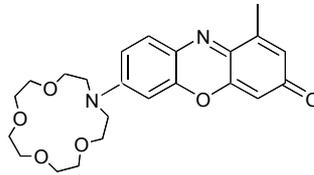
FenxAmd (7-(acetamido-1-metil-3H-fenoxazin-3-ona))



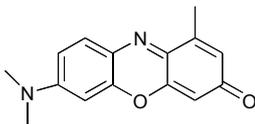
FenxAT₂15C5 (7-(10-aza-1,4-dioxo-7,13-ditio-ciclopentadec-10-il)-1-metil-3H-fenoxazin-3-ona)



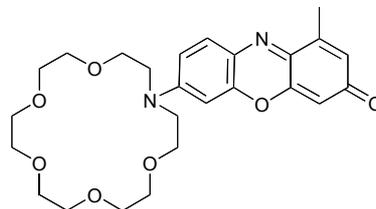
FenxNH₂ (7-amino-1-metil-3H-fenoxazin-3-ona)



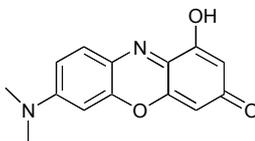
FenxA15C5 (7-(13-aza-1,4,7,10-tetraoxa-ciclopentadec-13-il)-1-metil-3H-fenoxazin-3-ona)



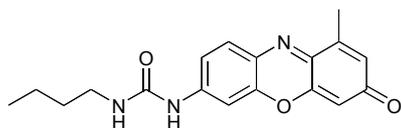
FenxDMA (7-(N,N-dimetilamino)-1-metil-3H-fenoxazin-3-ona)



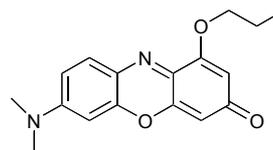
FenxA18C6 (7-(16-aza-1,4,7,10,13-pentaoxa-ciclopentadec-16-il)-1-metil-3H-fenoxazin-3-ona)



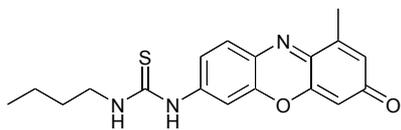
FenxDMA(OH) (7-(N,N-dimetilamino)-1-hidroxi-3H-fenoxazin-3-ona)



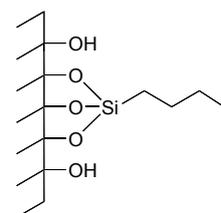
FenxUr (7-(N'-butilureido)-1-metil-3H-fenoxazin-3-ona)



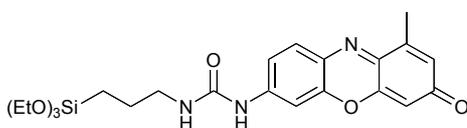
FenxDMA(OPr)
(7-(N,N-dimetilamino)-1-propoxi-3H-fenoxazin-3-ona)



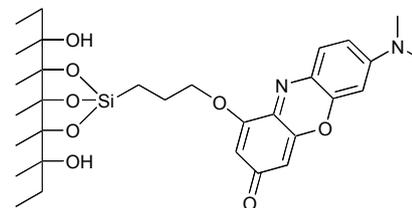
FenxTUR (7-(N'-butiltioureido)-1-metil-3H-fenoxazin-3-ona)



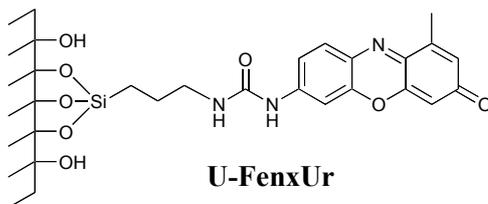
U-IPr



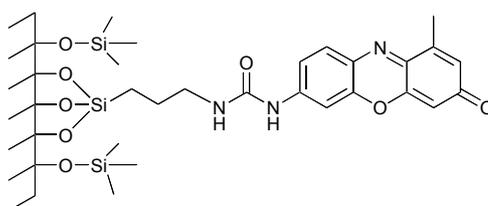
FenxUrTES (1-metil-7-[N'-(trietoxisilil)propilureido]-3H-fenoxazin-3-ona)



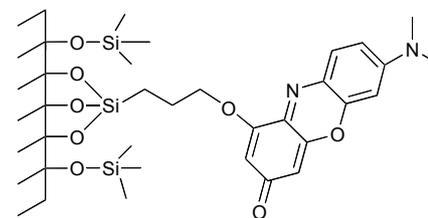
U-FenxDMA(OPr)



U-FenxUr

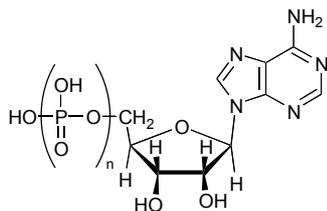


U-FenxUr-Me



U-FenxDMA(OPr)-Me

Aniones y especies neutras empleadas en los ensayos de los Capítulos II y III.

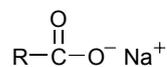


n = 1, **AMP** (adenosin 5'-monofosfato)

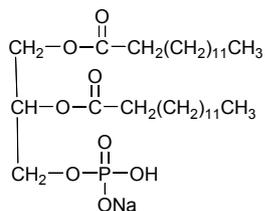
n = 2, **ADP** (adenosin 5'-difosfato)

n = 3, **ATP** (adenosin 5'-trifosfato)

Sales sódicas de ácidos grasos empleadas:

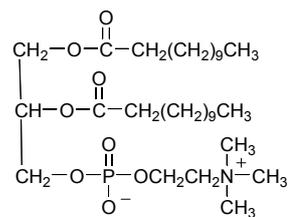


| R | C ₁ H ₃ | C ₃ H ₇ | C ₅ H ₁₁ | C ₇ H ₁₅ | C ₉ H ₁₉ | C ₁₁ H ₂₃ | C ₁₃ H ₂₇ | C ₁₅ H ₃₁ | C ₁₇ H ₃₅ |
|-------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| RCOO ⁻ | AcO ⁻ | BuO ⁻ | HeO ⁻ | OcO ⁻ | DeO ⁻ | DdO ⁻ | TdO ⁻ | HdO ⁻ | OdO ⁻ |

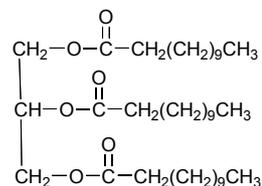


Na⁺ Gli(TdO)₂Fos⁻

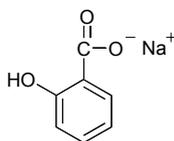
(1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfato sódico)



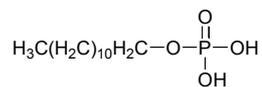
Gli(DdO)₂FosCo (1,2-didodecanoil-sn-glicero-3-fosfocolina)



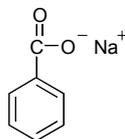
Gli(DdO)₃ (1,2,3-tridodecanoilglicerol)



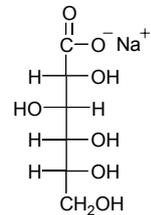
Na⁺ SalO⁻
(salicilato sódico)



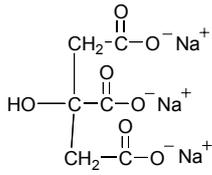
DdOPO₃H₂
(mono-*n*-dodecilsfosfato)



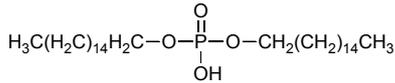
Na⁺ BzO⁻
(benzoato sódico)



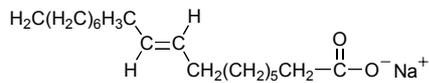
Na⁺ GlucO⁻
(glucuronato sódico)



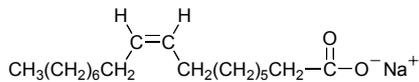
3Na⁺ CitO⁻
(sal trisódica del ácido cítrico)



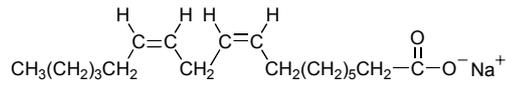
(HdO)₂PO₂H
(di-*n*-hexadecilfosfato)



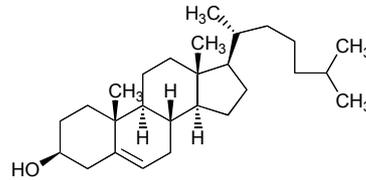
Na⁺ t-OdO⁻
(sal sódica del ácido elaídico)



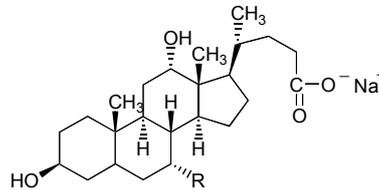
Na⁺ c-OdO⁻
(sal sódica del ácido oleico)



Na⁺ c,c-OdO⁻
(sal sódica del ácido linoleico)



Colesterol



R: OH, Na⁺ Col⁻
(sal sódica del ácido cólico)

R: H, Na⁺ DCol⁻
(sal sódica del ácido deoxicólico)

CAPÍTULO I.

Introducción. Materiales Híbridos y
Sensores Químicos Fluorescentes.

1.- QUÍMICA SUPRAMOLECULAR Y EL RECONOCIMIENTO DE IONES.

El término de *Química Supramolecular*, que fue acuñado por Lehn en la década de los 70,¹ hace referencia a la química del enlace intermolecular, y cubre la estructura y funciones de entidades formadas por la asociación de dos o más especies químicas. Entendiendo la química molecular como la química del enlace covalente, se puede definir a la química supramolecular como *la química más allá de la molécula*. Las interacciones intermoleculares forman la base de los procesos altamente específicos de transporte, catálisis y reconocimiento que tienen lugar en los sistemas biológicos.

Receptores Moleculares. Principios de Diseño. La química de los receptores artificiales puede ser considerada como una química de coordinación general, no sólo limitada a los metales de transición. El reconocimiento molecular en las supermoléculas formadas por el enlace de un receptor y un sustrato se basa en los principios de la complementariedad molecular, de manera, que a la hora de diseñar un receptor adecuado para un ion determinado, habrá de considerarse el tamaño, la carga, posibilidad de formación de enlaces de hidrógeno, geometría y la hidrofilia / lipofilia del ion. En base ha esto, se han descrito multitud de receptores que presentan elevados grados de complementariedad con los sustratos y que en ocasiones consiguen mimetizar el comportamiento de los complejos sistemas biológicos mediante el control de las fuerzas intermoleculares. Básicamente se puede hacer una clasificación de los receptores atendiendo a su topología o en función de su empleo como receptores de aniones o cationes, atendiendo al grupo funcional. Un breve esquema con algunos ejemplos se muestra en la Fig. I.1.

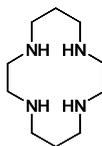
¹ J.-M. Lehn, *Supramolecular Chemistry*, Ed. VCH, 1995.

TIPOS DE RECEPTORES

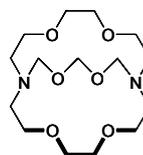
-Topología: Lineales



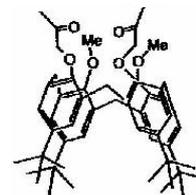
Macrocíclicos



Criptandos



Calixarenos



- Nº y tipo de heteroátomos

Para Cationes

- Éteres
- Aminas
- Tioles
- Carboxilatos
- Enolatos

Para Aniones

- Derivados de amida, urea y tiourea
- Aminas protonadas
- Sales de amonio cuaternario
- Sales de guanidíneo
- Sales de isotiouronio
- Centros metálicos catiónicos

Fig. I.1. Tipos de receptores empleados para la coordinación de iones.

La necesidad de la existencia de múltiples centros de enlace en los receptores moleculares es evidente porque la interacción individual no covalente es débil.

Durante los últimos años ha habido un desarrollo espectacular en el área de diseño y síntesis de receptores moleculares para una aplicación en áreas muy diversas. Este desarrollo ha sido especialmente importante en el campo de reconocimiento de cationes,² sobre todo alcalinos y alcalinotérreos, propulsado por descubrimiento de los éteres corona a finales de los años 60 por Pedersen.³ Este autor observó que los éteres corona eran capaces de enlazar a estos cationes tan débilmente coordinantes gracias a las interacciones con los múltiples átomos de

² a) H.-G. Löhr, F. Vögtle, *Acc. Chem. Res.*, **1985**, *18*, 65; b) R. A. Biesel, A. P. de Silva, H. Q. N. Gunaratne, P. L. M. Lynch, G. E. M. Maguire, K. R. A. S. Sandanayake, *Chem. Soc. Rev.*, **1992**, *21*, 187; c) A. W. Czarnik, *Acc. Chem. Res.*, **1994**, *27*, 302; d) L. Fabrizzi, A. Poggi, *Chem. Soc. Rev.*, **1995**, *24*, 197; e) A. T. Yordanov, D. M. Roundhill, *Coord. Chem. Rev.*, **1998**, *170*, 193; f) B. Valeur, I. Leray, *Coord. Chem. Rev.*, **2000**, *205*, 3; g) K. Rurack, *Spectrochim. Acta Part A*, **2001**, *57*, 2161.

³ C. Pedersen, *J. Am. Chem. Soc.*, **1967**, *89*, 7017.

oxígeno presentes en los ligandos, de forma selectiva además, en función del tamaño de la cavidad y número de heteroátomos del ligando y de la relación carga/radio del catión alcalino o alcalinotérreo. La química de coordinación de aniones sin embargo recibió poca atención en los comienzos de la química supramolecular y sólo durante los últimos 20 años se ha dedicado un mayor esfuerzo al diseño de receptores para aniones,⁴ probablemente debido a la mayor exigencia que requiere la obtención de receptores apropiados para aniones de pequeño tamaño.⁵

- Los aniones poseen un mayor tamaño que los correspondientes cationes isoelectrónicos, por lo que la relación carga/radio es menor y como consecuencia, las interacciones electrostáticas serán menos efectivas.

- Los aniones pueden ser sensibles al pH, por lo que los receptores han de trabajar en la ventana de pH adecuada para el anión de interés.

- Las especies aniónicas poseen un amplio rango de geometrías y por tanto se requiere un mayor grado de diseño para la complementariedad anión-receptor.

- Los disolventes próticos presentan un problema importante, ya que pueden formar enlaces de hidrógeno con los iones, por lo que el receptor habrá de competir eficazmente con la solvatación de la especie aniónica. Esto hace que en muchos casos no sea posible el reconocimiento de los aniones en medio acuoso.

2.- SENSORES QUÍMICOS MOLECULARES ÓPTICOS.

Una de las aplicaciones del diseño de receptores es su empleo para el desarrollo de *sensores químicos moleculares*. Un sensor molecular se define como una especie capaz de reconocer un sustrato e informar de su reconocimiento mediante la emisión de una señal.

Para poder hablar de sensores, algunas de las condiciones son que el proceso de reconocimiento sea **selectivo**, **reversible** –excluyendo por tanto los cambios que se producen como consecuencia de una reacción química irreversible, en tal caso se habla de dosímetros químicos–, y que su aplicación sea posible en **tiempo real**. El

⁴ *Supramolecular Chemistry of Anions*, Eds. A. Bianchi, K. Browman-James, E. García-España, VCH, 1997.

⁵ a) M. M. G. Antonisse, D. N. Reinhoudt, *Chem. Commun.*, **1998**, 443.; b) P. D. Beer, P. A. Gale, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2001**, *40*, 486; c) R. Martínez-Mañez, F. Sancenón, *Chem. Rev.*, **2003**, *103*, 4419.

reconocimiento molecular por medio de interacciones débiles intermoleculares por tanto es fundamental para el diseño de sensores que trabajan de una forma reversible, selectiva y práctica.

Los sensores generalmente se componen de dos subunidades:

- *Una subunidad emisora*, que actúa como transductor de la señal. Es decir, informa del proceso de reconocimiento que tiene lugar a nivel molecular mediante la emisión de una señal bien óptica (cambios en la absorbancia o fluorescencia inducidos por la coordinación del ion), bien electroquímica (cambios en el potencial de oxidación de la subunidad emisora redox-activa).

- *Una subunidad receptora*, que se encarga del reconocimiento y que va a ser la responsable de la eficiencia del proceso del enlace con el sustrato. Esta eficiencia en el proceso de reconocimiento va a depender de las características del ligando y del ion.

Los sensores moleculares ópticos presentan ventajas importantes sobre otros métodos tradicionalmente empleados para la determinación de iones como los electrodos selectivos de iones o la absorción atómica.

- Requieren una **instrumentación** sencilla y accesible.
- Emplean métodos de detección **no destructivos**.
- Requieren **poca cantidad de muestra**.
- Permiten **operación *in situ*** y realizar medidas en **tiempo real**.

Además, las técnicas basadas en fluorescencia generalmente se caracterizan por un elevado grado de **especificidad** (via elección de las longitudes de onda de excitación y emisión) y permiten al usuario acceder a una información abundante (**multiparamétrica**), como por ejemplo cambios espectrales y de intensidad, tiempos de vida de fluorescencia, mediante protocolos bastante sencillos y rápidos. Además son métodos altamente **sensibles** ($\leq 10^{-7}$ M, incluso con algunas técnicas, a nivel molecular).

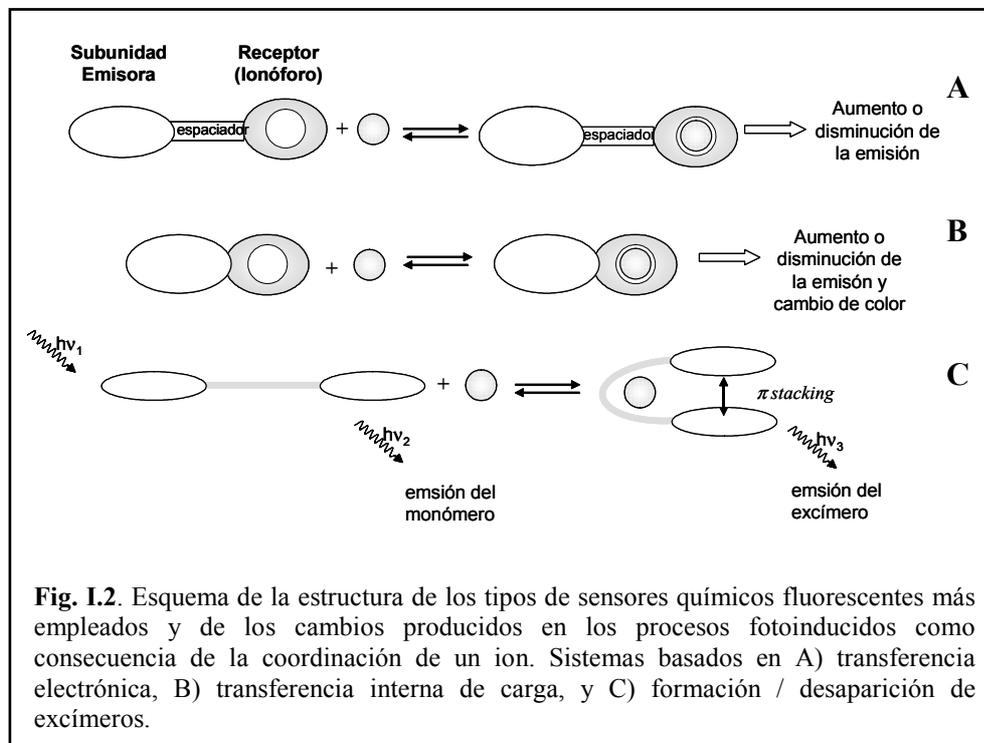
En el caso de los sensores colorimétricos el **cambio de color** inducido por la coordinación del ion puede ser apreciable a simple vista, por lo que pueden emplearse para determinaciones cualitativas rápidas.

Aparte de las herramientas que emplea la química supramolecular para la optimización de la selectividad y sensibilidad de reconocimiento de las distintas especies moleculares, la modulación de las características de la subunidad emisora

de señal también es importante, lo cual está conectado a las propiedades fotofísicas de los cromóforos.

Sensores químicos fluorescentes para iones. Basándonos en la definición anterior de un sensor molecular, podemos decir que este tipo de sensores fluorescentes incorporan un fluoróforo como subunidad emisora enlazado a un ionóforo o receptor como subunidad de reconocimiento. Ha de existir un mecanismo de comunicación entre ambos, de manera que la coordinación del ion en la subunidad coordinante induce un cambio en las propiedades electrónicas de la subunidad emisora, lo que se traduce en la generación de una señal. Este tipo de sensores frecuentemente se denominan *fluoroionóforos*.

En la Fig. I.2 se muestra un esquema de cómo puede afectar la coordinación de un ion sobre los distintos procesos fotoinducidos más importantes empleados en el reconocimiento de los iones en función de la estructura del fluoroionóforo empleado.



Existen tres tipos básicos de sensores químicos fluorescentes,^{2f,g,5c} que además son los que aparecen a lo largo de esta tesis, por lo que aquí incluye un breve esquema, si bien una descripción más detallada se dará en el capítulo correspondiente.

- a) Sensores basados en el control iónico de la transferencia electrónica fotoinducida **(P)ET** (*(Photoinduced) Electron Transfer*).

La subunidad emisora y el receptor se encuentran desacopladas electrónicamente por un espaciador alquílico, por lo que únicamente hay un cambio en la intensidad de fluorescencia como consecuencia de la coordinación del ion, mientras que las longitudes de onda de absorción o emisión permanecen inalteradas. Una ventaja de estos sistemas es que presentan cambios elevados en la intensidad de fluorescencia, lo que permite hablar de un estado “on” (encendido) y “off” (apagado) del fluoroionóforo. Una desventaja es que la ausencia de desplazamiento en el espectro de excitación o de emisión excluye la posibilidad de realizar medidas ratiométricas, es decir, de medir la relación de intensidades obtenidas a dos longitudes de onda diferentes (de excitación o emisión), relación que es independiente de la concentración de fluoróforo, de la intensidad de la radiación de excitación, de efectos de dispersión de la luz, etc.

En este tipo de sensores suelen emplearse hidrocarburos aromáticos como el naftaleno, pireno o antraceno como subunidad emisora y aminas como centro coordinante y grupo responsable de la ET (un inconveniente, ya que el pH puede afectar a la respuesta).

- b) Sensores basados en el control iónico de la transferencia de carga fotoinducida **(P)CT** (*(Photoinduced) Charge Transfer*).

En este caso, la subunidad coordinante y emisora están directamente conjugados y comparten ciertos átomos críticos (por lo que también se denominan *fluoroionóforos intrínsecos*). Los cambios en los rendimientos cuánticos de fluorescencia no suelen ser tan elevados, en comparación con los sistemas ET, sin embargo, los espectros de absorción y emisión sí que se desplazan tras la coordinación del ion, por lo que se pueden realizar medidas ratiométricas y además detectar la presencia del ion mediante un cambio de color.

c) Sensores basados en el control de la **formación / desaparición de excímeros**.

En estos sistemas la coordinación del ion induce un cambio geométrico en la molécula de manera que es posible observar el aumento o disminución de la banda del monómero con respecto a la del excímero. La monitorización de la relación de intensidades de estas dos bandas también permite llevar a cabo medidas ratiométricas.

El diseño de los cromóforos por tanto también es importante, y dado el mayor conocimiento que se posee sobre los procesos fotofísicos que tienen lugar como consecuencia de la coordinación de los iones, es posible alcanzar un mayor grado de sofisticación en el diseño de estos sensores ópticos moleculares, con las propiedades requeridas para cada aplicación (intervalo de longitud de onda de trabajo, cambios inducidos en la intensidad de emisión, etc.).^{2f,g,5c,6}

3.- SENSORES BASADOS EN MATERIALES HÍBRIDOS.

El desarrollo de receptores y sensores a nivel molecular ha experimentado una evolución espectacular durante los últimos años gracias a conceptos de la química supramolecular y al avance que han experimentado los métodos sintéticos, que permiten obtener moléculas de una elevada complejidad, necesaria a veces para conseguir la selectividad/sensibilidad deseadas en el proceso de reconocimiento. Sin embargo, este desarrollo no ha seguido un crecimiento paralelo en el área de los materiales que permita un avance hacia la obtención de dispositivos sólidos para aplicaciones reales o que les confieran propiedades adicionales. Parece obvio que el “siguiente paso” en el estudio de sistemas supramoleculares y sus aplicaciones parece encaminado a la incorporación de los mismos en soportes sólidos. El control y la manipulación de estructuras químicas en la mesoescala ha conducido al desarrollo reciente de una nueva e interesante área de la química.⁷ En el mundo de la mesoescala no sólo es posible controlar el

⁶ a) A. P. de Silva, H. Q. N. Gunaratne, T. Gunnlaugson, A. J. M. Huxley, C. P. McCoy, J. T. Rademacher, T. E. Rice, *Chem. Rev.*, **1997**, *97*, 1515; b) *New Trends in Fluorescence Spectroscopy*; Eds. B. Valeur, J.-C. Brochon, Springer: Berlin, 2001; d) K. Rurack, U. Resch-Genger, *Chem. Soc. Rev.*, **2002**, *31*, 116; d) R. Pohl, D. Aldakov, P. Kubát, K. Jurisková, M. Marquez, P. Anzebacher, *Chem. Commun.*, **2004**, 1282.

⁷ N. Antonietti, G. A. Ozin, *Chem Eur. J.*, **2004**, *10*, 28.

tamaño, la forma o el área superficial sino que también se puede tener un control de la química interfacial controlando las propiedades químicas y físicas superficiales del material. Las estructuras híbridas de estos materiales son interesantes ya que sus propiedades pueden trascender significativamente a aquéllas de sus partes componentes. El desarrollo de materiales con dimensiones (tamaño de partícula y de poro) controlables a escala nanoscópica y con una distribución homogénea, ha permitido la obtención de nuevos materiales con “propiedades a la carta”, aplicables en diversas áreas de la ciencia como la bioquímica, la química analítica (desarrollo de sensores), la ingeniería de materiales, etc.^{7,8}

A continuación se comentan algunos de los ejemplos más destacables de materiales diversos con un control a escala nanoscópica. En algunos casos el material no actúa como un mero soporte pasivo, si no que confiere propiedades adicionales al sistema molecular. En estos ejemplos se excluyen las estrategias más tradicionales de incorporación de cromóforos en membranas poliméricas u ocluidos en sílice mediante procesos sol-gel,⁹ ya que en este caso no se trata de materiales con un control estructural a escala nanoscópica y la incorporación del cromóforo se realiza mediante simple adsorción u oclusión en el soporte (aunque en algunos casos se incorporen de forma covalente mediante copolimerización con la matriz sólida, esta incorporación no se realiza de forma controlada y los ligandos no poseen una distribución ordenada). La incorporación de las moléculas orgánicas en los sólidos mediante enlaces covalentes en superficies presenta varias ventajas como las que se enumeran a continuación:

- Los ligandos pueden alinearse en una disposición paralela (es el caso por ejemplo el caso de sensores desarrollados a partir de monocapas autoensambladas en superficie de vidrio¹⁰). Como consecuencia de la restricción de movimiento por la inmovilización covalente y la proximidad espacial de los sustratos, pueden

⁸ Para revisiones generales ver: sólidos mesoporosos: a) J. Y. Ying, C. P. Mehnert, M. S. Wong, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1999**, *38*, 56; b) M. J. MacLachlan, T. Asefà, G. A. Ozin, *Chem. Eur. J.*, **2000**, *6*, 2507; c) J. Shi, Z. Hua, L. Zhang, *J. Mater. Chem.*, **2004**, *14*, 795; Microporosos y mesoporosos: d) G. J. de A. A. Soler-Illia, C. Sánchez, B. Lebeau, J. Patarin, *Chem. Rev.*, **2002**, *102*, 4093; Nanopartículas: e) C. M. Niemeyer, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2001**, *40*, 4128; f) A.N. Shipway, M. Lahav, I. Willner, *Adv. Mater.*, **2000**, *12*, 993.

⁹ Ver por ejemplo a) M. Plaschke, R. Czolk, H. J. Ache, *Anal. Chim. Acta*, **1995**, *304*, 107; b) A. Panusa, A. Flamini, N. Poli, *Chem. Mater.*, **1996**, *8*, 1202; c) K. Ertekin, B. Yenigül, E. U. Akkaya, *J. Fluorescence*, **2002**, *12*, 263.

¹⁰ S. Flink, F. C. J. M. van Veggel, D. N. Reinhoudt, *Adv. Mater.*, **2000**, *12*, 1315.

aparecer procesos colectivos,¹¹ un “efecto quelato superficial” con ligandos monodentados,¹² o un aumento de la “concentración efectiva”¹³ en los sólidos.

- Es posible conseguir un mayor control de la síntesis de los materiales e incluso en algunos casos es posible llevar a cabo sucesivas etapas de funcionalización, lo que permite introducir funcionalidades diferentes en un mismo material.

- Se evitan pérdidas del ligando o del cromóforo en disolución por lixiviación.

La matriz inorgánica empleada como soporte puede ejercer además un efecto tamponador en el proceso de reconocimiento. Por ejemplo, el empleo de una complejona de alizarina soportada sobre *thin-films* de TiO₂ mesoporoso para la detección colorimétrica de aniones (F⁻ y CN⁻) en disolución acuosa no es necesario el uso de disoluciones tamponadoras, ya que el mismo soporte, que posee una superficie altamente hidroxilada, actúa como medio amortiguador de las variaciones de pH.¹⁴

¹¹ M. Montalti, L. Prodi, N. Zaccheroni, G. Falini, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 13540.

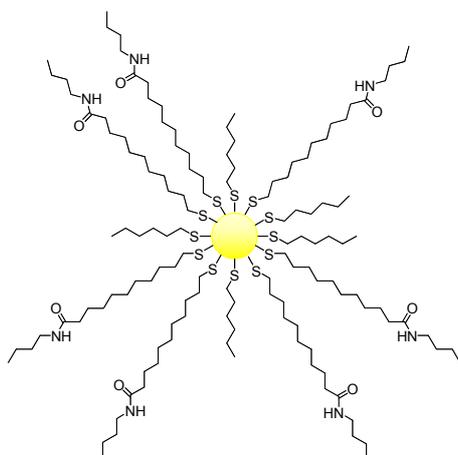
¹² “Efecto quelato superficial”. No se puede simplemente extrapolar la química de coordinación de iones metálicos en disolución a estudios en superficies. Un factor diferenciable de ambos tipos de coordinación es que los grupos funcionales en superficie pueden estar dispuestos en una ordenación bidimensional, lo que puede dar lugar a un efecto quelato inherente. Para establecer este efecto quelato en superficie, Major y Zhu (R. C. Major, X.-Y. Zhu, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 8454) miden las constantes de enlace para la interacción de Cu²⁺ con grupos -COOH superficiales utilizando monocapas autoensambladas del ácido 16-mercaptohexadecanoico (HS-(CH₂)₁₅-COOH) sobre una superficie de oro. Comparan los resultados obtenidos con los del ácido succínico (HOOC-(CH₂)₂-COOH) y el ácido glutámico (HOOC-(CH₂)₃-COOH) en disolución, ligandos capaces de formar complejos quelato con iones metálicos divalentes que presentan constantes de estabilidad mucho mayores que el ácido acético con Cu²⁺. Las constantes de formación son mayores en el caso de los carboxilatos inmovilizados en una superficie que para los ligandos en disolución, estableciendo que existe un fuerte efecto quelato superficial. Este efecto lo atribuyen a la gran ventaja estadística que supone tener ligandos dispuestos en una ordenación superficial en dos dimensiones, ya que tras la coordinación de uno de los grupos superficiales hay una gran propensión para que el Cu²⁺ se enlace a uno de los seis carboxilatos vecinos de la monocapa ordenada.

¹³ J. Huskens, A. Mulder, T. Auleta, C. A. Nijhuis, M. J. W. Ludden, D. N. Reinhoudt, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 6784.

¹⁴ E. Palomares, R. Vilar, A. Green, J. R. Durrant, *Adv. Funct. Mater.*, **2004**, *14*, 111.

A continuación se describen algunos de los ejemplos más destacables en los que se explotan las interacciones supramoleculares en materiales sólidos, principalmente en el área de reconocimiento molecular y el desarrollo de sensores.

Nanopartículas de oro. Las nanopartículas de oro muestran una elevada absorbancia en la zona del espectro visible, por lo que se pueden emplear en la detección óptica de iones, moléculas o macromoléculas. Así por ejemplo, nanopartículas de oro modificadas superficialmente con ligandos amida, muestran un aumento en la capacidad de detectar aniones mediante métodos ópticos, con un aumento en el límite de detección en tres órdenes de magnitud con respecto a la capacidad de enlace de un ligando amida neutro. La adición de aniones causa una



disminución en la intensidad de la banda de plasmón, atribuida a la agregación de las nanopartículas inducida por la coordinación de los aniones a través de la formación de enlaces de hidrógeno entre los aniones y los ligando amida interpartícula.¹⁵ La mayor efectividad del sensor con respecto al mismo ligando libre en disolución la explican en base a cooperatividad que existe entre los ligandos amida ensamblados en las nanopartículas y a las atracciones interpartícula por fuerzas de van der

Waals (que son especialmente fuertes entre nanopartículas metálicas por la elevada polarizabilidad de los núcleos metálicos). En otro trabajo de Beer y colaboradores se describe el empleo de metaloporfirinas de zinc autoorganizadas sobre la superficie de las nanopartículas, que muestran una afinidad marcadamente superior a la mostrada por las metaloporfirinas libres.¹⁶ Emplean estas nanopartículas como sensores ópticos y redox para aniones, resaltando la importancia de la preorganización superficial de los ligandos en la coordinación con los aniones, que es posible incluso en mezclas de disolventes orgánicos-acuosos. Observan un

¹⁵ S. Watanabe, M. Sonobe, M. Arai, Y. Tazume, T. Matsuo, T. Nakamura, K. Yoshida, *Chem. Commun.*, **2002**, 2866.

¹⁶ P. D. Beer, D. P. Cormode, J. J. Davis, *Chem. Commun.*, **2004**, 414.

aumento significativo en la constante de asociación para el reconocimiento de aniones por el confinamiento de los ligandos en una superficie, lo que asignan a factores entrópicos (reducción de la flexibilidad conformacional) y entálpicos (relacionados con efectos de solvatación en un entorno más hidrófobo originado por la formación de la monocapa superficial del ligando).

Sin embargo, las nanopartículas de oro presentan un problema para su empleo como plataforma en el diseño de sensores fluorescentes, ya que causan la desactivación de la fluorescencia.¹⁰

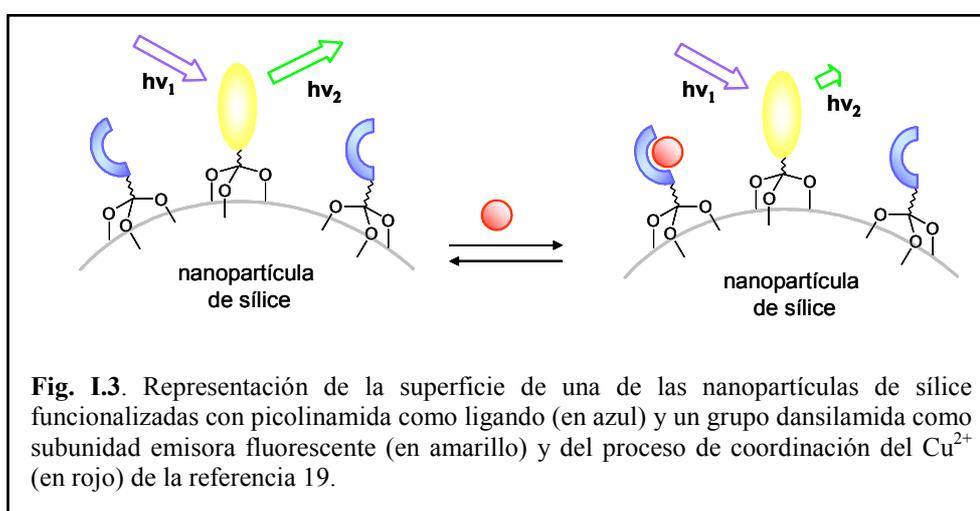
Nanotubos. En un trabajo de Callegari y colaboradores se procede a la funcionalización de nanotubos de carbono con ligandos amidoferrocenil para el reconocimiento de aniones (H_2PO_4^-) mediante técnicas voltamperométricas.¹⁷ Observan un efecto positivo similar al descrito anteriormente para dendrímeros,¹⁸ ya que obtienen un gran desplazamiento del potencial de oxidación como consecuencia de la coordinación del fosfato. Sugieren que el agrupamiento de un gran número de grupos amidoferrocenil alrededor del nanotubo, núcleo de la estructura, aumenta la interacción supramolecular con el anión, análogamente a lo observado con las estructuras dendríticas.

Nanopartículas de Sílice. En este ejemplo se describe un método para la determinación de Cu^{2+} en disolución acuosa mediante la funcionalización de

¹⁷ A. Callegari, M. Marcaccio, D. Paolucci, F. Paolucci, N. Tagmatarchis, D. Tasis, E. Vázquez, M. Prato, *Chem. Commun.*, **2003**, 2576.

¹⁸ Algunos autores hablan del “efecto dendrítico positivo” al observar un aumento de la interacción con el sustrato a medida que aumenta la generación del dendrímero. Así por ejemplo, en el primer trabajo en el que hacen referencia a este tipo de efecto, C. Valério, J.-L. Fillaut, J. Ruiz, J. Guittard, J.-C. Blais, D. Astruc, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 2588, emplean sensores específicos basados en dendrímeros amido-ferroceno (FcDs) para el reconocimiento de aniones pequeños. Realizando valoraciones mediante técnicas de voltametría cíclica y ^1H RMN en diclorometano encuentran que existe un efecto sinérgico entre las interacciones electrostáticas entre el catión ferricinio y los aniones y el enlace por enlace de hidrógeno entre el H del grupo amida con los aniones. Definen el efecto dendrítico positivo como la capacidad de un dendrímero para alcanzar una mejor determinación y reconocimiento de los aniones por voltametría cíclica a medida que la generación del dendrímero aumenta (1-Fc \rightarrow 9-Fc \rightarrow 18-Fc). Por ejemplo, en el caso del anión HSO_4^- se obtienen constantes aparentes de asociación de 5444, 8530 y 61400 para 1-Fc, 9-Fc y 18-Fc, respectivamente.

nanopartículas de sílice con una picolinamida como receptor y una dansilamida como fluoróforo en diferentes proporciones.¹⁹ Los autores sugieren que la autoorganización de receptores y fluoróforos para formar ensamblajes organizados pueden solucionar el problema que implica la síntesis de sensores químicos fluorescentes compuestos por una subunidad receptora y uno o más componentes fotoactivos que generan la señal fluorescente. Muestran que pueden surgir procesos colectivos de la organización de los componentes en una red extendida. En la mezcla de reacción introducen simultáneamente ambos componentes, receptor y fluoróforo y van variando la fracción molar entre ambos para obtener nanopartículas con diferente grado de funcionalización. Tras la adición de Cu^{2+} en una disolución tamponada a pH 7 observan una disminución de la fluorescencia de las suspensiones con las nanopartículas multifuncionalizadas (ver Fig. I.3).



En el caso de los materiales con una mayor fracción molar de ligando, hay una mayor interacción con el Cu^{2+} , que atribuyen a la existencia de una cooperación entre las subunidades del ligando por la formación de centros multivalentes de enlace. En conclusión, consiguen emplear nanopartículas de sílice

¹⁹ E. Brasola, F. Mancin, E. Rampazzo, P. Tecilla, U. Tonellato, *Chem. Commun.* **2003**, 3026.

como plantilla para la autoorganización de sensores químicos fluorescentes. El anclaje del ligando y la subunidad fotoactiva a las nanopartículas no sólo asegura la intercomunicación entre ambos componentes en el sensor, sino que induce la aparición de procesos colectivos en la coordinación del sustrato.

Monocapas autoensambladas sobre superficies de vidrio (surface assembled monolayers, (SAMs)). Aunque en este caso el soporte empleado no posee dimensiones controlables a escala nanométrica, incluimos aquí este tipo de sistemas porque el autoensamblaje de las monocapas moleculares sobre una superficie también puede dar lugar a la aparición de procesos colectivos. Así por ejemplo, en un trabajo de Crego-Calama y Reinhoudt²⁰ se describe el primer ejemplo en el que es posible la detección mediante fluorescencia de cationes metálicos en la superficie de una SAM en vidrio sin necesidad de que la subunidad emisora incorpore un receptor específico para los cationes. En otro ejemplo más reciente,²¹ estos autores emplean la preorganización de los ligandos proporcionada por la superficie para el desarrollo de sistemas sensores basados en pequeñas moléculas mediante una estrategia combinatorial, evitando la necesidad del diseño de receptores complejos. La preorganización inherente en SAM permite que los grupos coordinantes y los fluoróforos estén suficientemente cerca como para que la interacción del analito con el grupo coordinante pueda ser comunicada al fluoróforo (algo similar a lo descrito en la Fig. I.3).

La desventaja de las SAMs sobre vidrio es que presentan una superficie muy pequeña, mientras que en el caso de las nanopartículas o los sólidos mesoporosos la superficie específica es mucho mayor, lo que permite incorporar un mayor número de ligandos o grupos cromofóricos, por tanto obtener una mayor sensibilidad en la respuesta. A continuación se describe un tipo de sólido mesoporoso particular, MCM-41 y su empleo como soporte “activo” en varios procesos de reconocimiento.

²⁰ M. Crego-Calama, D. N. Reinhoudt, *Adv. Mater.*, **2001**, *13*, 1171.

²¹ L. Basabe-Desmonts, J. Beld, R. S. Zimmerman, J. Hernando, P. Mela, M. F. García-Parajó, N. F. van Hulst, A. van den Berg, D. N. Reinhoudt, M. Crego-Calama, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 7293.

4.- ELECCIÓN DE MATERIALES TIPO MCM-41 COMO SOPORTE PARA EL DESARROLLO DE SENSORES QUÍMICOS ÓPTICOS.

4.1.- Sólidos Mesoporosos de la Familia M41S.

A pesar de que la literatura existente para aplicaciones de zeolitas como tamices moleculares, principalmente en el área de catálisis heterogénea, es enorme debido al control en el tamaño de poro y el orden tridimensional que se puede alcanzar en estos aluminosilicatos, las dimensiones y accesibilidad a los poros estaba restringida a la escala sub-nanométrica (el tamaño de poro suele ser inferior a los 2 nm), lo que limitaba la aplicación de estos sistemas porosos a moléculas de pequeño tamaño. Esta limitación de las dimensiones de poro impulsó a numerosos grupos de investigación a estudiar y diseñar procedimientos nuevos para conseguir expandir el tamaño de los poros en el rango de meso y macroporos.

El uso de plantillas orgánicas como agentes directores de la estructura, y en especial, su aumento de tamaño hasta una escala supramolecular, permitió en 1992 a los investigadores de la Mobil, expandir el rango de poros en sílicas y silicoalúminas a la zona de mesoporos.²² Así, describieron y caracterizaron la familia de sólidos mesoporosos M41S gracias al uso de ensamblajes supramoleculares (agregados micelares de surfactante) como agentes directores de estructura.

Según la IUPAC, se pueden clasificar los sólidos porosos en función del tamaño de poro como sigue:^{8a}

- Microporosos: tamaño de poro inferior a los 20 Å.
- Mesoporosos: tamaño de poro entre 20 y 500 Å.
- Macroporosos: tamaño de poro superior a los 500 Å.

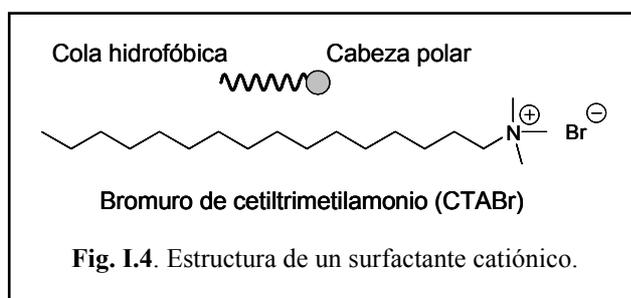
Dependiendo de las condiciones de síntesis, las fases obtenidas dentro de la familia de silicatos/aluminosilicatos mesoporosos M41S se dividen en una fase

²² C. T. Kresge, M. E. Leonowicz, W. J. Roth, J. C. Vartuli, J. S. Beck, *Nature*, **1992**, 359, 710.

hexagonal MCM-41, una cúbica MCM-48 (presenta una estructura de poros tridimensional e interconectados) y una laminar MCM-50. La fase MCM-41 ha sido la más estudiada y es la que se describe aquí.

El material MCM-41 se sintetiza utilizando una estrategia de auto-ensamblaje de las diferentes entidades, es decir, las moléculas de surfactante coensamblan con los materiales inorgánicos en estructuras nanoscópicas a través de interacciones moleculares favorables. Los materiales nanoscópicos resultantes poseen un delicado orden estructural que es muy difícil de conseguir siguiendo rutas sintéticas tradicionales.

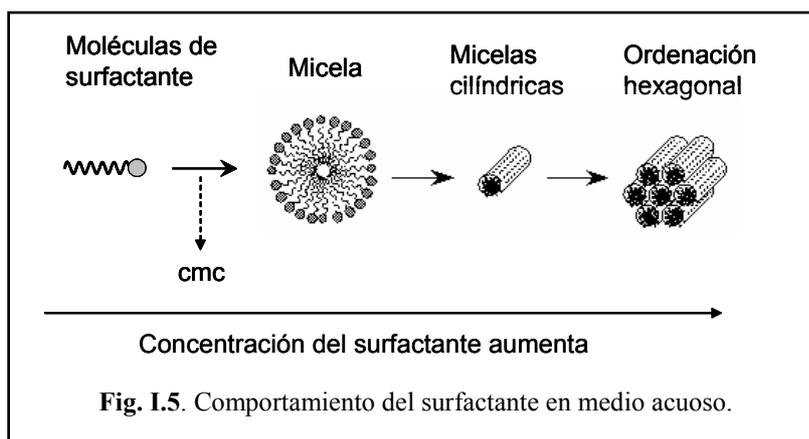
El término surfactante es una contracción de las palabras inglesas *surface active agent* (agentes activos de superficie). Un surfactante es una molécula o ion orgánico con una parte hidrófoba (una cadena alquílica) y una parte hidrófila llamada cabeza. Debido al doble comportamiento hidrófobo-hidrófilo, estas moléculas también reciben el nombre de anfifílicas. En la Fig. I.4 se muestra un esquema de una de estas moléculas, el bromuro de cetiltrimetilamonio (CTABr).



A partir de una cierta concentración en agua estos compuestos se ordenan formando los denominados “cristales líquidos”, fases que aún siendo líquidas, están ordenadas.²³ La necesidad de minimizar las repulsiones que establecen las moléculas del medio acuoso, eminentemente polar, hace que las colas hidrofóbicas del surfactante tiendan a agregarse y a apantallarse respecto a la disolución, lo que favorece la formación de agregados supramoleculares denominados micelas, que

²³ a) G. G. Warr, R. Sen, D. Fennell, J. E. Trend, *J. Phys. Chem.*, **1988**, 92, 774; b) X. Auvray, C. Petipas, R. Anthore, I. Rico, A. Lattes, *J. Phys. Chem.*, **1989**, 93, 7458.

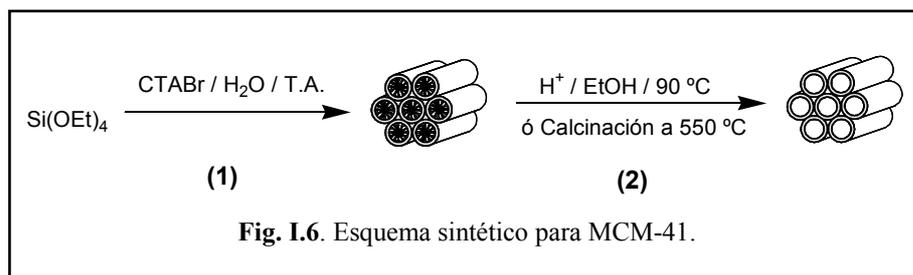
aparecen a partir de una concentración determinada, que es la concentración micelar crítica 1 (cmc1). El incremento de la concentración de surfactante permite alcanzar un nuevo valor límite, denominado concentración micelar crítica 2, donde las micelas esféricas anteriores se transforman en micelas cilíndricas. Cuando el proceso de concentración continúa se alcanza la región del cristal líquido, en la que las moléculas de surfactante se asocian entre sí siguiendo un patrón de empaquetamiento hexagonal compacto de cilindros, formando la llamada “fase hexagonal”, ver Fig. I.5.



A pesar de que se han propuesto varios modelos para el mecanismo de formación de MCM-41,^{8a} el proceso se puede describir básicamente según el esquema de la Fig. I.6. Se trata de la polimerización de un precursor inorgánico, generalmente tetraetoxisilano (TEOS), en disolución acuosa alrededor de las micelas cilíndricas del surfactante (1). Tras la eliminación del agente director de la estructura, bien mediante calcinación a 500-600 °C, bien mediante extracción con disolventes orgánicos (2),²⁴ se obtiene una estructura de canales cilíndricos unidireccionales vacíos, de unos 3 nm de diámetro (en el caso de emplear CTABr como surfactante), ordenados en una distribución hexagonal. La presencia de estos

²⁴ En el caso de surfactantes catiónicos como las sales de amonio (CTABr) se suelen emplear medios alcohólicos en presencia de un ácido que permite el intercambio iónico. También se ha descrito el empleo de surfactantes neutros como plantilla (en tal caso es suficiente el empleo de disolventes orgánicos, métodos más suaves de extracción que no requieren de medio ácido) e incluso aniónicos (ver referencia 8d).

canales le confiere una elevada superficie a este tipo de materiales mesoporosos ($> 1000 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$).



La principal ventaja de este método de síntesis sol-gel es el elevado grado de homogeneidad de los elementos que componen la mezcla de partida que se transmite también al material final. Esta mezcla íntima de los reactivos permite la utilización de temperaturas mucho más bajas comparadas con las empleadas por el método cerámico, lo que permite la introducción de grupos orgánicos en la primera etapa de síntesis.

La incorporación de grupos orgánicos en la superficie de MCM-41 permite modular sus propiedades superficiales, habiéndose descrito para funcionalidades muy diversas como grupos amino,²⁵ alcohol,²⁶ tiol,²⁷ vinil, epóxido,²⁸ haluros de alquilo,²⁹ etc. El anclaje covalente de los grupos orgánicos en MCM-41 puede realizarse mediante dos procedimientos distintos (ver Fig. I.7). En ambos casos se suele utilizar el TEOS como fuente de sílice y un organoalcoxilano para la introducción del grupo orgánico.

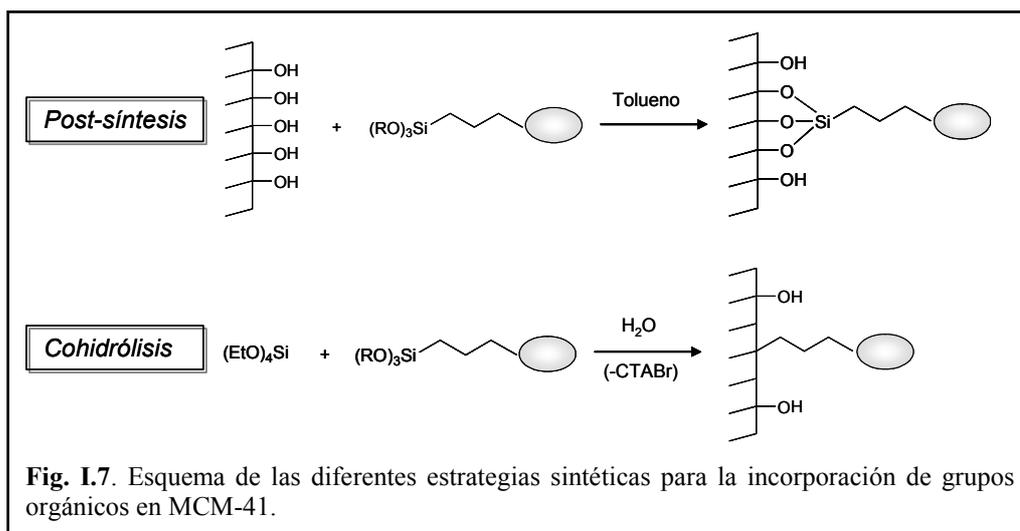
²⁵ a) J. F. Díaz, K. J. Balkus, *Chem. Mater.*, **1997**, *9*, 61; b) N. Liu, R. A. Assink, B. Smarsly, C. J. Brinker, *Chem. Commun.*, **2003**, 1146; c) S. Huh, J. W. Wiench, J.-C. Yoo, M. Pruski, V. S.-Y. Lin, *Chem. Mater.*, **2003**, *15*, 4247.

²⁶ J. Ding, C. J. Hudalla, J. T. Cook, D. P. Walsh, C. E. Boissel, P. C. Iraneta, J. E. O'Gara, *Chem. Mater.*, **2004**, *16*, 670.

²⁷ a) X. Feng, G. E. Fryxell, L.-Q. Wang, A. Y. Kim, J. Liu, K. M. Kremer, *Science*, **1997**, *276*, 923; b) A. Walcarius, C. Delacôte, *Chem. Mater.*, **2003**, *15*, 4181.

²⁸ Y. V. S. Rao, D. E. De Vos, T. Bein, P. A. Jacob, *Chem. Commun.*, 1997, 355.

²⁹ N. Bellocq, S. Abramson, M. Lásperas, D. Brunel, P. Moreau, *Tetrahedron: Assym.*, **1999**, *10*, 3229.



- En el método post-sintético o *grafting* el anclaje del alcoxisilano se realiza mediante condensación con los grupos silanol del material síliceo MCM-41 (en el que ya se ha eliminado el surfactante) en un disolvente orgánico, generalmente tolueno o hexano.

- En el caso del método por cohidrólisis o síntesis directa, ambos precursores, el silano y el alcoxisilano están presentes en la mezcla inicial de reacción, de manera que tiene lugar la cohidrólisis simultánea de ambos grupos alrededor de las micelas de surfactante. El organoalcoxisilano contribuye por tanto en este caso a la construcción de la estructura del silicato.

Se han realizado varios estudios comparativos sobre las ventajas de unos y otros métodos sintéticos,³⁰ y parece claro que en el caso de los materiales obtenidos mediante cohidrólisis la distribución de los grupos orgánicos es más homogénea, mientras que en el caso de los métodos post-sintéticos, los grupos funcionales tienden a concentrarse en la entrada de los canales. Sin embargo, los materiales obtenidos mediante métodos post-sintéticos presentan una estructura mejor definida y con un mayor control del tamaño de poro, ya que la funcionalización orgánica tiene lugar en materiales previamente preparados. Además, no siempre es posible la funcionalización mediante cohidrólisis ya que los grupos funcionales

³⁰ a) M. H. Lim, A. Stein, *Chem. Mater.*, **1999**, *11*, 3285; b) T. Yokoi, H. Yoshitake, T. Tatsumi, *J. Mater. Chem.*, **2004**, *14*, 951.

introducidos han de soportar las condiciones de síntesis para la preparación del material (medio ácido o básico, presencia de agua o elevadas temperaturas, etc.).

Además modular las propiedades superficiales de los sólidos mesoporosos mediante el anclaje de funcionalidades orgánicas diversas, es posible obtener materiales con partículas de distinta morfología a nivel microscópico³¹ o bien distintas estructuras a nivel macroscópico como *thin-films*,^{25b,32} fibras,³³ esferas,^{25,27b} columnas monolíticas como fase estacionaria para cromatografía,³⁴ burbujas,³⁵ o morfologías variadas.³⁶

La caracterización de estos materiales se realiza mediante diversas técnicas que incluyen la difracción de rayos X de polvo, la microscopía electrónica en superficie o por transmisión, isotermas de adsorción-desorción de nitrógeno para la estimación de la superficie específica del sólido y la distribución de tamaño de poro y, en menor medida, mediante técnicas espectroscópicas como el infrarrojo o la resonancia magnética nuclear. En el caso de la difracción de rayos X, se observan reflexiones intensas a valores bajos de 2θ (el pico más intenso aparece sobre $2\theta = 2^\circ$). Estas reflexiones han sido indexadas en base a una simetría hexagonal que resulta de la ordenación periódica de los canales (de ahí la variación regular y periódica de la densidad electrónica). La estructura de sílice sin embargo no tiene un orden a largo alcance en el sentido de un material cristalino y puede ser clasificado como amorfo, por lo que la expresión “cristalinidad” debe ser generalmente evitada en conexión con materiales tipo MCM-41.³⁷

³¹ S. Huh, J. W. Wiench, B. G. Trewyn, S. Song, M. Prusky, V. S.-Y. Lin, *Chem. Commun.*, **2003**, 2364.

³² G. Wirnsberger, B. J. Scott, G. D. Stucky, *Chem. Commun.*, **2001**, 119; D. A. Doshi, A. Gibaud, V. Goletto, M. Lu, H. Gerung, B. Ocko, S. M. Hang, C. J. Brinker, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 11646; S. Subbiah, R. Mokaza, *Chem. Commun.*, **2003**, 92;

³³ Q. S. Huo, D. Y. Zhao, J. L. Feng, K. Weston, S. K. Buratto, G. D. Stucky, S. Schacht, F. Schuth, *Adv. Mater.*, **1997**, *9*, 974.

³⁴ C. Liang, S. Dai, G. Guiochon, *Chem. Commun.*, **2002**, 2680.

³⁵ M. Ogawa, N. Yamamoto, *Langmuir*, **1999**, *15*, 2227.

³⁶ a) R. I. Nooney, M. Kalyanaraman, G. Kennedy, E. J. Maggin, *Langmuir*, **2001**, *17*, 528;
b) J. E. Haskouri, D. Ortiz de Zárate, C. Guillem, J. Latorre, M. Caldés, A. Beltrán, D. Beltrán, A. B. Descalzo, G. Rodríguez-López, R. Martínez-Mañez, M. D. Marcos, P. Amorós, *Chem. Commun.*, **2002**, 330.

³⁷ B. Marler, U. Oberhagemann, S. Vortmann, H. Gies, *Microp. Mater.*, **1996**, *6*, 375.

4.2.- Descripción del Sólido Mesoporoso UVM-7.

Los sólidos de la familia UVM-7^{36b} son sólidos tipo MCM-41, con el característico sistema de canales nanométricos ordenados en una distribución hexagonal y superficies específicas superiores a los 1000 m² g⁻¹. La diferencia es que, en este caso, además de los poros cilíndricos de 3 nm, existe un segundo sistema de poros de mayor tamaño (generalmente entre 20 y 70 nm, comprendido entre la escala de los meso y macroporos), con una distribución de poro más ancha. La naturaleza del segundo sistema no ordenado de poros se puede entender mejor observando la fotografías obtenidas mediante microscopía electrónica por transmisión de estos materiales (TEM) en la Fig. I.8. Se trata de materiales contruidos por una red continua de pequeñas partículas mesoporosas soldadas, que en el proceso de nucleación generan un segundo sistema de poros no ordenados de mayor tamaño. En el caso de sílice pura, el tamaño de las partículas suele estar comprendido entre 12 y 17 nm.

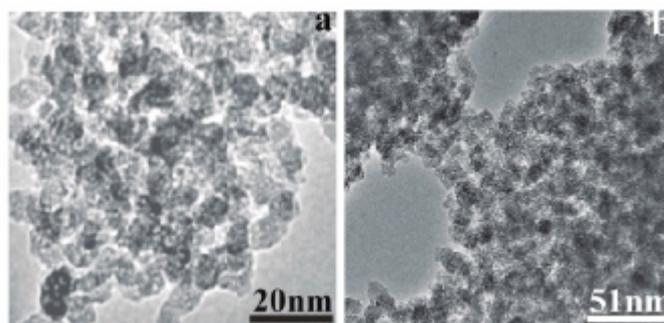


Fig. I. 8. Imágenes obtenidas por TEM de materiales UVM-7 de la referencia 36b.

El procedimiento de síntesis es muy similar al descrito para MCM-41, hidrólisis del precursor inorgánico organizado alrededor de las micelas de surfactante (CTABr) en medio acuoso, sólo que en este caso el precursor inorgánico es un complejo silatrano formado entre la trietanolamina (que se emplea como agente retardante de la hidrólisis³⁸) y el TEOS.

³⁸ Tesis Doctoral de S. Cabrera Medina, Universidad de Valencia-Instituto de Ciencia de los Materiales, 1999.

Este sistema de poros bimodal aporta una mejora adicional a la accesibilidad y difusión de moléculas en el material. Además, es posible obtener monolitos de estos materiales de dimensiones considerables.

4.3.- Materiales Híbridos Tipo MCM-41 Empleados como Soporte “Activo” en Procesos de Reconocimiento.

La distribución homogénea y tamaño controlado de los poros en la escala nanométrica de MCM-41, su facilidad de síntesis y posibilidad de incorporación de grupos funcionales muy diversos, hace que estos materiales presenten un elevado potencial para el desarrollo de materiales híbridos con determinadas funciones. Si bien al principio de su descubrimiento (década de los 90) se emplearon básicamente como soportes para el desarrollo de catalizadores y adsorbentes,³⁹ por ejemplo para la eliminación de especies tóxicas como Hg^{2+} ^{27a} o cromato y arseniato⁴⁰ en agua, o como fase estacionaria en cromatografía,³³ durante los últimos años ha ido incrementando los ejemplos en los que el control de sus dimensiones y propiedades superficiales se aprovecha para el desarrollo de otros tipos de dispositivos como sensores ópticos o válvulas/puertas moleculares en las que se puede controlar la accesibilidad de un sustrato. A continuación se describen algunos de los ejemplos más interesantes.

Válvulas nanoscópicas. Una de las aplicaciones de este tipo de sólidos con una estructura bien definida y un elevado control sintético es su empleo como soporte para el desarrollo de válvulas nanoscópicas o “puertas moleculares”. Se trata de dispositivos en los que es posible controlar la accesibilidad de moléculas en su interior mediante un estímulo exterior. Se pueden considerar como válvulas supramoleculares que abren y cierran la entrada a los nanoporos y que son capaces de aceptar o liberar moléculas bajo demanda. Uno de los primeros ejemplos en el que se describe el control activo sobre la accesibilidad de los poros de MCM-41 fue publicado en 2003.⁴¹ Mediante una reacción de dimerización reversible fotoinducida de moléculas de cumarina –que están ancladas en la entrada de los

³⁹ A. Safari, S. Hamoudi, *Chem. Mater.*, **2001**, *13*, 3151.

⁴⁰ G. E. Fryxell, J. Liu, T. A. Hauser, Z. Nie, K. F. Ferris, S. Mattigod, M. Gong, R. T. Hallen, *Chem. Mater.*, **1999**, *11*, 2148.

⁴¹ a) N. Kishor Mal, M. Fujiwara, Y. Tanaka, *Nature*, **2003**, *421*, 305; y un trabajo similar de los mismos autores en b) N. Kishor Mal, M. Fujiwara, Y. Tanaka, T. Taguchi, M. Matsukata, *Chem. Mater.*, **2003**, *15*, 3385.

poros de MCM-41– es posible controlar la liberación de colestano. Los dímeros que se forman a la entrada de los canales impiden que las moléculas ocluidas en su interior puedan ser liberadas, mientras que la irradiación con luz UV de 250 nm revierte la reacción de dimerización, permitiendo la liberación de las moléculas de colestano. Otro ejemplo del **control fotoquímico** de la accesibilidad a canales de MCM-41 es el descrito en un trabajo de Brinker y colaboradores.⁴² Incorporan en el interior de los canales de MCM-41 un derivado azoico en el que es posible inducir la fotoisomerización de *trans* a *cis* mediante irradiación con luz UV y revertirla mediante calentamiento o irradiación con longitudes de onda superiores. Esta isomerización permite que la estructura orgánica introducida en el interior de los mesoporos pueda actuar como una válvula nanoscópica, ya que el isómero *trans* posee una longitud de unos 18.2 Å y el *cis* de 14.8 Å. En otro trabajo, el anclaje covalente de un derivado fotocromico, una indolinoespirotaftoxazina, en la superficie de una sílice mesoporosa permite controlar la permeabilidad a gases del material también mediante control fotoquímico.⁴³ Un ejemplo de **control** mediante procesos **redox** se describe mediante la preparación de *thin-films* de MCM-41 cuya entrada del poro está funcionalizada con ligandos que actúan como puerta que se puede “abrir” y “cerrar” mediante una reacción redox. Tras la difusión en los canales de moléculas luminiscentes cierran las válvulas mediante la formación de un pseudorotaxano con los ligandos que están covalentemente anclados en la entrada del poro. Cuando desean que las moléculas fluorescentes sean liberadas sólo tienen que añadir un reductor que induce el desensamblaje del pseudorotaxano, por tanto, la apertura de la puerta.⁴⁴ También se ha descrito el **control iónico y en función del pH** de la puerta molecular a través de la funcionalización de la entrada de los poros con poliaminas alifáticas.⁴⁵ La adición de aniones voluminosos que son capaces de enlazarse a las cadenas de aminas provocan el bloqueo del poro por impedimentos estéricos. Además a pH ácido las aminas protonadas se repelen, lo que provoca de nuevo el bloqueo de la entrada del poro.

⁴² N. Liu, Z. Chen, D. R. Dunphy, Y.-B. Yiang, R. A. Assink, C. J. Brinker, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2003**, *42*, 1731.

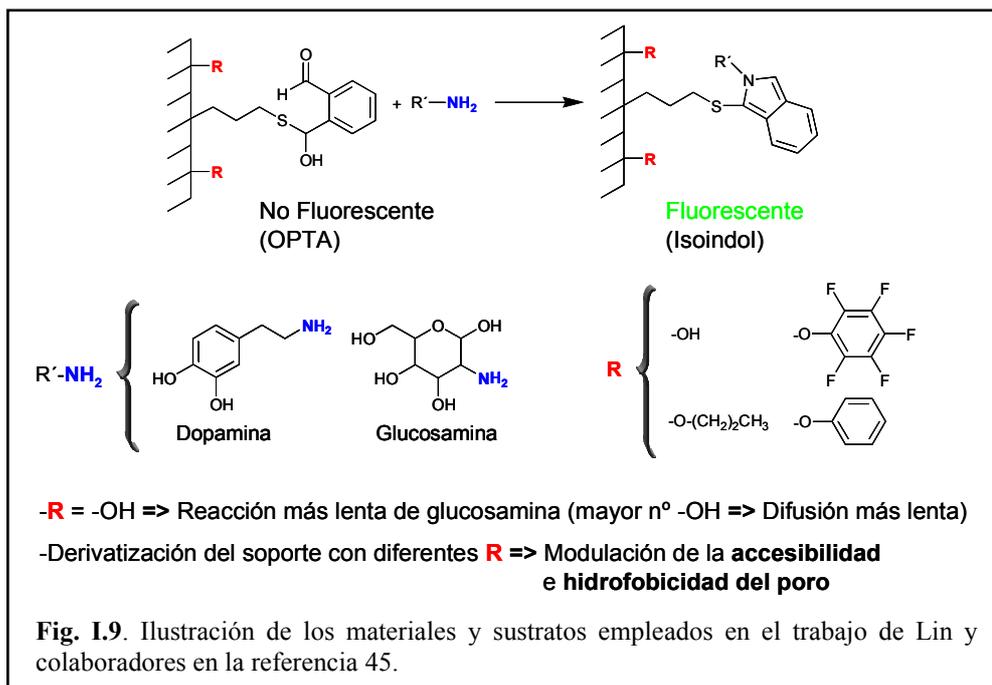
⁴³ S. Yagi, N. Minami, J. Fujita, Y. Hyodo, H. Nakazumi, T. Yazawa, T. Kami, A. Hyder Ali, *Chem., Commun.*, **2002**, 2444.

⁴⁴ R. Hernández, H.-R. Tseng, J. W. Wong, J. F. Stoddart, J. I. Zink, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 3370.

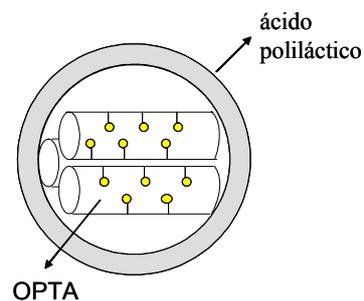
⁴⁵ R. Casasús, M. D. Marcos, R. Martínez-Mañez, J. V. Ros-Lis, J. Soto, L. A. Villaescusa, P. Amorós, D. Beltrán, C. Guillem, J. Latorre, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 8612.

Por otro lado, los poros silíceos de MCM-41 funcionalizados con grupos orgánicos pueden ser utilizados como estructuras sintéticas para *mimetizar* los sitios activos de enzimas o anticuerpos para interacciones covalentes y/o no covalentes con los sustratos. En un trabajo de 2001, Lin y colaboradores⁴⁶ describen la síntesis de un sistema híbrido basado en un material MCM-41 que incorpora un grupo sensible a aminas. Se trata de un hemiacetal o-ftálico (OPTA), que reacciona con aminas primarias para dar lugar a un isoindol, producto fluorescente, ver Fig. I.9. Además de la selectividad por exclusión de tamaño, ya que sólo aminas suficientemente pequeñas pueden difundir a través de los poros, los autores preparan materiales multifuncionalizados a partir de la MCM-41 derivatizada con grupos OPTA. De esta manera existen interacciones no covalentes que pueden dar lugar a respuestas diferentes en función del tipo de refuncionalización elegido. Así, observan que en la determinación de aminas biogénicas como la dopamina y la glucosamina y, a pesar de que en ambos casos la reacción con el OPTA en disolución es instantánea, se obtienen diferentes cinéticas en la respuesta para cada sustrato y en función del material estudiado. Por ejemplo, en el caso de la glucosamina y el material sin refuncionalizar (R = -OH en la Fig. I.9) observan una menor velocidad de reacción al ser más lenta la difusión de una molécula con múltiples grupos OH a través de los poros de un material con múltiples grupos silanol.

⁴⁶ V. S.-Y. Lin, C.-Y. Lai, J. Huang, S.-A. Song, S. Xu, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 11510.



En otro trabajo similar,⁴⁷ el mismo autor describe el recubrimiento con ácido láctico de la superficie exterior de unas nanoesferas de MCM-41. Al igual que en el caso anterior, el interior de las nanopartículas ha sido funcionalizado con OPTA, que informa de la difusión de aminas primarias al interior de los poros mediante la formación del isoindol fluorescente. Llevando a cabo varios ensayos a pH fisiológico con varios neurotransmisores, observan que la cinética de difusión al interior de las nanoesferas es bastante mayor en el caso de la dopamina con respecto a las otras dos aminas estudiadas (el ácido glutámico y la tirosina), siendo esta diferencia atribuida a las diferentes interacciones electrostáticas, por enlaces de hidrógeno y



⁴⁷ D. R. Radu, C.-Y. Lai, J. W. Wiench, M. Pruski, V. S.-Y. Lin, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1640.

dipolares entre los neurotransmisores y la capa de ácido láctico que recubre las nanoesferas.

En conclusión, la funcionalización selectiva de la superficie interior y exterior de materiales mesoporosos estructuralmente uniformes como MCM-41 con diferentes moléculas orgánicas permite la regulación precisa y selectiva de la penetración de determinadas moléculas con cierto tamaño y propiedades químicas en los nanoporos. Esto es posible bien mediante el empleo de *válvulas nanoscópicas*, bien mediante el control de las propiedades superficiales del soporte.

4.4- Empleo de UVM-7 como Soporte para el Desarrollo de Sensores Moleculares Cromo-/Fluorogénicos.

Las características de las matrices síliceas MCM-41 como soportes para el desarrollo de sensores ópticos presentan varias ventajas⁴⁸ como:

- La transparencia óptica en el rango del visible y la inercia química y fotoquímica de la sílice, lo que minimiza la interferencia en el proceso de medida/reconocimiento.

- La posibilidad de anclaje covalente de la sonda óptica, con lo que se evita la pérdida de los cromóforos en el disolvente.

- La posibilidad de modulación de sus propiedades superficiales mediante la introducción de grupos funcionales secundarios (por ejemplo, control de la hidrofobia) y de la de la entrada al poro (válvulas moleculares),

- La elevada superficie de estos materiales, que posibilita una mayor funcionalización con los cromóforos sin que exista interacción entre los mismos (lo que podría dar lugar a procesos de desactivación de la fluorescencia⁴⁹) y que además asegura la rápida difusión de las especies moleculares en el material, especialmente en el caso de **UVM-7** que presenta un sistema de poros bimodal.

A pesar de estas ventajas, se han descrito muy pocos sensores químicos moleculares soportados sobre MCM-41, de hecho, el primer ejemplo de

⁴⁸ Para una revisión general ver B. J. Scout, G. Wirnsberger, G. D. Stucky, *Chem. Mater.*, **2001**, *13*, 3140.

⁴⁹ M. Ganschow, M. Wark, D. Wörle, G. Schulz-Ekloff, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2000**, *39*, 160.

incorporación covalente de un cromóforo (un nitrofenil derivado de la anilina) en MCM-41 descrito por Mann y colaboradores no aparece hasta 1998.⁵⁰

5.- CONCLUSIONES.

Los sistemas híbridos aquí descritos presentan un gran potencial para su empleo como sistemas de reconocimiento, sensores o control de procesos al nivel nanoscópico. Es posible no sólo controlar la funcionalización con grupos orgánicos para conseguir las propiedades deseadas, si no que se puede obtener dispositivos fácilmente recuperables y manejables. Además las matrices con una estructura determinada pueden participar de forma activa en el proceso de reconocimiento y no meramente como un soporte inactivo. En el caso de sensores ópticos siendo las matrices de sílice óptimas por su transparencia e inercia fotoquímica, y en concreto UVM-7 por su elevada superficie específica y su sistema de poros bimodal.

Uno de los principales inconvenientes de los sensores moleculares es su incapacidad para funcionar en disolución acuosa, siendo necesario el empleo de disolventes orgánicos puros o mezclas acuosas, bien por problemas de solubilidad del ligando, o, principalmente en el caso de la detección de aniones, por problemas de la elevada energía de solvatación que hay que vencer en este medio para la coordinación de los iones. La incorporación de los ligandos en soportes sólidos no sólo descarta los problemas de solubilidad, si no que por las características especiales de los materiales, puede mejorar la respuesta de los mismos.

En resumen, esta nueva estrategia basada en el diseño de receptores-diseño de cromóforos unificado con las propiedades “a la carta” de los nuevos materiales abre un abanico de posibilidades muy amplio en la obtención de dispositivos cada vez más selectivos y eficaces en el control de procesos a escala molecular.

⁵⁰ C. E. Fowler, B. Lebeau, S. Mann, *Chem. Commun.*, **1998**, 1825.

CAPÍTULO II.

Sistemas Híbridos Mesoporoso-Aminometilantraceno
como Sondas Fluorogénicas para ATP.

1.- INTRODUCCIÓN.

Uno de los retos de la química supramolecular ha sido el reconocimiento de nucleótidos en disolución acuosa por su importancia biológica siendo el ATP, adenosin 5'-trifosfato, una de las moléculas de mayor interés, al ser la “moneda” energética empleada por los diferentes organismos y estar presente por tanto en todas las células vivas. Su monitorización puede ser empleada para estudiar actividades celulares o su determinación puede servir de indicativo de la contaminación de origen bacteriológico. Por su extendida presencia en la materia viva, el ATP ha sido ampliamente utilizado como un índice para las determinaciones de biomasa en microbiología clínica, control de calidad en alimentos y análisis medioambiental.¹

Es conocido que el ATP es capaz de interactuar con receptores poliamínicos protonados mediante interacciones electrostáticas y por enlace de hidrógeno. Bianchi y colaboradores² realizan un estudio de la interacción de ATP con receptores poliamínicos macrocíclicos mediante potenciometría y ³¹P RMN, llegando a la conclusión de que no solamente las interacciones electrostáticas con el anión ATP son importantes, si no que también la contribución de los enlaces de hidrógeno es fundamental. En un trabajo de Giuffrè y colaboradores³ también se realiza un estudio de la interacción de ATP con varias aminas y aminoácidos mediante técnicas potenciométricas y concluyen que la estabilidad de los complejos formados depende principalmente de las cargas implicadas en la reacción de formación del correspondiente complejo.

Vencer la solvatación de los aniones en medio acuoso para conseguir una coordinación efectiva del receptor con el sustrato es complicado y generalmente requiere del empleo de ligandos capaces de coordinar al sustrato mediante diferentes tipos de interacción. En el caso del ATP, a las interacciones electrostáticas o por enlace de hidrógeno, podemos sumar interacciones por π -stacking.⁴ Por eso es frecuente el empleo de poliaminas alifáticas –que se protonan

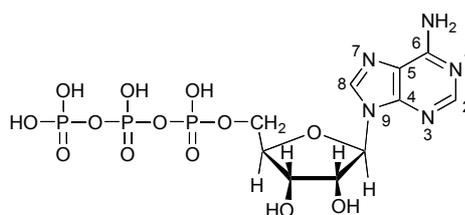
¹ C. T. Gregg, M. W. Griffiths, O. Olsen, *Physical Methods for Microorganisms Detection*. Ed. W. H. Nelson. Boca Raton, CRC Press, **1991**.

² A. Bianchi, M. Micheloni, P. Paoletti, *Inorg. Chim. Acta*, **1988**, *151*, 269.

³ C. De Stefano, C. Foti, A. Gianguzza, O. Giuffrè, S. Sammartano, *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, **1996**, *92*, 1511.

⁴ Interacciones por el solapamiento de la nube electrónica π entre dos compuestos aromáticos.

fácilmente en disolución acuosa— funcionalizadas con grupos aromáticos que son capaces de dar interacciones por π -stacking con el grupo adenina del ATP. Schneider y colaboradores⁵ proponen que la suma de las interacciones electrostáticas con interacciones hidrofóbicas o por π -stacking con el grupo adenina del ATP mejoran la interacción con este anión. Así, mediante el empleo de un receptor azoniociclofano, que posee una cavidad hidrófoba en la que puede acomodar nucleobases, estos autores obtienen mediante valoraciones por ¹H RMN, constantes de hasta 4×10^4 para ATP en agua.



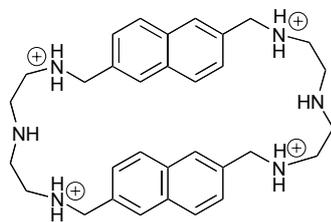
ATP

Uno de los investigadores que más ha estudiado la interacción de receptores abióticos con el ATP ha sido J. M. Lehn. En un trabajo de 1993⁶ describe el empleo un receptor poliamínico macrocíclico con dos subunidades de naftaleno dispuestas de tal manera que son capaces de formar complejos de intercalación con sustratos orgánicos con una conformación plana (compuesto **1**). Este receptor puede coordinar sustratos orgánicos en disolución acuosa mediante una combinación de interacciones por π -stacking y electrostáticas o por enlace de hidrógeno a través de los grupos amino protonados. Tras estudiar la coordinación de varios aniones a pH 6, pH en el que el macrociclo se encuentra tetraprotonado, llegan a varias conclusiones interesantes. Tras la adición de diferentes nucleótidos (AMP^{2-} , ADP^{3-} , ATP^{4-} , GMP^{2-} , CMP^{2-} , UMP^{2-}) se observa una disminución de la emisión de fluorescencia del naftaleno y un aumento de la estabilidad del complejo con el número de cargas negativas, de manera que para AMP^{2-} el logaritmo de la constante de formación del complejo ($\log K$) es 4.1, para ADP^{3-} $\log K = 5.0$ y para ATP^{4-} $\log K = 5.1$, lo que parece indicar la importancia de las interacciones electrostáticas y no sólo por π -stacking. Las constantes de estabilidad observadas para los correspondientes sustratos neutros, adenina ($\log K = 2.2$), guanina ($\log K =$

⁵ H.-J. Schneider, T. Blatter, B. Palm, U. Pflingstang, V. Rüdiger, I. Theis, *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, *114*, 7704.

⁶ M. Dahens, J.-M. Lehn, J.-P. Vigneron, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, **1993**, 1379.

3.3), citosina ($\log K = 1.6$) y uracilo ($\log K = 1.9$) también son menores que para los correspondientes derivados cargados AMP²⁻ ($\log K = 4.1$), GMP²⁻ ($\log K = 4.6$), CMP²⁻ ($\log K = 3.6$), UMP²⁻ ($\log K = 3.8$).



1

En conclusión, el aumento de la fuerza de enlace con el tamaño y con la carga de los sustratos indica que, ambas, interacciones electrostáticas y por π -stacking contribuyen a la estabilidad de los complejos. Esto por ejemplo, queda también puesto de manifiesto en otro trabajo de Lehn en el que se emplea un receptor poliamínico macrocíclico con un grupo acridina como subunidad fluorescente y en donde se muestra que éstas pueden dar lugar a receptores artificiales para el reconocimiento de moléculas orgánicas complejas como son el ATP y NADPH.⁷ Otro tipo de receptor desarrollado por Lehn y colaboradores,⁸ basado en dos fragmentos de bis(fenantridinio), muestra una desactivación de la fluorescencia importante debido a la interacción por π -stacking con los nucleótidos. En este caso, las constantes ponen de manifiesto que la interacción es independiente de la carga del anión, siendo todas del orden de $\log K = 5$, incluso en el caso de la especie eléctricamente neutra de adenina, lo que demuestra que las interacciones por π -stacking son de importancia para la interacción con sustratos tanto neutros como cargados.

La introducción de una subunidad emisora como el nafataleno o la acridina permiten obtener información adicional del sistema a través de medidas de la variación en la emisión de fluorescencia. Así, siguiendo la estrategia receptor-subunidad emisora para el diseño de sensores químicos moleculares se han desarrollado varios sistemas capaces de reconocer selectivamente a ATP en

⁷ H. Fenniri, M. W. Hosseini, J.-M. Lehn, *Helv. Chim. Acta*, **1997**, *80*, 786.

⁸ P. C. M. Žinické, V. Tomišić, V. Simeon, J.-P. Vigneron, J.-M. Lehn, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1995**, 1073.

disolución acuosa y de informar de su coordinación mediante la emisión de una señal medible macroscópicamente bien mediante métodos electroquímicos,⁹ u ópticos, que incluyen la observación de un cambio de color¹⁰ o el empleo de fluoróforos.¹¹ Algunas de las estrategias más recientes se basan en utilizar proteínas o derivados de éstas para la interacción con ATP en disolución acuosa. Así por ejemplo, Anslyn y colaboradores^{11g} consiguen obtener una elevada selectividad para el reconocimiento de este anión mediante el empleo de librerías de péptidos inmovilizados en resinas obtenidas mediante técnicas combinatoriales. Utilizando 5-carboxyfluoresceína como fluoróforo y un derivado de cumarina como referencia interna, realizan pruebas con varias series de aminoácidos, obteniendo en el caso del tripéptido Ser-Tyr-Ser el mayor aumento de fluorescencia con ATP y una ausencia de respuesta para AMP y GTP. En otro trabajo, S. M. Butterfield y M. L. Waters diseñan un péptido con el objetivo de mimetizar el reconocimiento del ATP por proteínas. Utilizan un péptido con estructura de hoja β plegada, que contiene una pareja de residuos de triptófano en diagonal para permitir la intercalación de una base nucleotídica y que actúan a su vez como “informadores” del proceso de coordinación del ATP, ya que se produce una desactivación de la emisión de la fluorescencia de los grupos triptófano a 348 nm.^{11h} La combinación en el péptido de interacciones aromáticas y electrostáticas le confiere una gran afinidad por el

⁹ (a) P. D. Beer, J. Cadman, J. M. Lloris, R. Martínez-Máñez, M. E. Padilla-Tosta, T. Pardo, D. K. Smith, J. Soto, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, **1999**, 127 (b) P. D. Beer, J. Cadman, J. M. Lloris, R. Martínez-Máñez, J. Soto, T. Pardo, M. D. Marcos, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, **2000**, 1805.

¹⁰ F. Sancenón, A. B. Descalzo, R. Martínez-Máñez, M. A. Miranda, J. Soto, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2001**, *40*, 2640.

¹¹ Poliaminas con grupos antraceno, pireno o naftaleno a) M. E. Huston, E. U. Akkaya, A. W. Czarnik, *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, *111*, 8735; b) M. T. Albelda, M. A. Bernardo, E. García-España, M. L. Rodino-Salido, S. V. Luis, M. J. Melo, F. Pina, C. Soriano, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **1999**, 2545; c) F. Sancenón, A. Benito, J. M. Lloris, R. Martínez-Máñez, T. Pardo, J. Soto, *Helv. Chim. Acta*, **2002**, *85*, 1505; d) M. T. Albelda, J. Aguilar, S. Alves, R. Aucejo, P. Díaz, C. Lodeiro, J. C. Lima, E. García-España, F. Pina, C. Soriano, *Helv. Chim. Acta*, **2003**, *86*, 3118; basados en receptores multicomponentes poliamina-centro metálico catiónico, con una terpiridina como subunidad emisora e) M. E. Padilla-Tosta, J. M. Lloris, R. Martínez-Máñez, T. Pardo, F. Sancenón, J. Soto, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2001**, 1221; o con un grupo antraceno f) A. Ojida, S.-K. Park, Y. Mito-Oka, I. Hamachi, *Tetrahedron Lett.*, **2002**, *43*, 6193; con receptores basados en proteínas: g) S. E. Schnider, S. N. O’Neil, E. V. Anslyn, *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, *122*, 542; (h) S. M. Butterfield, L. Waters, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 9580.

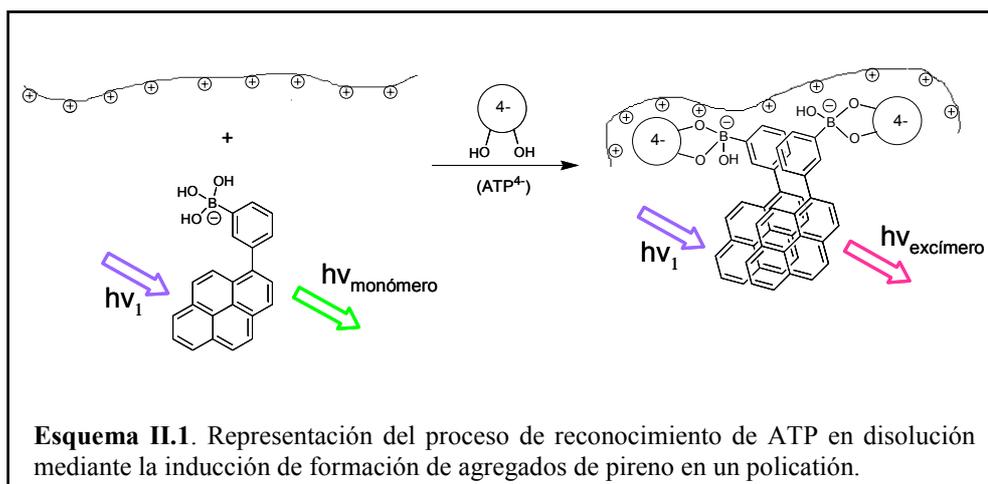
ATP en agua, con unos logaritmos para la constante de asociación, a pH 5 (tampón acetato 0.01 M), de 3.76 para ATP, 2.69 para ADP y 2.04 para AMP, atribuyendo aproximadamente una contribución por grupo fosfato del nucleótido de -1 kcal/mol al evento del enlace, mientras que para la interacción del grupo adenina con el *binding pocket* aromático de la proteína la contribución es de -1.8 kcal/mol, para el reconocimiento de ATP.

D. Astruc y colaboradores describen el empleo de dendrímeros funcionalizados con grupos amidoferrocenil para el reconocimiento de oxoaniones como H_2PO_4^- , HSO_4^- y ATP¹² a través de interacciones supramoleculares débiles en disolventes orgánicos, observando el “efecto dendrítico positivo” en el proceso de reconocimiento descrito en el Capítulo I (una mayor interacción con los aniones a medida que se incrementa el número de generación del dendrímero).

Siguiendo un procedimiento original, H. Tao y colaboradores desarrollan un nuevo sistema para la detección fluorimétrica de ATP basado en el aumento de emisión de la banda del excímero del pireno.¹³ Utilizan un proceso de agregación, mediado por la coordinación con el ATP, de un derivado borónico de este fluoróforo –capaz de enlazarse de forma reversible con el ATP a través de un grupo diol de la base nucleotídica–, en un policatión. En ausencia de ATP, el sistema pireno-policatión en disolución acuosa muestra la banda característica del monómero del pireno. Tras la adición del anión (con un límite de detección de 0.1 μM), se produce la agregación de los grupos pireno al enlazarse éste simultáneamente con el policatión mediante interacciones electrostáticas y con el grupo borónico del antraceno a través del grupo diol de la adenina, provocando así la aparición de la banda del excímero (ver Esquema II.1).

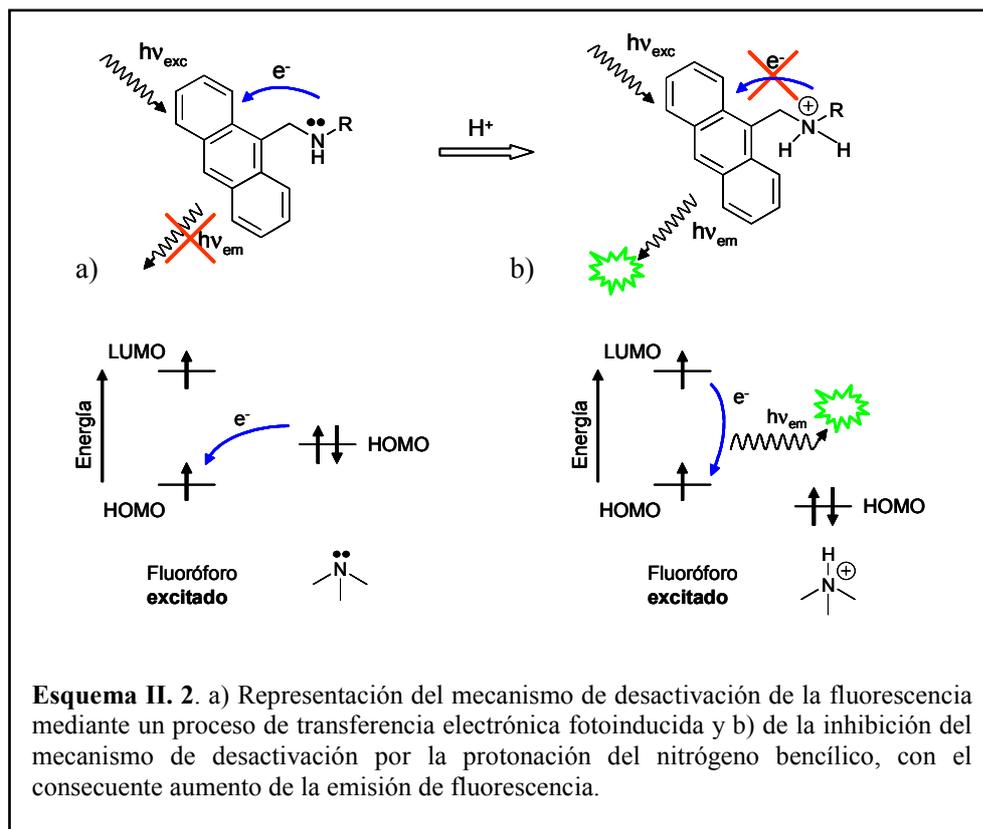
¹² M.-C. Daniel, J. Ruiz, J.-C. Blais, N. Daro, D. Astruc, *Chem. Eur. J.*, **2003**, 9, 4371.

¹³ Y. Kanekiyo, R. Naganawa, H. Tao, *Chem. Commun.*, **2004**, 1006.



El empleo de poliaminas conectadas a un hidrocarburo policíclico aromático como el antraceno, pireno o naftaleno, a través de un espaciador alquílico, presenta la ventaja de que, además de las interacciones por enlace de hidrógeno, electrostáticas y por π -stacking para la coordinación del ATP, se trata de sensores químicos fluorescentes que pueden ser “encendidos” o “apagados” mediante la protonación o desprotonación del N bencílico.¹⁴ En este tipo de sistemas, existe un mecanismo de desactivación de fluorescencia conocido como transferencia electrónica fotoinducida o *photoinduced electron transfer*, ET de aquí en adelante, que tiene lugar cuando el par electrónico de la amina se encuentra en un nivel energético adecuado para que tras la excitación electrónica del fluoróforo, se produzca una transferencia electrónica del HOMO de la amina al HOMO del fluoróforo excitado, en lugar del correspondiente proceso radiativo (ver Esquema II.2).

¹⁴ A. P. de Silva, R. A. D. D. Rupasinghe, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1985**, 1669.

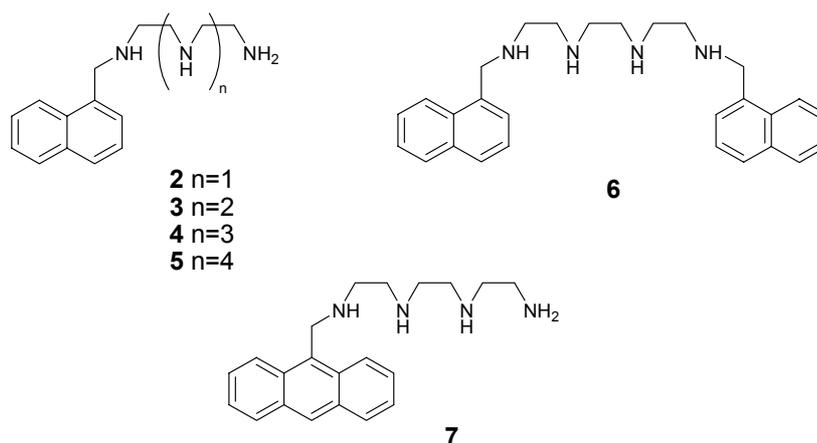


La protonación de este nitrógeno resulta en un aumento de su potencial de oxidación, por lo que se inhibe el proceso de transferencia electrónica, produciéndose la recuperación de la fluorescencia del antraceno. Además, estos sistemas se caracterizan porque al no haber conjugación electrónica entre el N bencílico y el fluoróforo, por la separación impuesta por el espaciador alquílico, la posición y la forma de la banda de emisión no varían con la protonación/desprotonación de la amina, únicamente cambia la intensidad de la fluorescencia.¹⁵

¹⁵ R. A. Bisell, A. P. de Silva, H. Q. N. Gunaratne, P. M. L. Lynch, G. E. M. Maguire, K. R. A. S. Sandanayake, *Chem. Soc. Rev.*, **1992**, 187.

La coordinación de determinados cationes¹⁶ o aniones^{11a,17} también produce la desactivación de la transferencia electrónica fotoinducida, por lo que se han realizado muchos estudios sobre este tipo de sistemas como sensores fluorescentes para iones.

Los ligandos **2-7** han sido empleados como sensores moleculares fluorescentes para el reconocimiento de ATP en disolución acuosa.^{11d} Las curvas de valoración muestran la forma típica de campana para este tipo de ligandos, es decir, una fuerte disminución de la emisión de luz a pH básico (> 6) –que corresponde al proceso de transferencia electrónica fotoinducida, ver Esquema II.2– y a pH ácido (< 4) –que se atribuye a la interacción con el ATP.



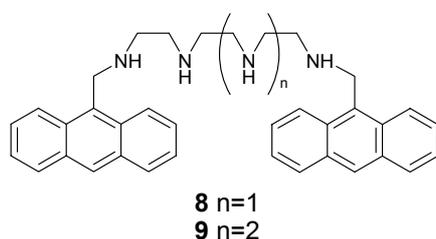
En un estudio realizado con estos ligandos, se evalúa cómo afecta la longitud de la cadena poliamínica y el sustituyente aromático a la interacción con el ATP. A pesar de que las interacciones carga-carga parecen ser los factores más importantes que regulan la magnitud de la interacción, se muestra que otros factores como interacciones tipo π -stacking han de considerarse, ya que se pone de manifiesto una mayor estabilidad de los complejos con ATP para los ligandos que contienen una subunidad de antraceno (**7**), $\log K = 4.7$, que para los que contienen una subunidad

¹⁶ Algunos de los primeros trabajos: a) J. P. Konopelski, F. Kotzyba-Hibert, J.-M. Lehn, J.-P. Desvergne, F. Fages, A. Castellan, H. Bouas-Laurent, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1985**, 433; b) A. P. de Silva, S. A. de Silva, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1986**, 1709; c) M. E. Huston, K. W. Haider, A. W. Czarnick, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 4460.

¹⁷ D. H. Vance, S. A. Czarnik, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 9397.

de naftaleno (**3**), $\log K = 3.8$. Se muestra además que la interacción de los receptores bis-cromofóricos con ATP (**6**) es mayor que la experimentada por el correspondiente compuesto mono-cromofórico (**3**). Por otro lado, estudios de ^1H -RMN revelan que en todos los sistemas están implicadas interacciones por π -stacking con el ATP, y que además estas interacciones se producen en un amplio intervalo de pH, incluido aquel en el que la fluorescencia se recupera igualándose a la del ligando libre.

Los estudios por fluorescencia en el estado estacionario muestran la existencia a pH ácido de un efecto de desactivación de la emisión siguiendo la protonación del anillo de adenina, atribuyéndola a la posibilidad de una transferencia electrónica o de energía desde el fluoróforo excitado a la adenina protonada. Con respecto a la última, la integral de solapamiento entre los espectros de emisión y absorción del antraceno y la adenina, respectivamente, es prácticamente cero, por lo que se excluye una desactivación por la transferencia de energía singlete-singlete. Sin embargo, la adenina puede ser reducida a pH ácido, por tanto, una posible explicación para la desactivación a este pH es la existencia de un proceso de transferencia electrónica desde el antraceno excitado a la subunidad protonada de adenina del ATP. Los análisis conjuntos de los resultados obtenidos mediante las valoraciones fluorimétricas y los diagramas de distribución de especies en función del pH muestran que en todos los sistemas ATP-receptor tiene lugar la desactivación de la fluorescencia frente a la protonación del N(1) de la adenina, por tanto, concluyen que la desactivación de la fluorescencia es debida a una transferencia electrónica del antraceno o naftaleno a la adenina protonada.



En el caso de los de las poliaminas funcionalizadas con antraceno **8** y **9**,^{11c} se realiza un estudio en función del pH frente a otros aniones, encontrando una gran selectividad para ATP, ya que estos ligandos únicamente capaces de responder a la presencia de este anión $-\gamma$ en menor medida a ADP $^-$, frente a AMP, sulfato,

fosfato y bromuro. Aquí de nuevo se observa una curva en forma de campana para el sistema ligando-ATP en función del pH; a pH básico hay una disminución de la fluorescencia y a pH menor de 4 se observa la desactivación de la fluorescencia por la interacción con el anión. Se encuentra una mayor variación en el caso de **9** que en **8**, atribuido a una mayor interacción de la pentaamina que de la tetraamina con el ATP.

El soporte de este tipo de ligandos fluorescentes en matrices inorgánicas que no interfieran en el proceso de medida –como puede ser la sílice– podría ser interesante, no sólo de cara a la obtención de dispositivos de medida de más fácil manejo y recuperables, si no para una mejora en la respuesta de los ligandos inmovilizados covalentemente, ya que como se ha indicado, esta restricción en de movimiento y la proximidad de los ligandos en el espacio podría inducir la aparición de procesos colectivos en los sólidos que pueden contribuir a la mejora en la sensibilidad de la respuesta (ver Capítulo I). Adicionalmente, existe la posibilidad de imponer una selectividad por exclusión por tamaño en el caso de emplear soportes con una cierta topología, con una distribución homogénea de canales de unas dimensiones determinadas como puede ser una matriz de **UVM-7**.

Anteriormente a que estos estudios empezaran a realizarse, y aprovechando la variación en la intensidad de la fluorescencia del ligando N-(9-antrilmetil)-N-propilamina en función del pH, se había descrito su anclaje covalente en un soporte de sílica gel, para su aplicación como sensor fluorescente de pH.¹⁸ Sin embargo, no se había descrito la inmovilización de este tipo de ligandos en matrices inorgánicas mesoporosas estructuradas como **UVM-7** y en concreto, no había nada sobre el uso de sistemas híbridos orgánico-inorgánico con materiales mesoporosos para el reconocimiento, via cambios de fluorescencia, de aniones en medio acuoso.

2.- OBJETIVOS.

El objetivo principal de este capítulo por tanto es la incorporación de un ligando de síntesis sencilla, tipo aminometilantraceno, en **UVM-7** y el estudio de sus propiedades como sonda fluorescente para ATP.

¹⁸ M. Ayadim, J. L. Habib Jiwan, A. P. De Silva, J. Ph. Soumillion, *Tetrahedron Lett.*, **1996**, *37*, 7039.

♦ Se realizará un estudio del comportamiento de los materiales híbridos en disolución así como de su respuesta frente a la especie de interés, ATP, y de otros sustratos que potencialmente puedan interferir como ADP, AMP o fosfato.

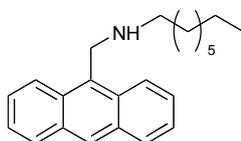
♦ Con el fin de evaluar la influencia en la respuesta de la inmovilización la sonda fluorescente en un soporte sólido, se compararán los resultados obtenidos para los materiales híbridos con los obtenidos para un ligando análogo en disolución en las mismas condiciones.

♦ Se sintetizará una familia de sólidos con varias concentraciones de ligando /fluoróforo para ver cómo afecta la concentración superficial a la respuesta y ver si es posible mejorar la interacción con ATP en disolución acuosa.

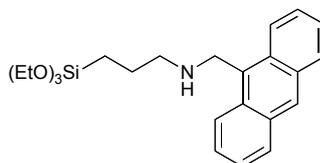
3.- SÍNTESIS

3.1.- En Fase Homogénea.

El ligando **AnNIC8** empleado como referencia para los estudios en disolución se obtiene mediante una reacción muy sencilla y de un elevado rendimiento a través de la condensación de la octilamina con 9-antracenoaldehído en etanol y posterior reducción con NaBH_4 .¹⁹



AnNIC8



AnTES

Para la preparación del correspondiente trietoxisilil derivado del aminometilantraceno (**AnTES**) se prefirió seguir otra ruta para evitar la hidrólisis de los grupos etoxisilano que podría ocurrir en el medio básico proporcionado por

¹⁹ La síntesis de ligandos similares mediante el mismo procedimiento está descrita en M. A. Bernardo, F. Pina, B. Escuder, E. García-España, M. L. Goino-Salido, J. Latorre, S. V. Luis, J. A. Ramírez, C. Soriano, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, **1999**, 915.

el borohidruro sódico empleado como reductor. **AnTES** fue sintetizado a partir de 9-clorometilantraceno mediante una sustitución nucleofílica con 3-(aminopropil)trióxido de silano. Es importante señalar que el producto mayoritario obtenido es el de disustitución (rendimiento 32 %) en lugar del monosustituido (rendimiento 9 %), aún teniendo la precaución de añadir el 9-clorometilantraceno lentamente. En la Fig. II.1. se muestran los espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN del producto obtenido.

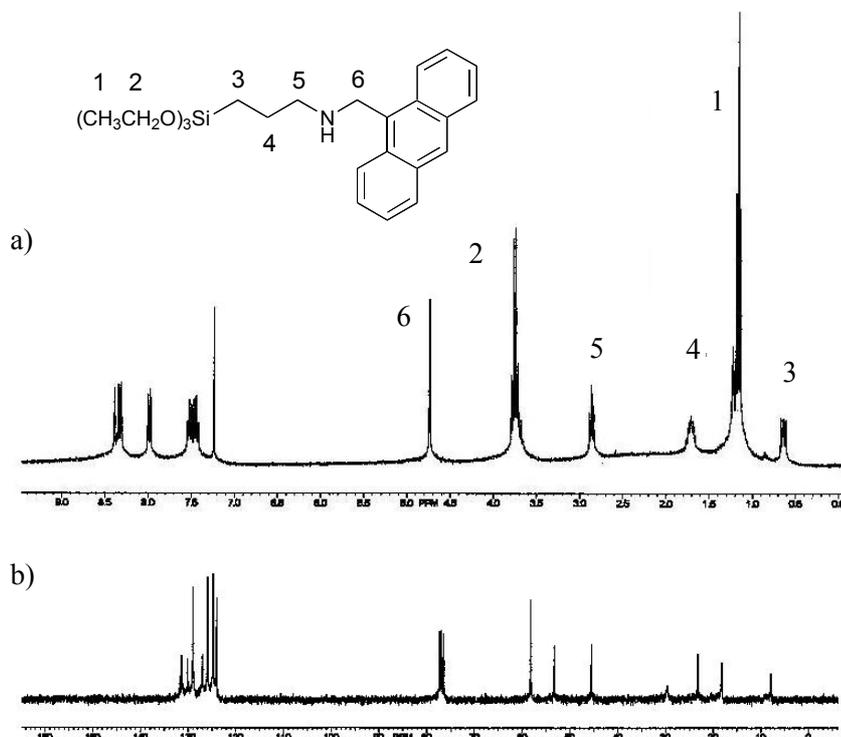


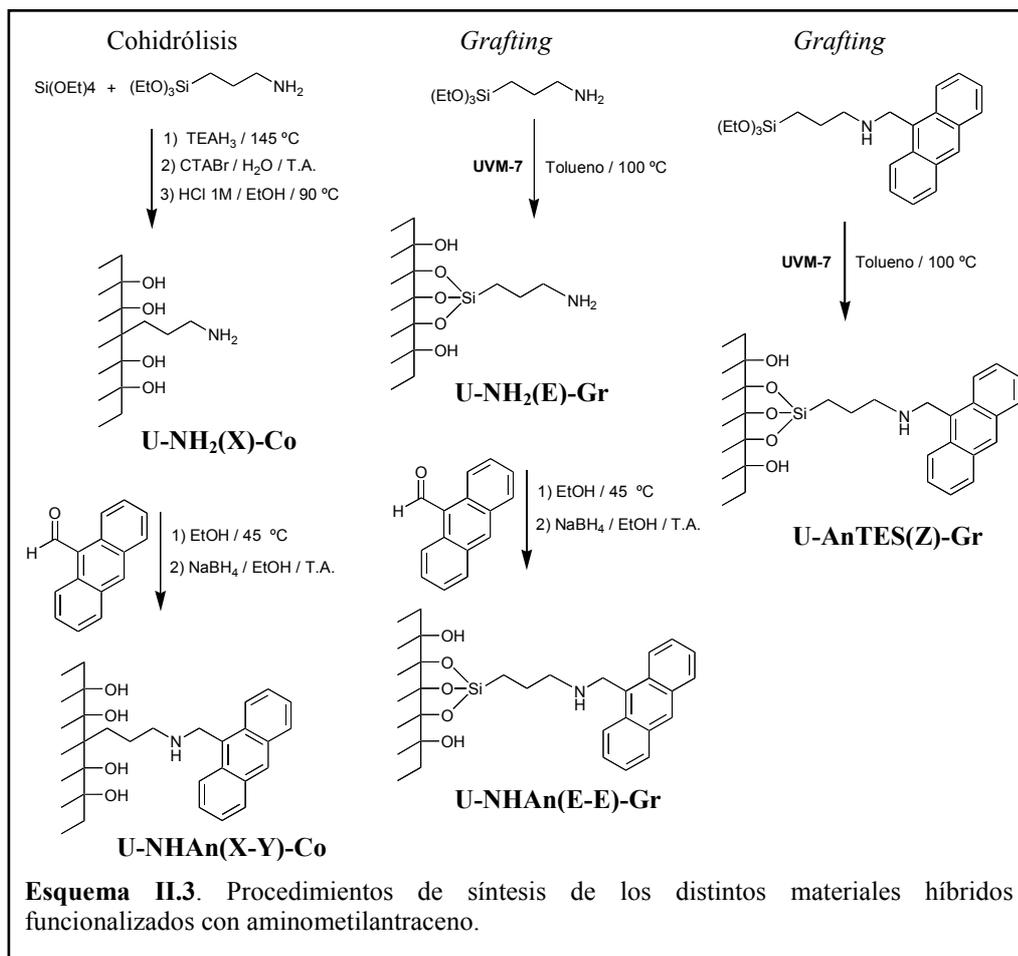
Fig. II.1. Espectros de a) ^1H y b) ^{13}C RMN para **AnTES** en CDCl_3 .

En el espectro de ^1H RMN se aprecian las señales aromáticas correspondientes al grupo antraceno que aparecen en el intervalo $7.44 < \delta < 8.39$ ppm. Además, cabe resaltar la presencia de las señales características de los trietoxisilil derivados, como el triplete que integra dos protones a 0.64 ppm, característico de un grupo metileno unido a silicio, o el triplete a 1.17 ppm del grupo metilo y el cuadruplete a 3.76 ppm –metileno unido al oxígeno– de los grupos etóxido. Otra señal importante, indicativa de que se ha formado el

compuesto es el singlete que aparece a 4.74 ppm en el espectro de ^1H y a 53.3 ppm en el de ^{13}C , correspondiente al metileno bencílico contiguo al grupo amino.

3.2.- En Fase Heterogénea.

Para la preparación de los distintos sólidos se siguieron varias estrategias con el fin de evaluar la influencia que puede tener el procedimiento sintético o la cantidad de ligando anclada en el sólido (concentración superficial de los grupos coordinantes-fotoactivos) en la respuesta. En el Esquema II.3 se ha intentado hacer una clasificación para mayor claridad.



Como ya se ha comentado, es posible seguir varias estrategias para la preparación de los materiales híbridos mesoporosos tipo MCM-41, bien por cohidrólisis del organoalcoxisilano con la fuente de sílice durante el proceso de formación de la estructura inorgánica, bien mediante métodos post-sintéticos, es decir, mediante el anclaje o *grafting* de la molécula orgánica al sólido mesoporoso a través de los grupos silanol de la superficie.

Para la síntesis de los sólidos **U-NHAn(X-Y)-Co**, obtenidos por cohidrólisis (**U** hace referencia a **UVM-7**), en primer lugar se procede a la preparación de **U-NH₂(X)-Co** –donde **X** indica el porcentaje en moles de 3-(aminopropil)trióxosilano (APTES) empleados con respecto a los moles totales de silicio– tal y como se describe en el Capítulo IV. Con el fin de evitar la oxidación de la amina a las elevadas temperaturas necesarias para la formación del complejo silatrano de los grupos siloxano con la trietanolamina, la reacción se lleva a cabo bajo atmósfera de argón. Tras la obtención de **U-NH₂(X)-Co** mesoestructurado, se procede a la extracción del bromuro de cetiltrimetilamonio (CTABr) empleado como plantilla en medio HCl 1M en etanol a reflujo,²⁰ realizando este paso por duplicado con el fin de asegurar la máxima extracción del surfactante posible. Para la obtención de **U-NHAn(X-Y)-Co** –donde **Y** representa el porcentaje en moles de 9-antracenoaldehído añadidos con respecto a los moles de silicio–, se procede a la condensación de la amina primaria con 9-antracenoaldehído, que generalmente se añade en exceso (**Y = E**) en etanol (ver Esquema II.3). Es de esperar que esta reacción sea cuantitativa ya que el rendimiento para la obtención de **AnNIC8** en disolución es superior al 90% y el 9-antracenoaldehído debería de poder difundir perfectamente a través de los canales de **UVM-7**, si bien puede que el grado de funcionalización con antraceno sea algo mayor en la entrada del poro al ser ésta más accesible. La imina formada se reduce con borohidruro sódico, tras lo cual el exceso de borohidruro se elimina lavando con ácido clorhídrico acuoso para evitar pH demasiado básicos que podrían atacar a la estructura de sílice.

En el caso del material **U-NHAn(E-E)-Gr** –**E** representa que APTES y 9-antracenoaldehído han sido añadidos en un gran exceso con respecto a la sílice total– el material de partida es **UVM-7**. El anclaje covalente del ligando se realiza

²⁰ La extracción de CTABr en matrices mesoporosas tipo MCM-41 con HCl empleando etanol como disolvente es uno de los procedimientos más utilizados, ver por ejemplo a) B. T. Holland, C. Walkup, A. Stein, *J. Phys. Chem. B*, **1998**, *102*, 4301; b) R. I. Nooney, M. Kalyanaraman, G. Kennedy, E. J. Maggin, *Langmuir*, **2001**, *17*, 528; c) S. L. Burkett, S. D. Sims, S. Mann, *Chem. Commun.*, **1996**, 1367; d) A. Walkarius, C. Delacôte, *Chem. Mater.* **2003**, *15*, 4181.

mediante *grafting* del APTES con la sílice en tolueno anhidro. Una vez obtenido **U-NH₂(E)-Gr**, se procede a la condensación del 9-antracenoaldehído siguiendo el mismo procedimiento descrito para **U-NHAn(X-Y)-Co**.

En el caso de **U-AnTES(Z)-Gr** varios intentos de obtener una **UVM-7** funcionalizada por cohidrólisis con **AnTES** resultaron infructuosos ya que **AnTES** precipita en la mezcla de reacción incluso a $T > 100$ °C, de manera que la condensación se realizó finalmente mediante *grafting* en tolueno con una **UVM-7** blanca de manera similar a la descrita para **U-NH₂(E)-Gr**. En este caso **Z** representa el porcentaje en moles de **AnTES** con respecto a los moles de sílice totales.

Todos los sólidos resultantes se mantienen en extracción con Soxhlet en etanol durante al menos 6 horas con el fin de eliminar el exceso de antraceno que pueda haber quedado adsorbido sobre la superficie de la sílice. En la Tabla II.1 se incluyen todos los materiales preparados con una estimación de los moles de ligando por gramo de sólido (en función de las cantidades de reactivos empleadas en la síntesis).

La interpretación de los datos obtenidos por análisis termogravimétrico y análisis elemental para la determinación del contenido en grupos orgánicos de los materiales híbridos es bastante compleja. Si bien sí que se puede decir que hay un aumento en el contenido de materia orgánica tras las sucesivas etapas de funcionalización o al ir aumentando del porcentaje en moles empleados en la síntesis (ver el Capítulo V), no se obtienen valores del todo fiables, sobre todo en el caso de materiales con una baja funcionalización, ya que el error en el porcentaje en peso es mayor que la cantidad de materia orgánica que puede contener el sólido teniendo en cuenta la cantidad máxima de reactivos empleada en la síntesis. Las causas del error son debidas a que:

- A temperaturas superiores a 500 °C se observa una disminución en el peso de la muestra debido a la pérdida de agua por la condensación de los silanoles,²¹ que suele ser de un 1-2% (porcentaje en gramos de pérdida en peso con respecto a los gramos totales de sólido) y que a veces se solapa con la pérdida en peso correspondiente a la calcinación de la materia orgánica.

²¹ a) A. Steel, S. W. Carr, M. W. Anderson, *Chem. Mater.*, **1995**, 7, 1829; b) M. H. Lim, C. F. Blanford, A. Stein, *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 4090; c) C. W. Jones, K. Tsuji, M. E. Davis, *Microporous Mesoporous Mat.* **1999**, 33, 223.

- Tal y como se aprecia en el termograma de la Fig. V.1 (Capítulo V), la extracción del surfactante en medio HCl 1M no es total y suelen quedar contenidos de materia orgánica de un 4-6 %.

- La extracción en Soxhlet con etanol o las reacciones llevadas a cabo en este disolvente pueden provocar la esterificación de la sílice por la condensación de los grupos silanol con el etanol.²²

Como no se puede obtener un valor coherente, se da un valor orientativo para cada sólido a partir de las cantidades de ligando empleadas en la síntesis tal y como se muestra en la Tabla II.1. En esta tabla se incluye una estimación de los moles de ligando máximo por gramo de sólido calculados a partir de las cantidades de reactivos empleadas en la síntesis. A partir de esta estimación y el valor del área superficial de una **UVM-7** sin modificar,²³ se han calculado distancias intercromofóricas aproximadas para los grupos antraceno soportados en los distintos materiales –hay que tener en cuenta además que la distribución no tiene por qué ser homogénea y puede que la densidad de grupos funcionales sea algo mayor en la entrada de los mesoporos.

El número de moléculas por nm² (β_A) se ha calculado según la ecuación 1, suponiendo que todos los moles de APTES empleados en la síntesis se han anclado en el sólido y que la reacción posterior de condensación con el antracenoaldehído ha sido cuantitativa. En el caso del anclaje de **AnTES** por *grafting*, también suponemos que la reacción de condensación con los silanoles superficiales ha sido cuantitativa. Teniendo en cuenta que 1 gramo de **UVM-7** blanca (que representa unos 0.01667 moles de SiO₂) posee una superficie S de unos 1100 m² g⁻¹, calculamos el número de milimoles de ligando por gramo de sólido (α_A) y a continuación hacemos la conversión a número de moléculas por nm² empleando el número de Avogadro ($N_A = 6.023 \times 10^{23}$ moléc mol⁻¹).

$$\beta_A = \alpha_A \times 10^{-3} S^{-1} \times 10^{-18} \times N_A = \alpha_A \times S^{-1} \times 602.3 \quad (\text{en moléc nm}^{-2}) \quad (1)$$

(Los factores 10⁻³ y 10⁻¹⁸ se introducen para hacer la conversión de mmol a mol en α_A y de m² a nm⁻² en S^{-1} , respectivamente).

²² T. Kimura, K. Kuroda, Y. Sugahara, *J. Porous Mater.*, **1998**, 5, 127.

²³ J. E. Haskouri, D. Ortiz de Zárate, C. Guillem, J. Latorre, M. Caldés, A. Beltrán, D. Beltrán, A. B. Descalzo, G. Rodríguez-López, R. Martínez-Máñez, M. D. Marcos, P. Amorós, *Chem. Commun.*, **2002**, 330.

Tabla II.1. Número de moles de ligando por gramo y distancias intercromofóricas estimadas para los materiales U-NHAn(X-Y)-Co y U-AnTES(Z)-Gr.

| | α_A^a mmol g ⁻¹ | β_A^b moléc nm ⁻² | Distancia entre antracenos (Å) |
|------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------|
| U-NHAn(2-E)-Co | 0.33 | 0.182 | 23.4 |
| U-NHAn(10-E)-Co | 1.67 | 0.912 | 10.5 |
| U-NHAn(10-1)-Co | 0.17 | 0.091 | 33.1 |
| U-AnTES(0.3)-Gr | 0.05 | 0.027 | 60.4 |
| U-AnTES(1)-Gr | 0.17 | 0.091 | 33.1 |
| U-AnTES(2)-Gr | 0.33 | 0.182 | 23.4 |
| U-AnTES(4)-Gr | 0.67 | 0.365 | 16.5 |

^a Milimoles de aminometilantraceno por gramo de sólido considerando que la funcionalización con los grupos orgánicos ha sido del 100%.

^b Moléculas de antraceno por unidad de superficie.

En la caracterización de los derivados de UVM-7 mediante difracción de rayos X de polvo (ver Figs. II.2 y II.3) se observa que todos los materiales conservan las características típicas de una fase MCM-41, con el pico que aparece sobre ángulos $2\theta = 2^\circ$, indicativo de que las distintas etapas de síntesis no han afectado en gran manera a la estructura típica de la matriz silícea.

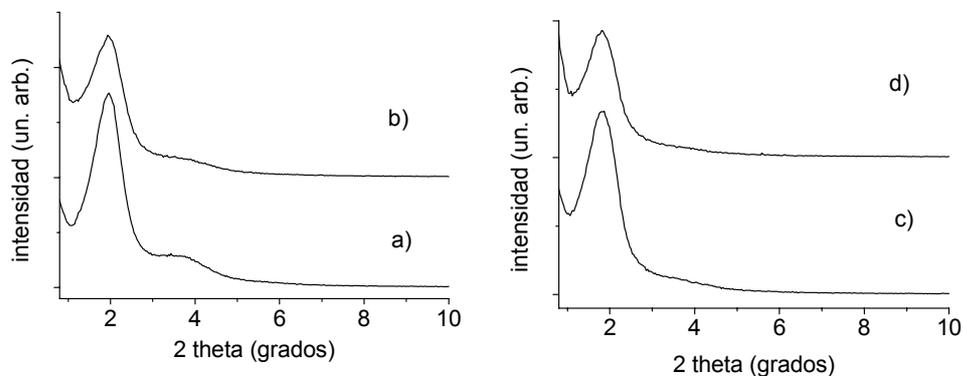


Fig. II.2. Difracción de rayos X de polvo para a) U-NH₂(2)-Co, b) U-NHAn(2-E)-Co, c) U-NH₂(10)-Co y d) U-NHAn(10-E)-Co.

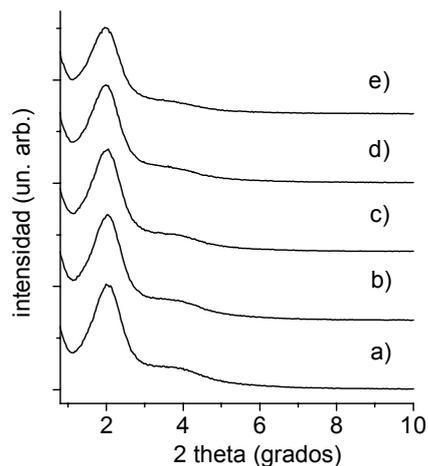


Fig. II.3. Difracción de rayos X de polvo para a) UVM-7, b) U-AnTES(0.3)-Gr, c) U-AnTES(1)-Gr, d) U-AnTES(2)-Gr, e) U-AnTES(4)-Gr.

En las isothermas de adsorción-desorción de nitrógeno también se reflejan las características típicas de una matriz UVM-7. Las isothermas de adsorción-desorción de nitrógeno a la temperatura del N₂ líquido se emplean para determinar el área específica, el volumen y la distribución de tamaño de poro de los materiales porosos (ver Capítulo V para la descripción de la técnica empleada).

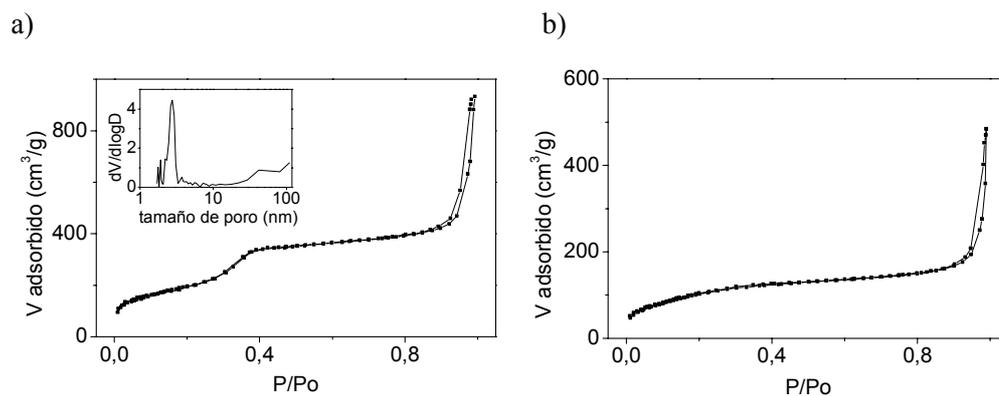


Fig. II.4. Isothermas de adsorción-desorción de N₂ y distribución del tamaño de poro para a) U-NHAn(2-E)-Co y b) U-NHAn(10-E)-Co.

En la isoterma de la Fig. II.4 a) para el sólido **U-NHAn(2-E)-Co** se aprecian dos saltos bien definidos, característicos de **UVM-7**. El primer salto, a una presión relativa intermedia (en el intervalo de $0.2 < P/P_0 < 0.4$), está relacionado con la condensación capilar del N_2 en el interior de los mesoporos. La ausencia de un ciclo de histéresis en este intervalo, y la estrecha distribución de poro, sugiere la existencia de mesoporos uniformes y cilíndricos –los ciclos de histéresis suelen aparecer como consecuencia de irregularidades que presentan los capilares. Para este sólido se obtienen valores de diámetro de mesoporo de 2.76 nm, con un volumen de $0.64 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$. El segundo salto, que aparece a presiones relativas superiores, corresponde al llenado de los poros texturales de mayor tamaño, que se forman entre las nanopartículas. En este caso, las curvas sí que muestran histéresis y además se observa una distribución de poro más ancha. Se obtiene un valor de $0.83 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ para el volumen del poro de mayor tamaño y un diámetro de 47.2 nm.

En el caso de la isoterma b), para el material **U-NHAn(10-E)-Co**, el primer salto correspondiente al llenado de los mesoporos ya no se aprecia tan claramente, indicación de una mayor funcionalización de los mismos, lo que resulta en un volumen del mesoporo significativamente menor, de $0.26 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$. La elevada saturación de los poros con grupos orgánicos hace que no se pueda determinar de manera fiable el diámetro del mesoporo.

En la siguiente figura (II.5) se muestran una isoterma de adsorción-desorción de N_2 representativa para uno de los materiales obtenidos por *grafting* con **AnTES**. En este caso también se aprecia una isoterma característica de **UVM-7**, con la distribución de tamaño de poro textural mejor definida, probablemente debido a que en este caso partimos de una matriz blanca de **UVM-7** y el anclaje de los grupos orgánicos se realiza *a posteriori*, lo que parece alterar menos las características de la matriz **UVM-7** original.

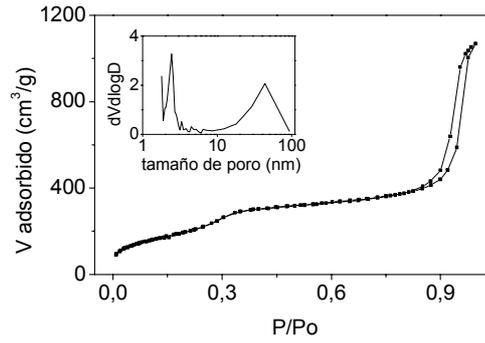


Fig. II.5. Isotermas de adsorción-desorción de N₂ y distribución del tamaño de poro para U-AnTES(4)-Gr.

En la Tabla II.2 se muestran los valores de superficie específica en m² por gramo calculados a partir de la isoterma BET y el volumen y tamaño de poro estimado mediante el método de BJH (ver Capítulo V).

Tabla II.2. Valores de superficie específica BET, volumen de poro y tamaño de poro calculados a partir de los datos de adsorción-desorción de N₂ para algunos de los materiales.

| | S_{BET} (m ² g ⁻¹) | V_{text}^a (cm ³ g ⁻¹) | D_{text}^a (nm) | V_{meso}^b (cm ³ g ⁻¹) | D_{meso}^b (nm) |
|--------------------|---|---|-----------------------------|---|-----------------------------|
| UVM-7 ^c | 1075 | 1.42 | 66.5 | 0.98 | 2.97 |
| U-NHAn(2-E)-Co | 711 | 0.83 | 47.2 | 0.64 | 2.76 |
| U-NHAn(10-E)-Co | 388 | 0.37 | 35.5 | 0.26 | — ^d |
| U-AnTES(4)-Gr | 732 | 1.14 | 29.3 | 0.55 | 2.49 |

^a Volumen (V) y diámetro (D) del poro textural.

^b Volumen (V) y diámetro (D) del mesoporo.

^c Valores tomados de la referencia 23.

^d No se puede determinar con fiabilidad.

En todos los materiales se observa una disminución en la superficie BET con respecto a una UVM-7 sin modificar ($S_{\text{BET}} = 1075 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$) y también del tamaño del mesoporo (2.97 nm y $0.98 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ para la UVM-7 blanca), lo que pone de

manifiesto la existencia de grupos funcionales anclados en la superficie interna de éste, que resulta en la reducción del volumen total del poro. En el caso del sólido preparado por métodos postsintéticos, **U-AnTES (4)-Gr**, esta reducción de tamaño de poro todavía es más significativa (diámetro de 2.49 nm). Esto parece lógico si tenemos en cuenta que el procedimiento por *grafting* colapsa algo más el poro al ser de mayor tamaño el grupo funcional introducido (ver Fig. II.6). Así, mientras que en un procedimiento de cohidrólisis el grupo trietoxisilano queda incluido en la pared del mesoporo, en procesos de *grafting* esto no ocurre.

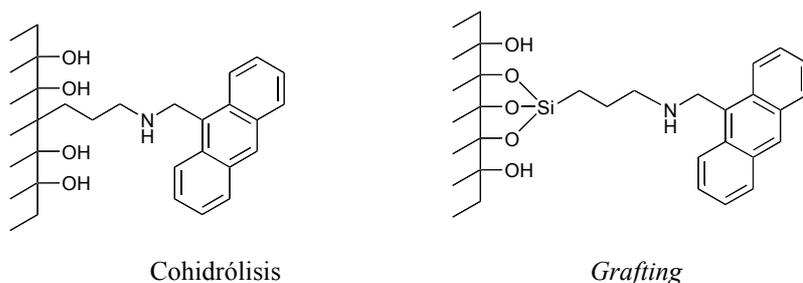


Fig. II.6

4.- ESTUDIOS EN DISOLUCIÓN. RESPUESTA DE LOS DISTINTOS SÓLIDOS.

4.1.- Medidas en Función del pH.

Con el objetivo de confirmar que la respuesta en función del pH sigue la tendencia esperada para este tipo de sistemas ET, se realizaron varias valoraciones fluorimétricas en función del pH para algunos de los materiales estudiados. Tal y como se muestra en la Fig. II.7, se puede observar que el patrón de fluorescencia para **AnNIC8** es muy similar al descrito para otras aminas.^{11b-d} En el caso de los sólidos, al igual que en el caso del ligando en disolución, los materiales presentan una fluorescencia máxima a pH ácido, si bien el perfil de la curva de valoración es diferente. Esto puede ser debido a la existencia de grupos silanol que poseen un $pK_a = 6.8$,²⁴ y que al protonarse o desprotonarse modifican la interacción de los

²⁴ M. Etienne, A. Walcarius, *Talanta*, **2003**, 59, 1173.

grupos aminometilantraceno con la superficie. Así los grupos amonio pueden interactuar con los silanolatos tal y como se muestra en la Fig. II.8, lo que provocaría un aumento aparente del pK_a . Este aumento del pK_a es mayor en el caso de **U-NHAn(2-E)-Co**, lo que está de acuerdo con la presencia de un mayor número de grupos silanol en este sólido al ser menor la funcionalización con grupos orgánicos.

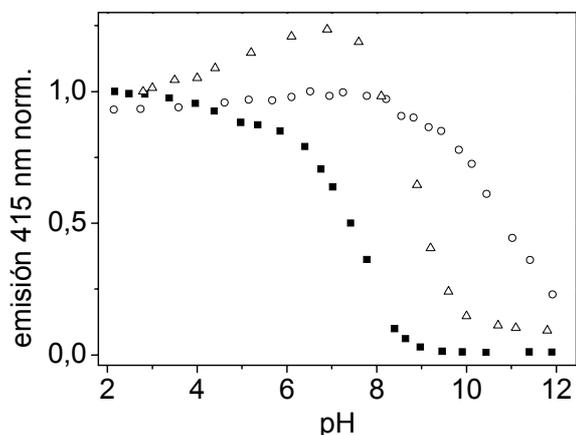
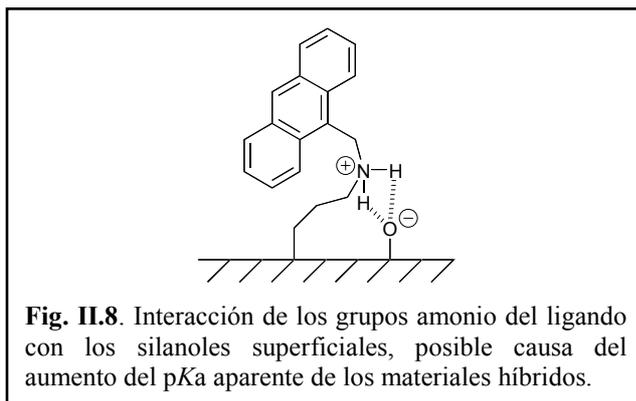


Fig. II.7. Valoración fluorimétrica de (■) **AnN1C8**, (○) **U-NHAn(2-E)-Co** y (△) **U-NHAn(10-E)-Co** en función del pH.

A partir del punto de inflexión se puede determinar un valor de pK_a para **AnN1C8** de 7,6, valor similar al observado para otras aminas benecílicas análogas.²⁵

En el caso de los sólidos sólo se puede dar un valor orientativo del pK_a aparente de los grupos amino del ligando aminometilantraceno para **U-NHAn(2-E)-Co** y **U-NHAn(10-E)-Co** de 10,7 y 8,9 respectivamente, ya que a partir de pH 11 se empieza a observar la disolución de la sílice.

²⁵ Ver por ejemplo Y. Al Shihadeh, A. Benito, J. M. Lloris, R. Martínez-Máñez, T. Pardo, J. Soto, M. D. Marcos, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **2000**, 1199.



4.2.- Interacción con ATP.

Confirmando la respuesta similar en función del pH y teniendo en cuenta que la desactivación por fluorescencia del ATP sólo se observa en el caso de que el nitrógeno pirimidínico de la adenina se encuentre protonado,^{11d} es decir, a pH < 4,²⁶ se decide llevar a cabo los estudios a pH 2.8. Además a este pH la interferencia con cationes metálicos se minimiza al encontrarse protonada la amina bencílica y no poder por tanto formar complejos con los metales.²⁷ Por otro lado, se ha de tener la precaución de no trabajar a pH < 2, ya que se ha observado que la velocidad de hidrólisis de los grupos fosfato del ATP a pH ácido aumenta considerablemente ($t_{1/2} = 5, 35$ y 400 min. para pH 0, 1.45 y 2.66 respectivamente),²⁸ si bien estos estudios se han llevado a cabo a una temperatura de 70 °C, por lo que la hidrólisis del ATP a temperatura ambiente y a pH 2.8 debería ser despreciable dentro del tiempo de medida en nuestro caso.

En la Fig. II.9 se muestran los espectros de emisión de fluorescencia para las valoraciones con ATP a pH 2.8 para el ligando **AnNIC8** y el sólido funcionalizado **U-NHAn(2-E)-Co** y que corresponden a las curvas de calibrado de la Fig. II.10.

²⁶ J. J. Christensen, R. M. Izatt, *J. Phys. Chem.* **1962**, *66*, 1030.

²⁷ F. Sancenón, A. B. Descalzo, J. M. Lloris, R. Martínez-Mañez, T. Pardo, M. J. Seguí, J. Soto, *Polyhedron*, **2002**, *21*, 1397.

²⁸ F. Ramirez, J. F. Marecek, J. Szamosi, *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 4748.

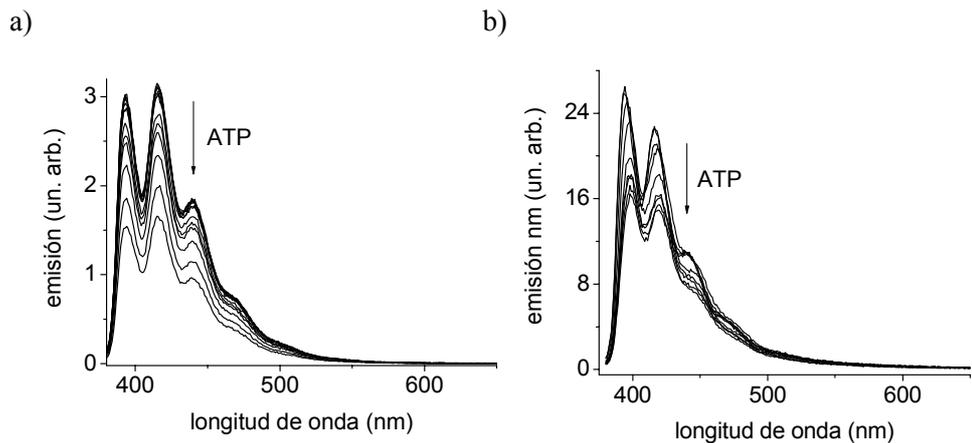


Fig. II.9. Espectros de emisión de a) **AnN1C8** y b) **U-NHAn(2-E)-Co** en agua a pH 2.8 y tras la adición de cantidades crecientes de ATP.

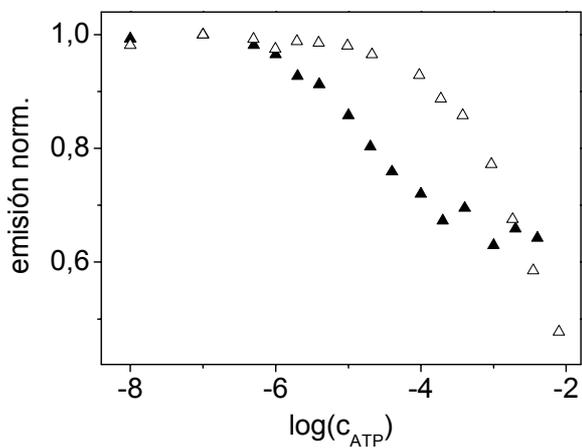


Fig. II.10. Curva de calibrado con ATP para (▲) **U-NHAn(2-E)-CoHi** y (Δ) **AnN1C8** en agua a pH 2.8. Intensidad de emisión leída a 415 nm y normalizada a 1.

En la gráfica de la Fig. II.10 se observa como en el caso del material híbrido la respuesta frente a ATP presenta un límite de detección menor –prácticamente de dos órdenes de magnitud– que para **AnN1C8**, si bien la disminución de emisión

para el ligando en disolución es algo mayor, probablemente debido a que no todos los grupos aminometilantraceno son accesibles en el sólido, por tanto, no en todos se produce la desactivación de la fluorescencia por la interacción con el ATP.

Cálculo de constantes. Para poder evaluar mejor la interacción del sustrato con el material híbrido mesoporoso, se ha desarrollado una ecuación, basada en la isoterma de Langmuir, que evalúa el proceso de adsorción del sustrato sobre una superficie. El valor de la constante (K) que se deduce a partir de la ecuación (2) (ver Apéndice para la deducción de la ecuación) es por tanto una constante de adsorción, que dará cuenta de la interacción entre el ATP y los centros de reconocimiento anclados al sólido.

$$I = I_L + (I_{LA} - I_L) \frac{Kc}{1 + Kc}; \quad c = \frac{-\left\{\frac{1}{K} + \frac{n_M}{V} - c_0\right\} + \sqrt{\left(\frac{1}{K} + \frac{n_M}{V} - c_0\right)^2 + \frac{4c_0}{K}}}{2} \quad (2)$$

En la ecuación (2) I representa la intensidad de fluorescencia leída para cada punto del calibrado e I_L e I_{LA} las intensidades de la suspensión en ausencia de ATP y con un exceso del anión (valor límite), respectivamente. c_0 es la concentración de sal añadida (mol L^{-1}) y n_M es la máxima cantidad de anión (en moles) que puede ser adsorbida en la monocapa. Finalmente, V es el volumen (en litros) donde se lleva a cabo el experimento.

En el caso de **AnNIC8** se ha utilizado la ecuación (3) empleada para el cálculo de constantes a partir de datos de absorbancia o emisión frente a la concentración de sustrato para complejos 1:1.²⁹

²⁹ J. Bourson, J. Pouget, B. Valeur, *J. Phys. Chem.*, **1993**, *97*, 4552.

$$I = I_0 + \frac{[I_{LA} - I_L]}{2c_0} \left[c_0 + c_A + \frac{1}{K} - \left[\left(c_0 + c_A + \frac{1}{K} \right)^2 - 4c_0c_A \right]^{1/2} \right] \quad (3)$$

En la ecuación (3) I representa la intensidad de fluorescencia leída para cada punto del calibrado e I_L e I_{LA} las intensidades de la disolución del ligando en ausencia de ATP y con un exceso del anión (valor límite), respectivamente. c_0 es la concentración de ligando (mol L^{-1}) y c_A es la concentración del anión añadida (mol L^{-1}). K se puede obtener entonces a partir de la representación de I vs. c_A mediante un ajuste no lineal en el que I_{LA} se puede dejar como parámetro libre en el caso de que no se pueda determinar experimentalmente con suficiente fiabilidad. En las Figs. II.11 y 12 se pueden ver los ajustes a partir de los cuales se han obtenido las constantes para **AnNIC8** y el sólido **U-NHAn(2-E)-Co**.

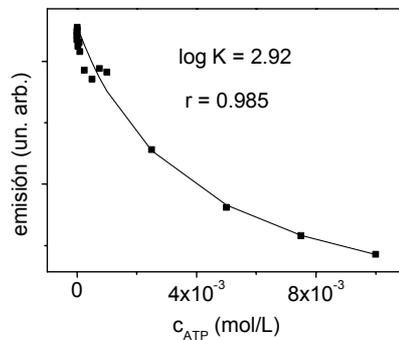


Fig. II.11. Ajuste de las curvas de calibrado para el cálculo de la constante para **AnNIC8** con ATP en agua a pH 2.8 mediante el empleo de la ecuación (3).

El aumento en la sensibilidad de la respuesta para **U-NHAn(2-E)-Co** con respecto a **AnNIC8** podría ser atribuido en principio a una mayor interacción del anión ATP con un sólido funcionalizado con múltiples grupos amonio. Si consideramos el sólido como un conjunto de micropartículas funcionalizadas con multitud de grupos amino que se encuentran protonados a este pH, es lógico considerar que la interacción electrostática será mayor que con el ligando libre en disolución. La importancia de las interacciones electrostáticas se pone de manifiesto en la Fig. II.12 y la Tabla II.4, donde se muestran los resultados de un estudio comparativo realizado para ADP, anión menos cargado que el ATP. A partir de los valores de pK_a (ver Tabla II.3) se deduce que a pH 2.8 el ATP se

encuentra mayoritariamente en forma dianiónica ($\text{H}_2\text{ATP}^{2-}$), mientras que el ADP posee una sola carga negativa (H_2ADP^-). En el caso del H_2AMP , al estar en forma neutra a este pH la solubilidad en agua es muy baja y por tanto no se pudieron realizar estudios con este anión. También es destacable el hecho de que un anión potencialmente interferente, como el H_2PO_4^- , presente comunmente en muestras biológicas, no produzca ningún cambio en la intensidad de fluorescencia de las suspensiones. Algo que también pone de manifiesto la importancia de la presencia del anillo de adenina en el proceso de reconocimiento.

Tabla II.3. Valores de pKa para los distintos aniones estudiados en este capítulo. Los valores corresponden a datos de la bibliografía³⁰ obtenidos a 298 K y fuerza iónica 0.1 M.

| Equilibrio | logKa |
|--|-------|
| $\text{ATP}^{4-} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{HATP}^{3-}$ | 6.50 |
| $\text{HATP}^{3-} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{H}_2\text{ATP}^{2-}$ | 4.00 |
| $\text{H}_2\text{ATP}^{2-} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{H}_3\text{ATP}^-$ | 1.80 |
| $\text{ADP}^{3-} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{HADP}^{2-}$ | 6.36 |
| $\text{HADP}^{2-} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{H}_2\text{ADP}^-$ | 3.95 |
| $\text{AMP}^{2-} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{HAMP}^-$ | 6.21 |
| $\text{HAMP}^- + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{H}_2\text{AMP}$ | 3.80 |

La mayor interacción con el sólido también podría ser debida a la contribución de los grupos fosfato del anión correspondiente, que pueden interactuar con los silanoles superficiales del sólido mediante enlaces de hidrógeno. Contribución que sería mayor en el caso del ATP por poseer un mayor número de grupos fosfato.

³⁰ Base de datos del programa *NIST Critical Stability Constants of Metal Complexes Database*, Texas A & M University, 1993.

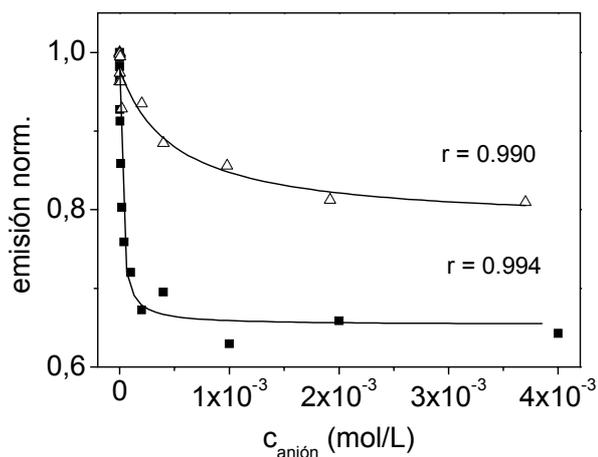


Fig. II. 12. Curva de calibrado para el sólido **U-NHAn(2-E)-Co** con (■) ATP y (Δ) ADP en agua a pH 2.8. Intensidad de emisión leída a 415 nm y normalizada a 1. La línea continua muestra el ajuste obtenido con la ecuación (2).

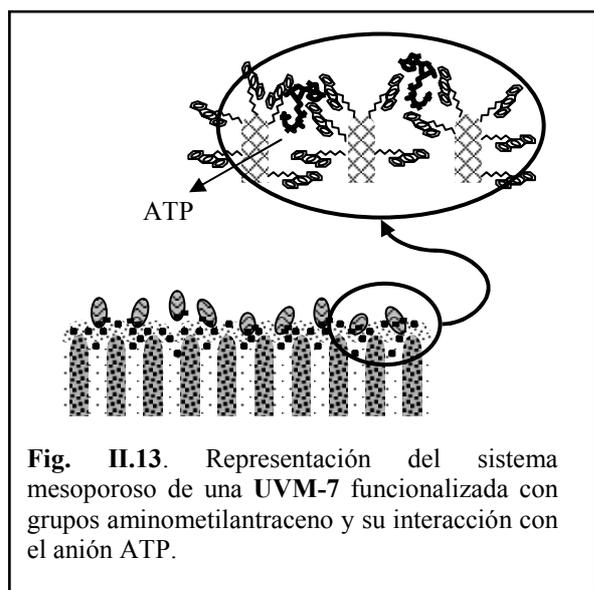
Tabla II.4. Constantes obtenidas para la interacción del sólido **U-NHAn(2-E)-Co** con varios aniones a pH 2.8.

| anión | H ₂ ATP ²⁻ | H ₂ ADP ⁻ | H ₂ AMP | H ₂ PO ₄ ⁻ |
|-------|----------------------------------|---------------------------------|--------------------|---|
| logK | 4.78 ± 0.06 | 3.3 ± 0.2 | ^a | ^b |

^a El AMP no es soluble a este pH ya que se encuentra en forma neutra.

^b La adición de este anión en una concentración 10⁻³ M no causa ningún cambio en la fluorescencia de la suspensión.

Comparando el logaritmo de la constante obtenido para la interacción del ATP con el sólido **U-NHAn(2-E)-Co** (logK = 4.78) y el ligando **AnN1C8** (logK = 2.92) se pone de manifiesto la mayor interacción del sólido con el anión, que como ya hemos comentado, podría atribuirse a un “efecto superficial” (aumento de la concentración efectiva de los receptores en el sólido), que se traduce en una mayor interacción electrostática. En la Fig. II.13 se muestra un esquema a nivel nanoscópico de la interacción molecular con el material híbrido.



Aparte del aumento de la interacción con ATP en el caso de **U-NHAn(2-E)-Co** con respecto a **AnNIC8** atribuido a las mayores interacciones electrostáticas en el sólido, también habría de considerarse que estamos empleando como soporte una matriz con una topología definida, es decir, puede ser que debido a la inmovilización de los ligandos en canales rígidos de unas dimensiones determinadas exista una contribución adicional a la mejora de la interacción con una molécula de tamaño considerable como es el ATP, que podría “encajar” en los canales de **UVM-7**. Este efecto de extracción en canales funcionalizados con grupos receptores podría resultar en un aumento de la concentración aparente del sustrato y por tanto en un aumento de la interacción.

A fin de comprender mejor el mecanismo de la interacción entre el anión ATP y los receptores híbridos como el sólido **U-NHAn(2-E)-Co**, se decidió preparar otros materiales conteniendo distintas proporciones de los grupos aminometilantraceno.

Se sintetizó un sólido con una carga de APTES cinco veces superior a la de **U-NHAn(2-E)-Co**. El material híbrido **U-NHAn(10-E)-Co** se prepara siguiendo el mismo procedimiento que para **U-NHAn(2-E)-Co** mediante cohidrólisis del APTES (un 10 % en moles con respecto a los moles de silicio totales) con el TEOS y posterior funcionalización del material **U-NH₂(10)** obtenido con un exceso del 9-

antracenoaldehído. La respuesta para el sistema **U-NHAn(10-E)-Co** con ATP se muestra en la Fig. II.14.

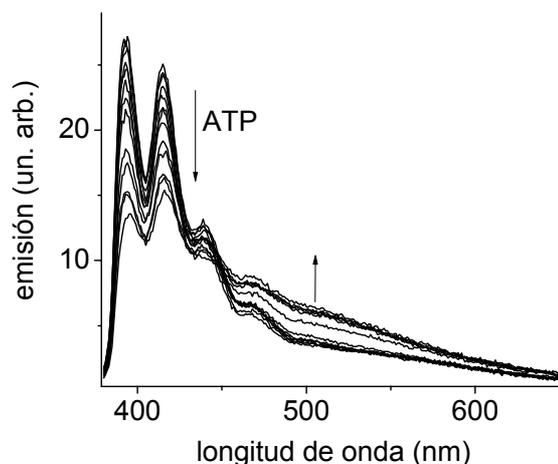


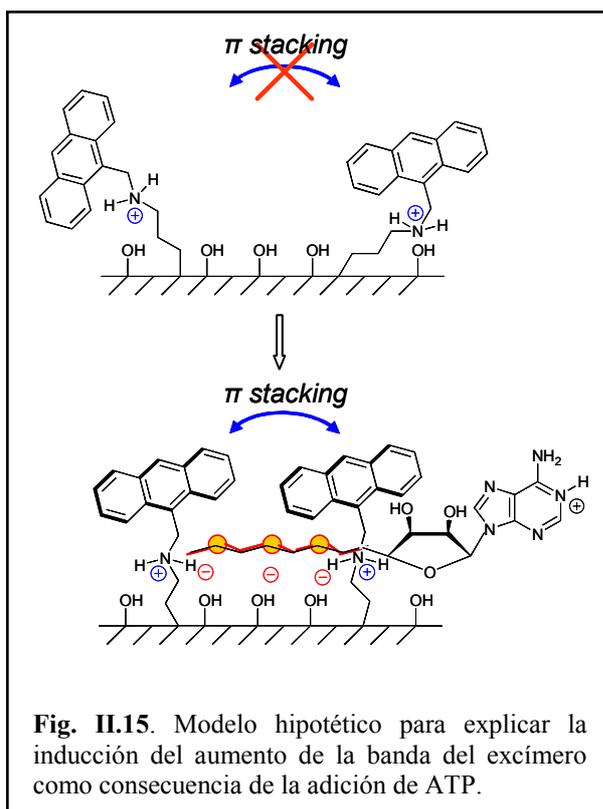
Fig. II. 14. Espectros de emisión de **U-NHAn(10-E)-Co** en agua a pH 2.8 y tras la adición de cantidades crecientes de ATP.

La Fig. II.14 muestra como, al igual que con el sólido **U-NHAn(2-E)-Co**, la adición de ATP induce una disminución de la fluorescencia a 415 nm. Sin embargo, para este sólido con un mayor número de centros activos se observa otro fenómeno. En los espectros se aprecia un aumento de una banda de emisión que aparece a mayores longitudes de onda (*ca.* 500 nm). Esta banda desestructurada y desplazada batocrómicamente con respecto a la banda estructurada del monómero se puede atribuir a la formación de complejos 1:1 entre un antraceno en el estado excitado y otro antraceno es el estado fundamental que se conocen como excímeros³¹ (término que proviene de las iniciales en inglés para *excited state dimer*). Estos complejos se disocian en el estado fundamental –por tanto no poseen el correspondiente espectro de absorción– y su presencia se caracteriza por la aparición una banda de emisión de fluorescencia desestructurada desplazada hacia el rojo en el espectro con respecto a la banda del monómero.

Tal y como se muestra en la Fig. II.15, se propone que el anión pueda estar ejerciendo un “efecto plantilla” en la formación del excímero. Es decir, a pesar de

³¹ a) B. Stevens, E. Hutton, *Nature*, **1960**, *186*, 1045; b) Th. Förster, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1969**, *8*, 333.

que los antracenos se puedan encontrar en una disposición adecuada para formar un excímero, y de que la formación de excímeros de antraceno en agua es posible, ya que ha sido descrita con anterioridad,³² la formación del complejo no parece favorecida en ausencia del ATP seguramente por la repulsión que puede existir entre los grupos amino que se encuentran protonados a este pH.¹⁸ En presencia de ATP sería posible la aproximación de los grupos antraceno al compensarse la repulsión electrostática que existe entre los grupos amonio, facilitando así la formación del excímero.



Un efecto similar –inducción de la formación de un excímero de antraceno en disolución acuosa mediante un efecto plantilla ejercido por un anión– ha sido

³² Ver por ejemplo a) S. A. Van Arman, A. W. Czarnik, *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, *112*, 5376; b) J. A. Sclafani, M. T. Maranto, T. M. Sisk, S. A. Van Arman, *Tetrahedron Lett.*, **1996**, *37*, 2193.

descrito en un trabajo de Czarnik con poliaminas alifáticas funcionalizadas con antraceno y el polianión heparina o poliglutamato.^{32a} Observan la aparición de una nueva banda a 510 nm y la disminución de la banda del monómero a medida que la cantidad del polianión aumenta.

La proximidad de los antracenos en una disposición susceptible de dar excímero se confirma en las medidas realizadas en acetonitrilo (ver Fig. II.16). Se aprecia la banda desestructurada a 500 nm en el caso del sólido **U-NHAn(10-E)-Co**, que no se observa para el sólido menos funcionalizado **U-NHAn(2-E)-Co** o un sólido con una menor carga de antraceno pero con el mismo número inicial de aminas, **U-NHAn(10-1)-Co**, que se describe posteriormente.

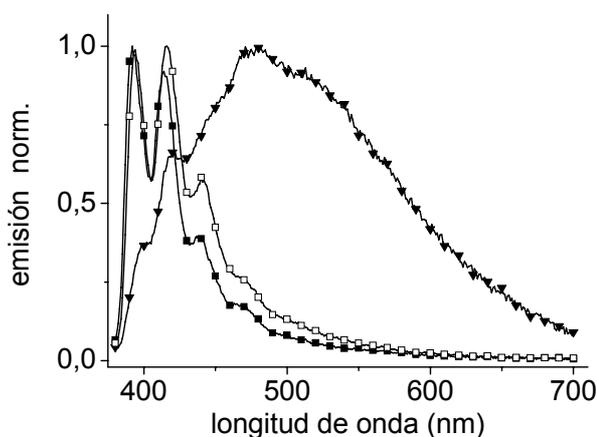


Fig. II. 16. Espectros de emisión para una suspensión de 0.2 mg / mL de (■) **U-NHAn(2-E)-Co**, (▼) **U-NHAn(10-E)-Co** y (□) **U-NHAn(10-1)-Co** en acetonitrilo ($\lambda_{exc} = 370$ nm).

Un excímero aparece cuando una molécula de antraceno excitado se alinea con otra molécula de antraceno en el estado fundamental para formar un dímero mediante π -stacking. La formación del excímero por tanto sólo es posible si las moléculas son capaces de colocarse en una disposición paralela para que sea posible el solapamiento entre los orbitales. El que en el sólido **U-NHAn(10-E)-Co** se detecten excímeros indicaría que los antracenos pueden moverse libremente en el sólido, es decir, que se solvatan bien con el acetonitrilo y la interacción con la superficie de la sílice no es muy fuerte.

Con el objetivo de confirmar el aumento de la banda del excímero como consecuencia de la adición de ATP, se preparó un material con un contenido todavía mayor de grupos aminometilantraceno, **U-NHAn(E-E)-Gr**. La respuesta de este material vs. ATP se muestra en la Fig. II.17.

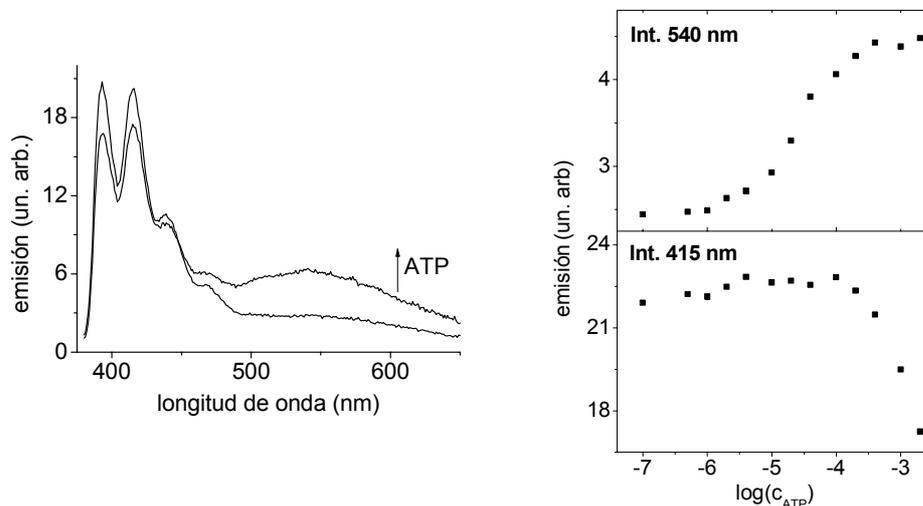


Fig. II.17. Espectros de emisión para **U-NHAn(E-E)-Gr** en agua a pH 2.8 y tras la adición de ATP. A la derecha se muestra la variación de la intensidad de fluorescencia para cantidades crecientes de ATP leída a dos longitudes de onda diferentes: a 540 nm (banda del excímero) y a 415 nm (banda del monómero).

En la Fig. II.17 se aprecia mejor el aumento de la banda del excímero inducido por la adición del ATP, lo que confirma la hipótesis anterior para el fenómeno observado en un sólido con un contenido elevado de grupos fotoactivos. Es destacable que el aumento de la banda a 540 nm, se produce a concentraciones de ATP del orden de micromolar, como en el caso de la respuesta de **U-NHAn(2-E)-Co** (en este caso por desactivación de la fluorescencia), mientras que si sólo monitorizamos la banda del monómero a 415 nm se observa un aumento “aparente” en el límite de detección (hasta una concentración de ATP *ca.* 10^{-4} M).

Otro de los inconvenientes de que se observe la banda del excímero –aparte de la respuesta compleja del material sensor– es que la formación de este complejo se propone como intermedio en la reacción de fotodimerización reversible del

antraceno, que puede tener lugar mediante irradiación a una longitud de onda similar a la empleada para la excitación del antraceno en estos estudios si dos antracenos se encuentran en la disposición adecuada y a una distancia apropiada.³³

Esta banda desestructurada también podría atribuirse a la formación de otro tipo de complejos en el estado excitado. Las aminas son capaces de interactuar mediante una transferencia de carga con un antraceno en el estado excitado para dar lugar a complejos que se conocen como exciplejos³⁴ y que hay que diferenciar del los excímeros, ya que en este caso se trata de *heterocomplejos*, por formarse entre dos especies diferentes. Por tanto, ha de considerarse que la aparición de esta banda podría ser el resultado de un proceso de transferencia de carga de uno de los grupos amino presentes en el sólido a un antraceno excitado. Sin embargo, hay autores que descartan que sea posible observar exciplejos entre el antraceno y aminas primarias o secundarias, ya que en lugar del exciplejo, lo que se observa es una transferencia de protón fotoinducida.³⁵ Además se observa que manteniendo constante la cantidad de amina con respecto al material empleado en **U-NHAn(10-E)-Co**, pero funcionalizando con muy poca cantidad de antraceno (un 1% en moles), no aparece la banda a mayores longitudes de onda (ver espectro para **U-NHAn(10-1)-Co** en la Fig. II.16). Esto parece indicar que al menos, la aparición de la banda no se corresponde con la formación de un exciplejo entre los grupos amina primaria que permanecen sin funcionalizar y el antraceno.

En el caso del sólido **U-NHAn(10-1)-Co**, material en el que no se observa la aparición del excímero, que sin embargo está funcionalizado en un alto grado con grupos amino, se obtiene la siguiente curva de respuesta *vs.* ATP, que se muestra en la Fig. II.18. En esta figura se puede apreciar cómo la respuesta de **U-NHAn(10-1)-Co** no sigue el patrón esperado, incluso la estructura de la banda del antraceno se ve afectada. Hay que tener en cuenta que en un entorno con una concentración de grupos amino tan elevada hace que la interpretación de los resultados por la posibilidad de la existencia de distintos procesos intermoleculares (transferencias electrónicas, de protón, etc.), sea demasiado compleja. Lo que sí que se puede concluir aquí es que, lejos de mejorar la sensibilidad de la respuesta por la presencia de un mayor número de grupos amino en la superficie del sólido,

³³ a) H. B. Laurent, A. Castellan, J.-P. Desvergne, R. Lapouyade, *Chem. Soc. Rev.*, **2000**, 29, 43; b) H. B. Laurent, A. Castellan, J.-P. Desvergne, R. Lapouyade *Chem. Soc. Rev.*, **2001**, 30, 248.

³⁴ a) Mataga, T. Okada, H. Oohari, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1966**, 2563; b) N. Mataga, K. Ezumi, *Bull. Chem Soc. Jpn.*, **1967**, 1355.

³⁵ J. Gebicki, W. Reimschüssel, *Chem. Phys. Lett.* **1978**, 59, 197.

obtenemos comportamientos complejos. Por tanto, es importante controlar no sólo la cantidad de antraceno para evitar la aparición de excímeros, si no también la cantidad de amina si queremos obtener respuestas ideales del sensor.

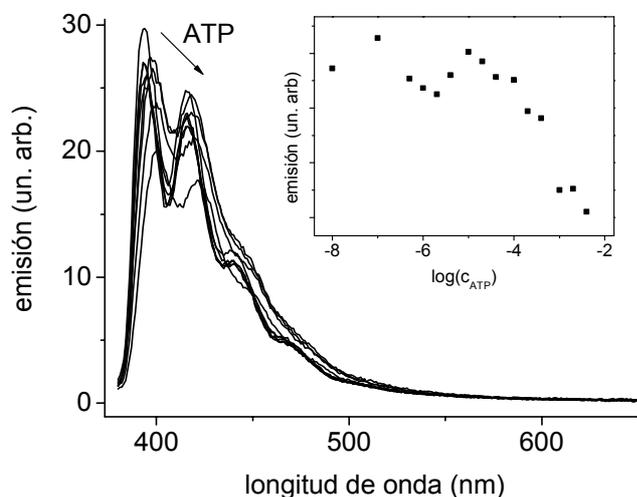


Fig. II.18. Espectros de emisión de U-NHAn(10-1)-Co en agua a pH 2.8 y tras la adición de cantidades crecientes de ATP y la correspondiente curva de calibrado en la que se representa la intensidad de emisión a 415 nm vs. el logaritmo de la concentración de ATP.

En el trabajo de de Silva¹⁸ en el que se describe el anclaje del mismo ligando aminometilantraceno en sílica gel para su aplicación como sensor de pH describen la preparación dos sólidos con cargas diferentes de antraceno, con un 21 y un 95% de grupos aminopropil funcionalizados con el fluoróforo. Se encuentra que en el sólido con una menor carga de antraceno, la respuesta en función del pH es prácticamente instantánea, mientras que en el caso de una elevada funcionalización el tiempo de respuesta supera incluso los 15 minutos. Esto confirma la idea de que sólidos demasiados cargados ofrecen respuestas complejas y que pueden ser función del tiempo por los distintos procesos de equilibrio que se dan en el sólido. En este trabajo además se propone que los sólidos con una elevada carga de fluoróforo puedan ser empleados como sensores de agua, ya que en acetonitrilo existe una emisión tipo excímero o exciplejo, que desaparece rápidamente al añadir agua a la suspensión en acetonitrilo seco, siendo la relación excímero/monómero

muy sensible a la presencia de pequeñas cantidades de H₂O. Este cambio se achaca esta variación a la protonación de los grupos amino en medio acuoso, lo que provoca la repulsión entre los grupos aminometilantraceno, observación que estaría de acuerdo con el modelo propuesto en la Fig. II.15.

Finalmente y con el objetivo de controlar mejor la cantidad de ligando en el sólido y confirmar el “empeoramiento” de la respuesta con sólidos muy cargados, se decide preparar una serie de sólidos funcionalizados con distintas proporciones del ligando **AnTES** –asegurándonos así que todas las aminas presentes en el sólido pertenecen al ligando aminometilantraceno y no hay aminas primarias. En primer lugar se intentó realizar la síntesis mediante cohidrólisis con el fin de que la distribución de los ligandos fuese más controlada y homogénea posible, sin embargo, la baja solubilidad de este reactivo hizo inviable esta ruta de anclaje, ya que precipitaba en la mezcla de reacción incluso a elevadas temperaturas, por tanto se ha de proceder a su anclaje mediante *grafting*.

Calculando las cantidades de ligando con respecto a los moles de sílice total, el **AnTES** se añadió a la mezcla de reacción en las siguientes proporciones: 0.3, 1.0, 2.0 y 4.0 %, y los correspondientes espectros de emisión en acetonitrilo se muestran en la Fig. II.19.

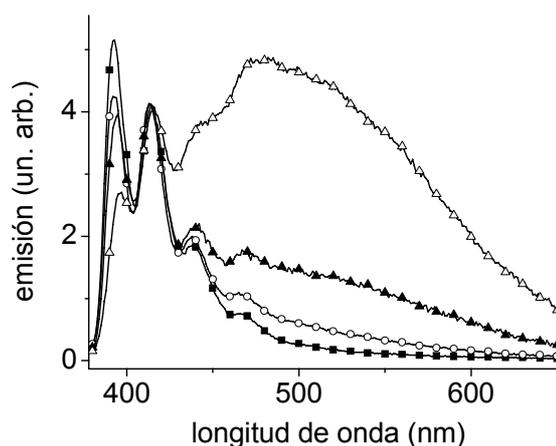


Fig. II.19. Espectros de emisión para una suspensión de 0.2 mg / mL de (■) U-AnTES(0.3)-Gr, (○) U-AnTES(1)-Gr, (▲) U-AnTES(2)-Gr y (Δ) U-AnTES(4)-Gr en acetonitrilo ($\lambda_{exc} = 370$ nm).

Se observa cómo la banda desestructurada que aparece a 500 nm va disminuyendo en intensidad con respecto a la emisión del monómero a medida que disminuye el porcentaje de ligando en el sólido, siendo prácticamente despreciable a concentraciones menores de un 1 %.

Teniendo en cuenta que la distancia necesaria en disolución para la formación del excímero entre un antraceno en el estado fundamental y otro antraceno en el estado excitado ha sido estimada en $8 \pm 2 \text{ \AA}$ (en cloroformo),³⁶ parecen lógicos los valores de distancias intercromofóricas obtenidos para los distintos sólidos en relación con la observación del excímero en acetonitrilo (ver valores estimativos de la Tabla II.1).

Las respuestas de estos sólidos con el anión ATP se muestran en la Fig. II.20, confirmando que en sólidos en los que aparece el excímero en acetonitrilo se obtienen peores respuestas con ATP. Mientras que en sólidos con un menor grado de funcionalización las constantes para la interacción sólido - ATP son del mismo orden que en el caso de **U-NHAn(2-E)-Co**.

En la Tabla II.5 se muestran los valores de los logaritmos de las constantes obtenidos para esta última serie de materiales.

Tabla II.5. Constantes obtenidas para el proceso de reconocimiento de ATP con los distintos materiales **U-AnTES(Z)-Gr**.

| | logK |
|------------------------|-----------------|
| U-AnTES(0.3)-Gr | 4.34 ± 0.02 |
| U-AnTES(1)-Gr | 3.94 ± 0.09 |
| U-AnTES(2)-Gr | 3.2 ± 0.3 |
| U-AnTES(4)-Gr | 3.32 ± 0.13 |

³⁶ T. Kobayashi, S. Nagakura, M. Szwarc, *Chem. Phys.* **1979**, *39*, 105.

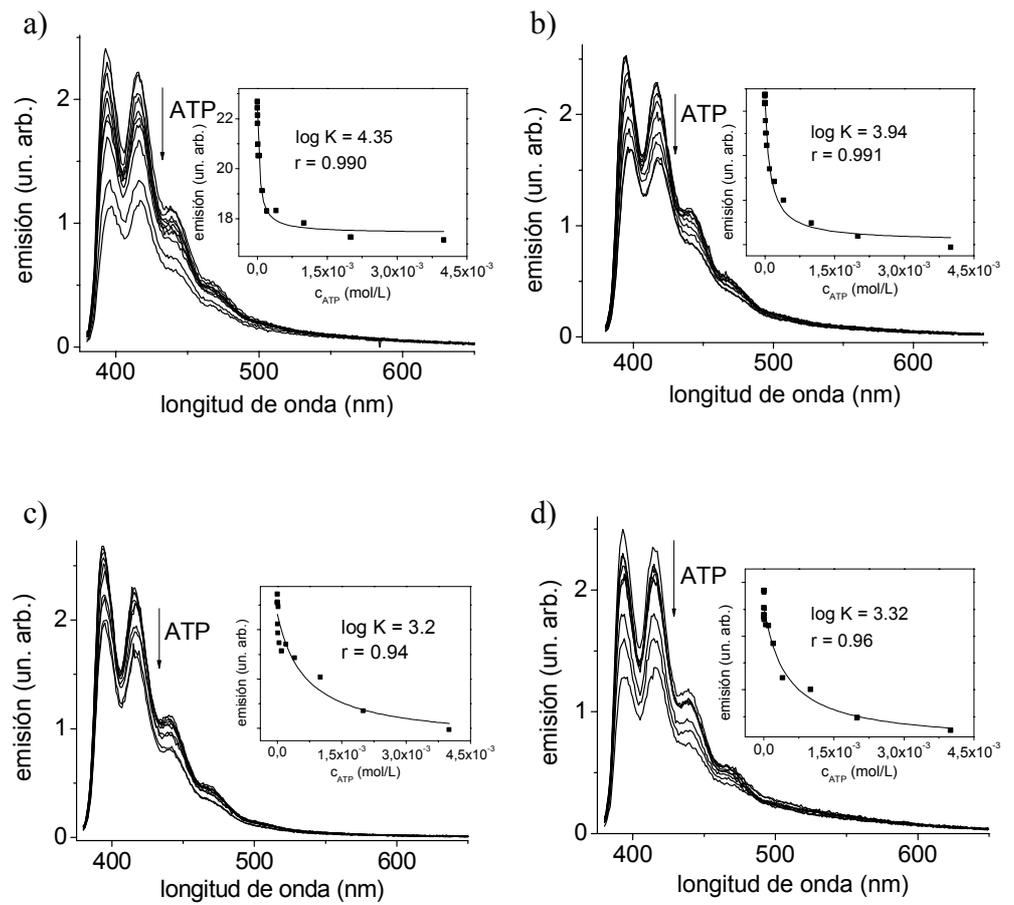


Fig. II.20. Espectros de emisión de a) U-AnTES(0.3)-Gr, b) U-AnTES(1)-Gr, c) U-AnTES(2)-Gr y d) U-AnTES(4)-Gr en agua a pH 2.8 y tras la adición de cantidades crecientes de ATP y el correspondiente ajuste de la curva de calibrado en la que se representa la intensidad de emisión a 415 nm vs. la concentración de ATP.

5.- CONCLUSIONES.

♦ Se han descrito varios procedimientos de síntesis para la obtención de sólidos silíceos funcionalizados con el ligando fluorescente aminometilantraceno.

♦ Se ha estudiado la respuesta de cada uno de estos materiales híbridos frente a una nucleobase de interés bioquímico y analítico como es el ATP, concluyendo que la inmovilización del ligando en los soportes sólidos ha resultado en un aumento de la interacción con el anión, mejorando sensiblemente el límite de detección para ATP en agua. Esto ha sido atribuido a un aumento de las interacciones electrostáticas en el sólido.

♦ Se ha puesto de manifiesto que no por poseer una mayor concentración de ligando por unidad de superficie mejora la respuesta del sistema, sino más bien al contrario. La elevada concentración de fluoróforos/grupos amino en el sólido hace que el comportamiento sea bastante más complejo en comparación a la respuesta obtenida para el mismo ligando en disolución, sólo se obtienen perfiles de respuesta adecuados en el caso de que los cromóforos se encuentren suficientemente separados en el sólido de manera que la interacción intercromofórica se descarte –lo que se puede controlar observando la aparición de excímeros/exciplejos en los materiales funcionalizados en acetonitrilo, indicativos de la “sobrecarga” de los materiales.

En resumen, se ha desarrollado uno de los pocos ejemplos descritos de sistemas híbridos orgánico-inorgánico como sensores moleculares de aniones. Los sistemas descritos son capaces de determinar ATP en disolución acuosa mediante técnicas de fluorescencia, con límites de detección de concentraciones de orden micromolar. Con un ligando de síntesis sencilla se consigue mimetizar respuestas de ligandos más complejos por la inmovilización del receptor en un soporte sólido.

CAPÍTULO III.

7-amino-3H-fenoxazin-3-onas como Sensores Ópticos Modulables para Especies Neutras, Catiónicas y Aniónicas.

A) Síntesis y Estudios en Fase Homogénea.

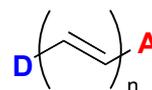
B) Síntesis y Estudios en Fase Heterogénea.

A) SÍNTESIS Y ESTUDIOS EN FASE HOMOGÉNEA

A.1.- INTRODUCCIÓN.

A.1.1.- Sistemas D-A como Sensores Químicos Fluorescentes Moleculares.

Los sistemas que poseen un grupo electrón dador (D) y un grupo electrón aceptor (A) conectados a través de un sistema electrónico π se caracterizan generalmente porque tras la excitación electrónica tiene lugar una transferencia interna de carga ((*Internal*) *Charge Transfer*, CT a partir de aquí) del grupo D al A. La capacidad electrón dadora o electrón aceptora de los grupos D y A, respectivamente, determina la longitud de onda de absorción. Si ésta es suficientemente elevada, la absorción puede tener lugar incluso en la región del infrarrojo cercano.



Como resultado de la transferencia de carga, el momento dipolar del estado excitado es diferente al del estado fundamental, por lo que estos compuestos generalmente se caracterizan por poseer un marcado solvatochromismo (ver apartado A.1.2) y son empleados como sondas de polaridad del microambiente. Al igual que por los disolventes, esta banda de transferencia de carga puede verse alterada también por la interacción con iones, por lo que son compuestos frecuentemente empleados como cromóforos en sensores ópticos para iones.

Este tipo de sensores basados en el control iónico de la transferencia de carga fotoinducida se caracterizan porque la subunidad coordinante y emisora están directamente conjugados y comparten ciertos átomos críticos. La coordinación del ion afecta a la posición de las bandas de absorción y emisión así como a la intensidad de fluorescencia. En este tipo de fluoróforos intrínsecos, la mayoría de receptores contienen un átomo de nitrógeno que es el que actúa de “puente integrador” en la estructura π del fluoróforo. Este nitrógeno suele ser suficientemente rico electrónicamente para que pueda tener lugar un proceso de CT.¹

¹ B. Valeur, I. Leray, *Coord. Chem. Rev.*, **2000**, 205, 3.

En la Fig. III.A.1 se muestra el efecto de la coordinación de un catión con un compuesto típico de CT. En función de si la coordinación tiene lugar a través del grupo dador o del aceptor, se observan distintos desplazamientos de la banda de absorción.

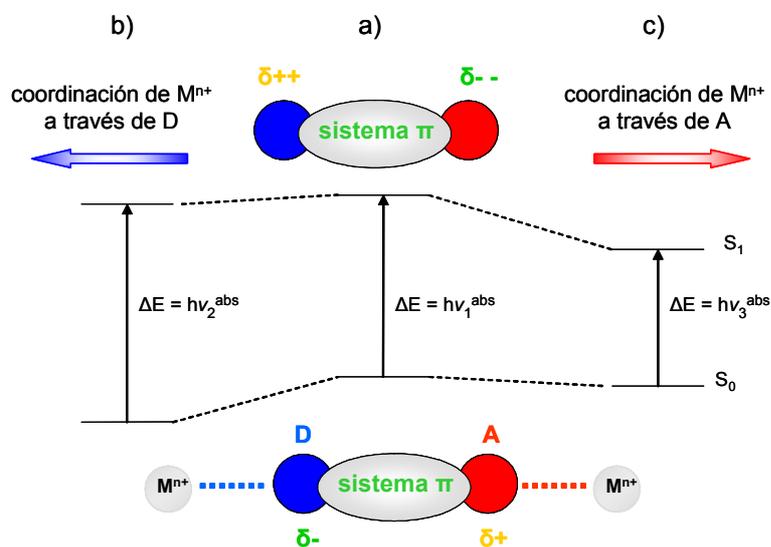


Fig. III.A.1. a) Representación del proceso de transferencia interna de carga fotoinducida para un sistema D-A y de la variación de los niveles energéticos para el estado fundamental (S_0) y primer estado excitado singlete (S_1) tras la coordinación de un catión metálico a través de el grupo dador del cromóforo b) con el consecuente desplazamiento hipsocrómico y c) a través del grupo aceptor, con la consecuente disminución de la energía de la transición por la mayor estabilización del estado excitado con respecto al fundamental.

Se observa un

- desplazamiento hipsocrómico (hacia el azul) si la coordinación del catión tiene lugar a través de D por la menor estabilización del estado excitado con respecto al fundamental,

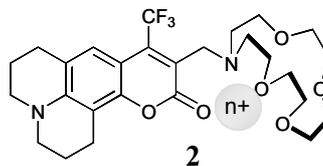
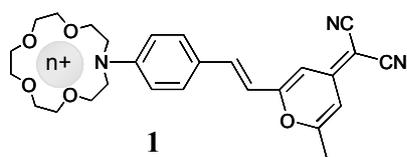
- desplazamiento batocrómico (hacia el rojo) cuando el catión coordina a través de A, ya que la coordinación de una especie catiónica a través este grupo favorece la CT al aumentar el carácter electrón aceptor de A.

De manera que podemos ejercer un control iónico del proceso fotoinducido de CT.

Como ya se ha comentado en el Capítulo I, este tipo de sistemas conjugados presentan varias ventajas sobre los sistemas ET (desacoplados electrónicamente), como una menor influencia del pH en la respuesta del cromóforo o la inducción de desplazamientos batocrómicos o hipsocrómicos por la coordinación del ion con el consecuente cambio de color, ofreciendo así una información múltiple (longitudes de onda de absorción y emisión, intensidad de fluorescencia, etc). Esto último posibilita la realización de medidas ratiométricas, ya que la relación de intensidades a dos longitudes de onda apropiadas de excitación o de emisión proporciona una medida de la concentración del ion que es independiente de la concentración de la sonda fluorescente e insensible a la intensidad de luz incidente.

La introducción de receptores a través de D o A posibilita o mejora la coordinación de las especies de interés. Los ejemplos más frecuentes consisten en la introducción de un macrociclo a través del nitrógeno que actúa como D en el proceso de CT (ver ejemplo **1**²), de manera que la coordinación de un catión metálico induce desplazamientos hipsocrómicos de las bandas de absorción y emisión y una disminución en el coeficiente de absorción molar, tal y como se muestra en la Tabla III.A.1.

La introducción de un receptor a través del grupo A, ejemplo **2**,³ es menos común. La coordinación del catión en este ejemplo causa un desplazamiento hacia mayores longitudes de onda y un efecto hiperocrómico (ver Tabla III.A.1).



² J. Bourson, B. Valeur, *J. Phys. Chem.*, **1989**, 93, 3871.

³ J. Bourson, J. Pouget, B. Valeur, *J. Phys. Chem.*, **1993**, 97, 4552.

Tabla III.A.1. Datos espectroscópicos para los cromóforos **1** y **2** y tras la coordinación de Ca^{2+} en acetonitrilo (de las referencias 2 y 3).

| | λ_{abs} (nm) | $\epsilon \times 10^{-3}$ ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) | λ_{em} (nm) | Φ_{f} |
|--------------------------|--------------------------------|--|-------------------------------|-------------------|
| 1 | 464 | 49.3 | 621 | 0.73 |
| 1-Ca²⁺ | 398 | 37.5 | 608 | 0.27 |
| 2 | 426 | 20.3 | 578 | 0.15 |
| 2-Ca²⁺ | 467 | 23.3 | 598 | 0.12 ^a |

^a El rendimiento cuántico es menor probablemente porque el catión proporciona vías alternativas para la desactivación no radiativa.

Las sondas D-A que presentan un elevado carácter de CT se caracterizan por poseer una mayor separación de carga en el estado excitado, por lo que se suelen observar **elevados desplazamientos de Stokes que aumentan con la polaridad del disolvente** como consecuencia de la mayor estabilización del estado excitado, más polar, con respecto al estado fundamental en disolventes polares. Esto es una ventaja, ya que se minimiza la reabsorción de la luz emitida por el propio fluoróforo (por ejemplo, en el caso del compuesto **1** en acetonitrilo el desplazamiento de Stokes es superior a 5000 cm^{-1}). Otra característica de las bandas de CT es que son **bandas anchas y desestructuradas**.

En la mayoría de los casos, el estado excitado Frank-Condon (FC a partir de aquí) ya posee un mayor momento dipolar que el estado fundamental. Dependiendo de la constitución química de la molécula fluorescente este estado inicial poblado puede sufrir un siguiente paso de separación de carga en el estado excitado, que frecuentemente está conectado con movimientos particulares con el fin de estabilizar una estructura ion-radical. De acuerdo con esto, el momento dipolar de dicho estado excitado CT se ve todavía más incrementado en comparación con el estado excitado inicial. Los prerrequisitos estructurales para este comportamiento en el estado excitado es la existencia de enlaces sencillos flexibles entre D y A. Dependiendo de la naturaleza del cromóforo, estos estados CT pueden ser emisivos o no. Así por ejemplo en algunas moléculas se propone que la desactivación del

estado excitado tiene lugar a través de un intermedio en el que el grupo dador sufre un giro de 90° tras la excitación electrónica de manera que D y A se encuentran en una disposición ortogonal con una elevada separación de cargas. Las moléculas capaces de dar una “transferencia interna de carga con giro”, que es la traducción literal del inglés para *Twisted Intramolecular Charge Transfer* (TICT)⁴ tras la excitación electrónica, forman inicialmente un estado moderadamente polar con una geometría similar a la del estado fundamental. Desde este estado “no polar” tiene lugar la transferencia intramolecular de un electrón desde el grupo electrón dador de la molécula (normalmente un grupo dialquilamino) al grupo aceptor que está acompañada de un giro sobre el enlace que une D y A, de manera que las subunidades D y A permanecen orientadas perpendicularmente entre sí.

A.1.2.- Solvatocromismo.

El término solvatocromismo se emplea para describir los cambios que se producen en la posición y a veces forma e intensidad de las bandas de absorción en el UV/Visible de muchas moléculas orgánicas polares conjugadas como consecuencia de un cambio de polaridad del medio.⁵

La mayoría de cromóforos orgánicos asimétricos se caracterizan por poseer una distribución de carga diferente en el estado fundamental (S_0) y el primer estado excitado singlete (S_1), que resulta en diferentes momentos dipolares para ambos estados (μ_0 y μ_1 para el estado fundamental y el excitado, respectivamente). En tal caso, ambos estados implicados en la transición no están estabilizados de la misma manera en un disolvente de una polaridad dada (por interacciones dipolo-dipolo entre el soluto y el disolvente). De aquí la dependencia en la posición de las bandas de absorción (la banda de menor energía) y fluorescencia.

Si al aumentar la polaridad, el estado fundamental de la molécula está más estabilizado por la solvatación que el estado excitado, como resultado se observa un solvatocromismo negativo y viceversa. En este contexto, el “primer estado excitado” se refiere al estado excitado FC, con el mismo patrón de solvatación que el que presenta el estado fundamental. En la Fig. III.A.2 se muestra un ejemplo para cada caso.

⁴ W. Rettig, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **1986**, 25, 971.

⁵ C. Reichardt, *Chem. Rev.*, **1994**, 94, 2358.

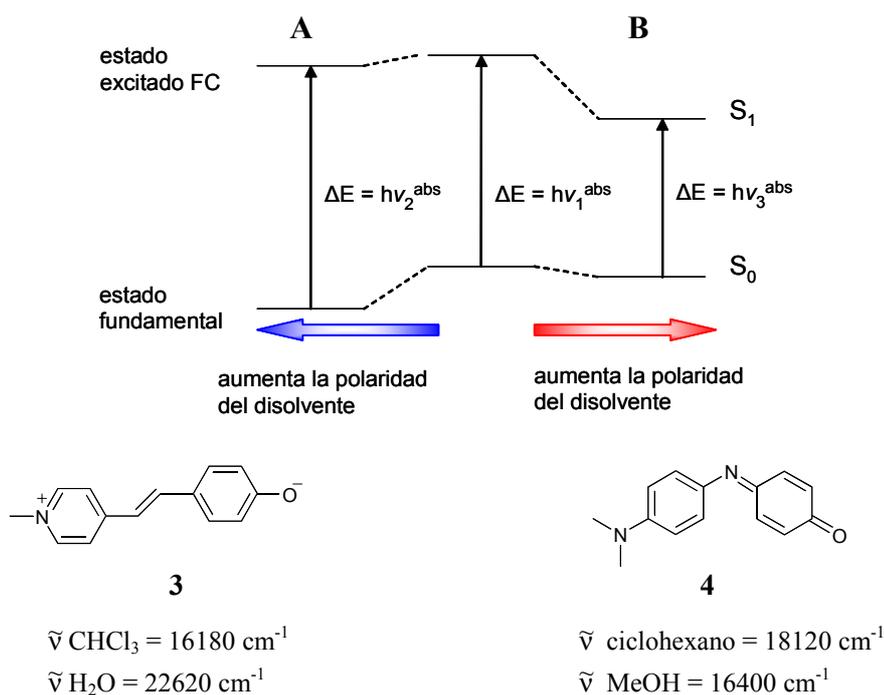


Fig. III.A.2. Influencia de la polaridad del disolvente en los orbitales HOMO y LUMO para un compuesto que presenta A) **solvatocromismo negativo** ($\mu_1 < \mu_0$), con el compuesto **3** (merocianina de Brooker) como ejemplo, con el número de onda del máximo de la banda de absorción en disolventes de diferente polaridad indicado⁶ y B) **solvatocromismo positivo** ($\mu_1 > \mu_0$) con el compuesto **4** (azul de fenol) como ejemplo, con los números de onda de absorción también indicados para dos disolventes de diferente polaridad.⁷

El solvatocromismo observado depende de la estructura química y de las propiedades físicas del cromóforo y de las moléculas de disolvente. En general, las moléculas de colorante con un gran cambio en su momento dipolar permanente tras la excitación electrónica muestran un fuerte solvatocromismo. Si el momento dipolar del soluto aumenta durante la transición electrónica ($\mu_1 > \mu_0$), se observa un solvatocromismo positivo y viceversa. Además del cambio del momento dipolar tras la excitación, la capacidad dadora/aceptora de enlace de hidrógeno con

⁶ H. G. Benson, J. N. Murrell, *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 2*, **1972**, 68, 137.

⁷ P. W. Vittum, G. H. Brown, *J. Am. Chem. Soc.*, **1946**, 68, 2235.

respecto a las moléculas de disolvente en su estado excitado FC también es determinante de la extensión y el signo del solvatocromismo.

Escalas Empíricas de Polaridad. Las interacciones soluto/disolvente son bastante complejas y difíciles de determinar cuantitativamente ya que la extensión de la diferente solvatación depende de las fuerzas intermoleculares entre el soluto y las moléculas de disolvente que lo rodean. Estas fuerzas intermoleculares incluyen fuerzas no específicas como las puramente electrostáticas que surgen de las fuerzas de Coulomb entre iones cargados y moléculas dipolares y fuerzas de polarización, que surgen de los momentos dipolares inducidos en las moléculas, así como fuerzas específicas como el enlace de hidrógeno. Así, generalmente, la polaridad de un disolvente no puede ser medida por un solo parámetro como la constante dieléctrica (ϵ) o el momento dipolar (μ) ya que estos parámetros son una medida macroscópica del sistema que evalúan la media de los efectos. Sin embargo, las interacciones soluto/disolvente tienen lugar a un nivel microscópico en un discontinuo estructurado que consiste en moléculas de disolvente individuales. Desde un punto de vista más práctico es conveniente definir la polaridad del disolvente como la capacidad global de solvatación de los disolventes, que depende de la acción de todas las interacciones intermoleculares posibles, excluyendo las interacciones que lleven a alteraciones químicas finales del soluto (protonación, oxidación, reducción, formación de complejos, etc.). Como la polaridad del disolvente así definida no puede ser descrita cuantitativamente por parámetros físicos individuales como la constante dieléctrica o el momento dipolar, se han introducido parámetros empíricos de la polaridad de los disolventes, mediante el empleo de escalas empíricas que se desarrollan empleando diversos colorantes solvatocromicos. Una buena sonda de polaridad es aquella que responde linealmente a la perturbación del disolvente. Así por ejemplo la escala $E_T(30)$, da una indicación de ambos, la dipolaridad y el enlace de hidrógeno (ver a continuación), o la escala π^* de Kamlet-Taft⁸, mide la polaridad/polarizabilidad del disolvente, pero no incluye las interacciones por enlace de hidrógeno, ya que se basa en el empleo de colorantes que sólo son sensibles al momento dipolar-polarizabilidad del disolvente.

La mayoría de las escalas están basadas en los datos espectroscópicos de una única sonda, de manera que la correlación obtenida tiene en cuenta las interacciones soluto-disolvente para ese colorante en concreto, por tanto, si otro

⁸ a) M. J. Kamlet, R. W. Taft, *J. Am. Chem. Soc.*, **1976**, 98, 377; b) M. J. Kamlet, J.-L.-Abboud, R. W. Taft, *J. Am. Chem. Soc.*, **1977**, 99, 6027.

colorante se ajusta a esta escala lo que se puede deducir es que presenta una estructura similar a la sonda que resulta en interacciones del mismo tipo con el disolvente.

La escala $E_T(30)$, una de las más conocidas, se ha establecido mediante el empleo de la betaina de Reichardt,⁵ colorante que muestra un desplazamiento solvatocrómico inusualmente grande (de 9730 cm^{-1} al pasar de difeniléter a agua, cubriendo prácticamente todo el espectro del visible, $\tilde{\nu}$ difeniléter = 12350 cm^{-1} = 810 nm y $\tilde{\nu}_{\text{H}_2\text{O}}$ = 22080 cm^{-1} = 450 nm). Es un solvatocromismo negativo ya que la banda de absorción de CT intramolecular que presenta se desplaza hipsocrómicamente al aumentar la polaridad del disolvente, debido a la menor estabilización del estado excitado FC, que posee un momento dipolar menor que el estado fundamental (altamente zwitteriónico) en disolventes más polares. Al poseer un átomo de oxígeno fenólico, que puede interactuar con disolventes dadores de enlace de hidrógeno, también es sensible a disolventes próticos.

En el caso de los espectros de fluorescencia también se puede observar el efecto solvatocrómico. Como el tiempo que se requiere para que una molécula en el estado fundamental sea electrónicamente excitada (10^{-15} s) es mucho más corto que el requerido para que tengan lugar rotaciones o vibraciones de las moléculas ($10^{-12} - 10^{-10}\text{ s}$), el núcleo de la entidad absorbente (cromóforo + celda de solvatación) no alteran apreciablemente sus posiciones durante una transición electrónica (principio de Franck-Condon). Por tanto, el primer estado excitado de una molécula en disolución presenta el mismo patrón de solvatación que el correspondiente estado fundamental, y se denomina estado excitado Franck-Condon, mientras que el estado fundamental corresponde a un estado fundamental en equilibrio. Si el tiempo de vida de la molécula excitada es suficientemente largo, tiene lugar la reorientación de las moléculas, de acuerdo con la nueva situación, resultando en un estado excitado relajado en equilibrio con la celda de disolvente. Desde este estado excitado en equilibrio es desde donde puede tener lugar la emisión de fluorescencia. Por analogía, hay un estado fundamental Frank-Condon tras la emisión con el patrón de solvatación del estado excitado en equilibrio, que persiste brevemente hasta que las moléculas de disolvente se reorganizan al estado de equilibrio del estado fundamental (ver Fig. III.A.3).

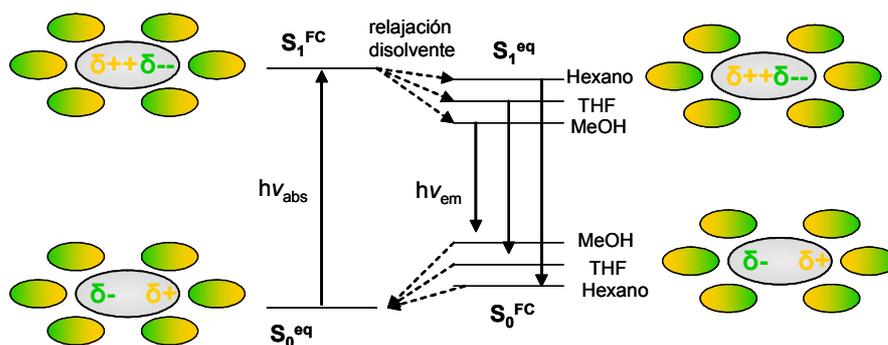


Fig. III.A.3. Ejemplo ilustrativo en el que se muestra los niveles energéticos en distintos disolventes tras la excitación electrónica para una molécula con $\mu_1 > \mu_0$.

La diferente solvatación de estos dos estados es la responsable de de la influencia del disolvente en el espectro de emisión.

El análisis de la dependencia de las propiedades espectroscópicas de absorción y emisión en el visible con la polaridad del disolvente de cromóforos D-A conjugados ofrece información de la polaridad del disolvente o a la inversa, puede ser utilizada para obtener información de las propiedades del soluto. Este análisis generalmente se basa en una situación que describe al disolvente como un medio continuo que reacciona a la presencia de un soluto polar generando un campo eléctrico proporcional al momento dipolar del soluto.

El análisis del comportamiento solvatocrómico permite por tanto obtener información sobre la naturaleza de las especies absorbentes y emisoras en cierto grado. Para describir las propiedades fotofísicas de los colorantes aquí empleados vamos a determinar las longitudes/números de onda de absorción y emisión y los desplazamientos de Stokes ($\Delta\tilde{\nu}$).

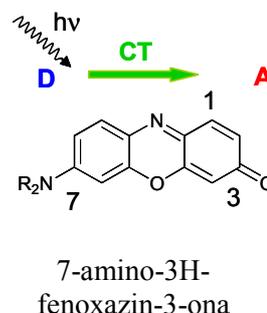
Además del comportamiento solvatocrómico de los fluoróforos, el análisis *solvatocinético*⁹ (determinación de las constantes radiativas y no radiativa k_r y k_{nr} , respectivamente, a partir de los rendimientos cuánticos de fluorescencia (Φ_f) y

⁹ El comportamiento solvatocinético de un compuesto fluorescente hace referencia a la dependencia de la constante no radiativa k_{nr} con la polaridad del disolvente, a) E. M. Kosower, *Acc. Chem. Res.*, **1982**, *15*, 259; b) W. Rettig, *Top. Curr. Chem.*, **1994**, *169*, 253.

tiempos de vida de fluorescencia (τ_f) ayudará a obtener información sobre la importancia de los procesos de desactivación desde el estado excitado mediante procesos emisivos o no emisivos.

A.1.3.- Derivados de 7-amino-3H-fenoxazin-3-ona.

Las 7-aminofenoxazinonas son una familia de colorantes que se caracterizan por poseer una subunidad electrón dadora (NR_2) en la posición 7 del anillo y otra electrón aceptora ($\text{C}=\text{O}$) en la posición 3 conjugadas a través del sistema electrónico π . Estas características estructurales hacen que sea posible la existencia de un proceso CT fotoinducido del grupo D al A, lo que resulta en un aumento del momento dipolar y por tanto, en un marcado efecto solvatocrómico y un desplazamiento de Stokes importante.



Así por ejemplo, Otsuki y colaboradores proponen (en uno de los pocos trabajos publicados sobre este sistema) que el estado FC tiene un carácter parcial de CT.¹⁰ Estos autores observan un desplazamiento significativo al rojo, tanto del espectro de absorción como del de emisión al aumentar la polaridad del disolvente, mostrando el número de onda del máximo de absorción una relación lineal con la polaridad/polarizabilidad del disolvente π^* para disolventes apróticos. La mayor sensibilidad a la escala π^* para los disolventes apróticos sugiere que el colorante está interaccionando con el disolvente mediante enlaces de hidrógeno, con el grupo carbonilo actuando como protón aceptor. En este trabajo se observa además que la k_{nr} disminuye con la polaridad del disolvente para disolvente apróticos y también disminuye en mezclas dioxano agua al ir aumentando la concentración del agua hasta un determinado valor, a partir del cual la k_{nr} aumenta abruptamente. Sugieren que la disminución de la fluorescencia en la zona de disolventes más apolares es debida al cruzamiento entre sistemas, por analogía a otros compuestos (por ejemplo la acridina¹¹) en los que se ha observado que la energía de activación para el cruzamiento entre sistemas aumenta con la polaridad del disolvente. Mientras

¹⁰ S. Otsuki, T. Taguchi, *J. Photochem. Photobiol. A*, **1997**, *104*, 189.

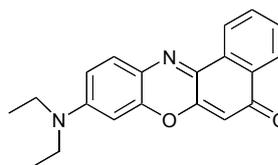
¹¹ O. Ito, Y. Yoshikawa, A. Watanabe, H. Kokubun, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, **1996**, *92*, 227.

que en la región de alta polaridad (mezclas dioxano:agua) en la que k_{nr} aumenta, proponen como proceso no radiativo una transferencia electrónica desde el estado excitado CT del cromóforo al disolvente. Parece ser que las interacciones mediante enlace de hidrógeno con las moléculas de disolvente son la mayor contribución a los procesos no radiativos.

En otro trabajo, se describe el empleo de estos derivados para el estudio de entornos hidrófobos como micelas o proteínas lipofílicas.¹² Los estudios solvatocrómicos revelan que la disminución de la polaridad al aumentar el contenido de hexano en mezclas con acetona produce un desplazamiento al azul, tanto en el espectro de emisión como en el de excitación, así como una disminución en la intensidad de fluorescencia. Los decaimientos del tiempo de vida de fluorescencia generalmente aumentan al aumentar la polaridad del disolvente. En este caso también se observa una disminución de la intensidad de fluorescencia en disolventes próticos, que es todavía más acusado en presencia de HCl por la protonación del grupo carbonilo.

A.1.4.- Derivados Análogos de 7-amino-3H-fenoxazin-3-ona.

Rojo nilo. El rojo nilo posee una estructura muy similar a las 7-amino-3H-fenoxazin-3-onas descritas anteriormente, con un grupo dietilamino como electrón dador y un C=O como aceptor conjugados a través del sistema electrónico π . Este derivado es el más conocido de esta familia de colorantes. Es un colorante solvatocrómico neutro altamente fluorescente y ha sido



Rojo nilo

ampliamente utilizado para examinar la estructura, dinámica y entorno en sistemas biológicos y microheterogéneos, como zeolitas,¹³ proteínas,¹⁴ líquidos iónicos,¹⁵ ORMOSILS,¹⁶ Langmuir-Blodgett films,¹⁷ o cristales líquidos.¹⁸ También ha sido

¹² T. A. Brugel, B. W. Williams, *J. Fluoresc.*, **1993**, 3, 69.

¹³ a) N. Sarkar, K. Das, D. Narayan Nath, K. Bhattacharyya, *Langmuir*, **1994**, 16, 326; b) J. L. Meinershagen, T. Bein, *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, 121, 448; c) S. Uppili, K. J. Thomas, E. M. Crompton, V. Ramamurthy, *Langmuir*, **2000**, 16, 265.

¹⁴ a) D. L. Sackett, J. Wolff, *Anal. Biochem.*, **1987**, 167, 228; b) D. L. Sackett, J. R. Knutson, J. Wolf, *J. Biol. Chem.*, **1990**, 265, 14899.

¹⁵ A. J. Carmichael, K. R. Seddon, *J. Phys. Org. Chem.*, **2000**, 13, 591.

¹⁶ E. M. Moreno, D. Levy, *Chem. Mater.*, **2000**, 12, 2334.

utilizado para estudiar la polaridad de membranas¹⁹ y micelas,^{19a,20} para el seguimiento del proceso sol-gel,²¹ y de la formación de ensamblajes supramoleculares²². Incluso se ha empleado para establecer una escala de polaridad a partir de la cual es posible interpolar la constante dieléctrica de varios ésteres.²³ Su extendido uso es debido a sus propiedades fotofísicas ventajosas, como elevadas λ_{abs} y λ_{em} , elevados Φ_f y coeficientes de absorción molar importantes, y además es un colorante fotoquímicamente estable (de hecho se ha descrito su uso como colorante para láseres²⁴).

A pesar de que este colorante ha sido ampliamente utilizado como sonda molecular fluorescente y se ha intentado elucidar el mecanismo de desactivación de fluorescencia y sus propiedades solvatocrómicas, existe una gran controversia en la literatura a cerca del mismo. Algunos autores atribuyen la disminución de la fluorescencia y del tiempo de vida al ir aumentando la polaridad del entorno a un mecanismo de TICT.

Así por ejemplo, Sarkar y colaboradores^{13a} atribuyen el proceso principal no radiativo a un proceso de TICT, que aumenta exponencialmente con el aumento de la polaridad del medio. Al poseer el grupo electrón dador y el grupo electrón aceptor conectados mediante un enlace sencillo es posible la rotación, por lo que proponen este mecanismo como el proceso no radiativo principal para el fluoróforo. Observan un desplazamiento batocrómico del máximo de la banda de emisión al aumentar la polaridad del disolvente (de 580 nm en dioxano a 685 nm en agua), lo que indica que el rojo nilo es más polar en el estado excitado que en el fundamental. Además observan que el rendimiento cuántico y el tiempo de vida descienden drásticamente con el aumento de la polaridad en mezclas dioxano:agua

¹⁷ A. K. Dutta, K. Kamada, K. Ohta, *Chem. Phys. Lett.*, **1996**, 258, 369.

¹⁸ M. Choi, D. Jin, H. Kim, T. J. Kang, S. C. Jeoung, D. Kim, *J. Phys. Chem. B*, **1997**, 101, 8092.

¹⁹ a) M. M. Krishna, *J. Phys. Chem. A*, **1999**, 103, 3589; b) I. G. Krishnamoorthy, *J. Phys. Chem. B*, **2001**, 105, 1484.

²⁰ A. Datta, D. Mandal, S. Kumar Pal, K. Battacharyya, *J. Phys. Chem. B*, **1997**, 101, 10221.

²¹ a) K. Matsui, K. Nozawa, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1997**, 70, 2331; b) G. Hungerford, J. A. Ferreira, *J. Lumin.*, **2001**, 93, 155.

²² a) D. M. Watkins, Y. Sayed-Sweet, J. W. Klimash, N. J. Turro, D. A. Tomalia, *Langmuir*, **1997**, 13, 3136.

²³ M. S. Uusi-Penttilä, R. J. Richards, B. A. Togerson, K. A. Berglund, *Ind. Eng. Chem. Res.*, **1997**, 36, 510.

²⁴ D. Basting, D. Ouw, F. P. Schaefer, *Opt. Commun.*, **1976**, 18, 260.

y en una serie de alcoholes. La gran disminución del Φ_f se corresponde con un aumento considerable de los procesos no radiativos (aumento de k_{nr}), lo que atribuyen a un proceso de TICT, ya que éste muestra una gran dependencia con la polaridad del entorno y su barrera de activación disminuye linealmente con el aumento del parámetro de polaridad $E_T(30)$,²⁵ por lo que TICT aumenta marcadamente con la polaridad del medio (achacan la desactivación de la fluorescencia a que el TICT es no radiativo por una transferencia rápida a un estado triplete).

Sin embargo, y al igual que otros autores que también proponen TICT,^{17,26} no tienen en cuenta que para aumentar la polaridad del disolvente están aumentando la capacidad dadora de enlace de hidrógeno del mismo, lo que puede ser la causa más probable para la disminución que observan en la intensidad de fluorescencia (por ejemplo, se ha mostrado que el enlace de hidrógeno en el estado excitado es el responsable de la desactivación no radiativa eficaz para antraquinonas y fluorenonas²⁷ y para el marcado desplazamiento batocrómico en disolventes próticos).

En un trabajo más reciente²⁸ se realiza un estudio sobre la importancia del enlace de hidrógeno en el solvatocromismo y los procesos no radiativos para el rojo nilo. Los autores afirman que el tiempo de vida del fluoróforo no es sensible a interacciones dieléctricas disolvente-soluto, pero disminuye significativamente cuando aumenta la capacidad dadora de enlace de hidrógeno en alcoholes. Esto es debido a que las vibraciones asociadas con el enlace de hidrógeno a través del carbonilo contribuyen al proceso de desactivación. Además afirman que el efecto de la viscosidad del disolvente es despreciable, lo que indica que el giro de la subunidad dimetilamino no juega ningún papel relevante en la disipación de la energía de excitación. La fuerza del enlace de hidrógeno de alcoholes y la densidad electrónica alrededor del oxígeno del grupo carbonilo controlan el proceso de desactivación de la fluorescencia inducida por el enlace de hidrógeno.^{27a} Representando el tiempo de vida en función de la escala $E_T(30)$ observan que los alcoholes forman un grupo enteramente distinto (es en los únicos en los que va

²⁵ J. M. Hicks, M. Vandersall, Z. Babarogic, K. B. Eisenthal, *Chem. Phys. Lett.*, **1985**, 116, 18.

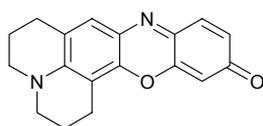
²⁶ N. Ghoneim, *Spectrochim. Acta A*, **2000**, 56, 1003.

²⁷ a) S. Biczók, T. Bérces, H. Inoue, *J. Phys. Chem. A*, **1999**, 103, 3837; b) A. Morimoto, T. Yatsuhashi, T. Shimada, L. Biczók, D. A. Tryk, H. Inoue, *J. Phys. Chem. A*, **2001**, 105, 10488.

²⁸ A. Cser, K. Nagy, L. Biczók, *Chem. Phys. Lett.*, **2002**, 360, 473.

disminuyendo, mientras que en los disolventes apróticos permanece prácticamente constante). Además, el rendimiento cuántico de fluorescencia aumenta en un factor de 1.50 y 1.25 en CH₃OD y CH₃CH₂OD, respectivamente, con respecto a los mismos disolventes no deuterados. El efecto isotópico indica que el enlace de hidrógeno proporciona un modo efectivo de disipación de la energía. La desactivación ocurre vía vibraciones asociadas con enlace de hidrógeno, por lo que, el reforzamiento del mismo en disolventes no deuterados conduce a un mayor grado de desactivación no radiativa.

Por otro lado, cálculos ab initio y semiempíricos muestran que el rojo nilo es plano en el estado fundamental con una gran barrera de activación para la rotación del grupo dietilamino y que la CT en el estado excitado es más intensa en la conformación plana.²⁹ El efecto solvatocrómico se explica en base a los momentos dipolares calculados para el primer estado excitado. Calculan que en el estado excitado, la estructura girada es 0.605 eV menos estable que la plana. Por lo que descartan también TICT.



FenxJulo

Sin embargo, en ninguno de estos trabajos se han estudiado modelos apropiados para descartar el proceso de TICT, como puede ser la introducción de un grupo amino en la posición 7 conectado a través de puentes metileno al anillo de fenoxazinona (ver **FenxJulo**). De esta manera, se inhibe el giro alrededor del enlace sencillo que conecta al grupo D con el núcleo de fenoxazinona.

Además, muchos de estos trabajos no tienen en cuenta la naturaleza polimetínica de dichos cromóforos, que pueden implicar características enteramente diferentes bien conocidas de la fotoquímica de indoanilinas.

Azul de fenol. El azul de fenol es un colorante indoanilínico que posee un grupo dilaquilamino (NR₂) como D, conjugado a un grupo electrón aceptor, C=O, a través del sistema aromático π del cromóforo, al igual que el rojo nilo y las 7-aminofenoxazinonas. Sin embargo, en este caso no existe el puente de oxígeno que impone una rigidez estructural a los compuestos anteriores, por lo que los derivados del azul de fenol no son fluorescentes, al poseer un mayor grado de libertad de movimiento.

²⁹ L. C. Dias Jr., R. Custodio, F. B. T. Pessine, *Chem. Phys. Lett.*, **1999**, 302, 505.

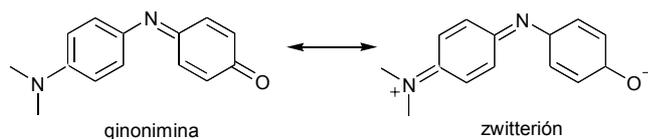


Fig. III.A.4. Equilibrio quinonimina–zwitterión en colorantes indoanilínicos.

Es un colorante que presenta un solvatocromismo positivo (como se ha mostrado en la Fig. III.A.2 $\lambda_{\text{abs}} = 552 \text{ nm}$ en ciclohexano y 610 nm en metanol con un aumento del coeficiente de absorción molar de 15800 a $23500 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, respectivamente⁷), esto lo atribuyen a la existencia de las estructuras resonantes anteriores (Fig. III.A.4), con una mayor estabilización de la estructura zwitteriónica en disolventes polares.³⁰

La posibilidad de que pueda existir como quinonimina o zwitterión ha sido evaluada por Morley y Fitton.³¹ Estos autores llegan a la conclusión, mediante estudios de ^1H y ^{13}C RMN en varios disolventes, próticos y no próticos, así como cálculos teóricos, de que en cualquier disolvente esta indoanilina existe puramente en forma quinoimínica (aunque otros autores³² proponen que en disolventes polares predomina el zwitterión). Atribuyen el desplazamiento batocrómico en disolventes apróticos a que disolventes con constantes dieléctricas elevadas ejercen una influencia estabilizadora mucho mayor en el estado excitado más polar de lo que lo hacen para el estado fundamental. Proponen que el desplazamiento solvatocrómico puede representarse por dos efectos diferentes. El primero se origina por la interacción entre la molécula y el campo dieléctrico del disolvente, mientras que el segundo se origina por interacciones específicas de enlace de hidrógeno entre el disolvente y el par electrónico solitario del oxígeno exocíclico. Siendo el efecto de la interacción del azul de fenol con los grupos OH de disolventes próticos mayor que el efecto del cambio de la polaridad intrínseca.³³

En el caso del azul de fenol se ha descrito su uso como sensor químico molecular para la determinación de iones. Por ejemplo, la incorporación del mismo en la estructura de un calixareno permite el reconocimiento selectivo del ion Ca^{2+}

³⁰ L. G. S. Brooker, R. H. Sprague, *J. Am. Chem. Soc.*, **1941**, *63*, 3214.

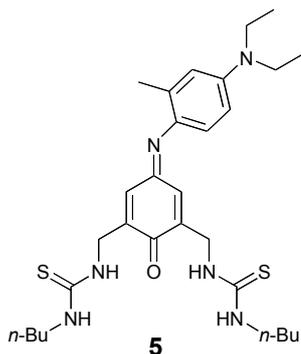
³¹ J. O. Morley, A. L. Fitton, *J. Phys. Chem. A*, **1999**, *103*, 11442.

³² A. Serrano, S. Canuto, *Int. J. Quantum Chem.*, **1998**, *70*, 745.

³³ J. Figueras, *J. Am. Chem. Soc.*, **1971**, *93*, 3255.

en etanol por el desplazamiento batocrómico de la banda de absorción que se produce como consecuencia de la coordinación del catión metálico a través del grupo carbonilo del colorante.³⁴ Además del desplazamiento batocrómico –que confirma la coordinación del catión a través del grupo electrón aceptor del cromóforo–, la disminución del valor de la frecuencia de vibración en el IR del grupo C=O del azul de fenol indica un mayor carácter enólico de este grupo como consecuencia de la coordinación del catión, lo que favorece un mayor peso de la estructura resonante zwitteriónica.

Otro ejemplo es su empleo para el reconocimiento de aniones tetraédricos como HSO_4^- y H_2PO_4^- .³⁵



El sensor colorimétrico **5** muestra un desplazamiento batocrómico de la banda de absorción en el visible con respecto al compuesto control –sin los sustituyentes tiourea en las posiciones orto- al C=O de la indoanilina– de 607, compuesto control, a 678 nm, compuesto **5**, en CHCl_3 , lo que parece indicar la existencia de enlaces de hidrógeno entre el grupo carbonilo y los grupos NH de las tioureas adyacentes. Lo que además se refleja en una menor frecuencia de vibración en el espectro de IR para el C=O (de 1597 cm^{-1} para **5** a 1606 cm^{-1} para el compuesto modelo en CHCl_3). La adición de H_2PO_4^- o HSO_4^- a una disolución de **5** en CHCl_3 causa un efecto hipocrómico y un desplazamiento hipsocrómico de la banda de absorción a 632 nm como resultado de la ruptura de los enlaces de hidrógeno intramoleculares con el carbonilo del cromóforo por la coordinación del anión a través de los grupos tiourea.

Las 7-aminofenoxazinonas presentan una serie de ventajas con respecto a los derivados análogos del azul de fenol:

- Al tratarse de sistemas rígidos, son altamente fluorescentes y además se evita isomerización *cis-trans*.

- Los colorantes heterocíclicos suelen presentar mayor estabilidad frente a la fotodescomposición que los correspondientes análogos no heterocíclicos.^{7,36}

³⁴ Y. Kubo, S. Tokita, Y. Kojima, Y. T. Osano, T. Matsuzaki, *J. Org. Chem.*, **1996**, *61*, 3758.

³⁵ D. H. Lee, H. Y. Lee, J.-I. Hong, *Tetrahedron Lett.*, **2002**, *43*, 7273.

Con respecto al rojo nilo, la mayor versatilidad sintética para la incorporación de distintos grupos en el núcleo cromofórico, ha motivado finalmente la elección de 7-amino-3H-fenoxazin-3-ona para el desarrollo de sensores químicos en esta tesis.

A.1.5.- Merocianinas.

Los derivados de 7-amino-3H-fenoxazin-3-ona se pueden clasificar como colorantes tipo merocianina.

Las merocianinas son unos de los tipos de polienos sustituidos D-A más conocidos.³⁷ Se trata de cianinas neutras en las que un grupo dador (generalmente un grupo amino) y un grupo electrón aceptor (generalmente un carbonilo) se encuentran conjugados a través de un sistema de dobles enlaces (ver Fig. III.A.5). También se conocen como sistemas “*push-pull*” por tener un grupo NR₂ dador y el C=O como aceptor conjugados a través del sistema electrónico π.

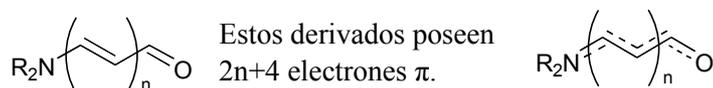


Fig. III.A.5. Estructura general para una merocianina en la que D = NR₂ y A = C=O.

³⁶ M. R. Malean, M. Bader, L. R. Dalton, L. R. S. Devine, W. H. Sëller, *J. Phys. Chem.*, **1990**, *94*, 4386.

³⁷ A. Mishra, R. K. Behera, P. K. Behera, B. K. Mishra, G. B. Behera, *Chem. Rev.*, **2000**, *100*, 1973.

Al tratarse de polienos asimétricos, la estructura electrónica va a depender de la polaridad del disolvente, ver Fig. III.A.6.

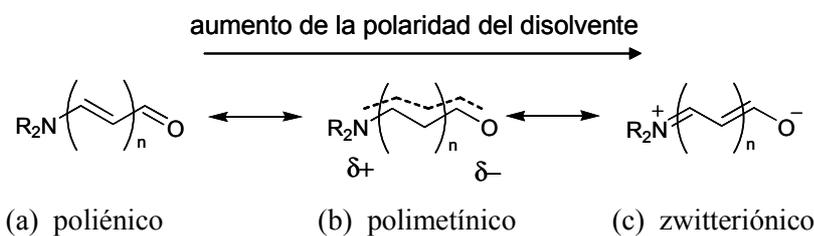


Fig. III.A.6. Representación de la contribución de las estructuras mesoméricas en merocianinas en función de la polaridad del disolvente.

En el caso concreto de las merocianinas, se sugiere que el intermedio polimetínico (b) con la misma contribución de ambas estructuras mesoméricas (a) y (c) poseerá la mayor longitud de onda de absorción.³⁸

Sin embargo, en la mayoría de merocianinas, en lugar de una fuerte deslocalización del sistema electrónico π en estos compuestos D-A, la energía de excitación menor retiene algo de carácter CT (no se trata de compuestos polimetínicos ideales³⁸) por tanto pueden mostrar solvatochromismo.³⁹ Por ejemplo, la siguiente cetocianina fluorescente (ver Fig. III.7.A) presenta solvatochromismo positivo, con un desplazamiento de unos 100 nm tanto en el máximo de absorción como en el de emisión al pasar de tolueno a agua. Los desplazamientos de Stokes van aumentando levemente con la polaridad y, aunque importantes, no son tan elevados como en el caso de compuestos con un marcado carácter de CT (de 1760 a 2900 cm^{-1} en el intervalo de tolueno a metanol). El efecto del solvatochromismo positivo lo explican en base a la estructura tipo merocianina de la cetocianina.⁴⁰ Afirman que las merocianinas presentan un solvatochromismo positivo por la transición de una estructura de mayor carácter poliénico a una más polimetínica

³⁸ El *estado polimetínico ideal* hace referencia a estructuras con una elevada energía de resonancia y órdenes de enlace π idénticos (= 1.5) atribuibles a una deslocalización máxima de los electrones π . En contraste al estado aromático y al poliénico, un compuesto polimetínico se caracteriza por la alternancia de la densidad electrónica π a lo largo de la cadena polimetínica. Para una descripción más detallada ver S. Dähne, *Science*, **1978**, 199, 4334.

³⁹ J. Fabian, H. Nakazummi, M. Matsuoka, *Chem. Rev.*, **1992**, 92, 1197.

⁴⁰ M. A. Kessler, O. S. Wolfbeis, *Spectrochim. Acta*, **1991**, 47A, 187.

cuando la polaridad del disolvente aumenta (la forma polimetínica es estabilizada en disolventes polares mientras que la poliénica es la forma predominante en disolventes apolares). La transición de menor energía se alcanza cuando ambas formas, la neutra y la zwitteriónica, contribuyen de la misma manera al sistema mesomérico (estructura (b) Fig. III.A.6).

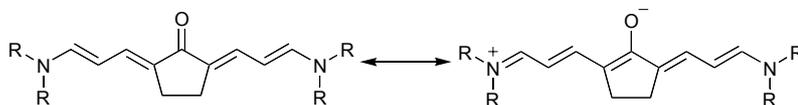


Fig. III.A.7. Estructuras resonantes para el colorante de la referencia 40.

A.2.- OBJETIVOS.

◆ En primer lugar se procederá a la caracterización espectroscópica de varios sistemas modelo para intentar elucidar el comportamiento fotofísico del núcleo de fenoxazinona y establecer las bases que pueden servir para el diseño de sensores cromo/fluorogénicos para iones a partir de este cromóforo, y en la medida de lo posible, para la predicción del tipo de respuesta (desplazamientos batocrómicos o hipsocrómicos, activación o desactivación de la fluorescencia, etc.). Entre los sistemas modelo se incluye la estructura “puenteada” **FenxJulo** para la evaluación de la existencia de procesos TICT en el estado excitado.

◆ Empleo del núcleo de 7-aminofenoxazinona como esqueleto para el diseño de fluorionóforos. Este tipo de sistemas “*push-pull*” presenta varias ventajas para su empleo como sensores químicos fluorescentes.

a) Presentan longitudes de onda de absorción superiores a 500 nm, lo que evita interferencias que pueden haber por la absorción de la luz por componentes orgánicos de la matriz en muestras biológicas por ejemplo.

b) Poseen un grupo D y A conectados a través del sistema aromático π por lo que existe una transferencia de carga fotoinducida parcial. Estos compuestos son sensibles a la polaridad del entorno porque el momento dipolar en el estado excitado es mayor que en el estado fundamental. Se piensa que la coordinación de iones a través del grupo D o A, resultará en un cambio en las propiedades espectroscópicas traducándose en un cambio de color/fluorescencia.

c) Son altamente fluorescentes, presentan una coloración intensa y una gran estabilidad fotoquímica.

d) No han sido descritos previamente en la literatura como sensores químicos moleculares.

♦ Tal y como se describe en la literatura, la protonación de este tipo de cromóforos tiene lugar a través del grupo carbonilo que actúa como grupo electrón aceptor. Esta coordinación induce desplazamientos batocrómicos de las bandas de absorción y emisión y desactivación de la fluorescencia. Al igual que los protones, es de esperar la coordinación de los cationes metálicos también tenga lugar a través de esta posición. Mediante la incorporación de un ligando a través del nitrógeno en posición electrón dadora, que sea capaz de dar constantes de estabilidad suficientemente elevadas como para competir por la coordinación de los cationes con el grupo carbonilo, se pretende conseguir un reconocimiento selectivo de un determinado grupo de cationes frente a otros en función de la posición de coordinación.

a) Mediante la introducción de átomos de azufre en el receptor, átomos de carácter básico más blando que el grupo carbonilo, el objetivo es que cationes como el mercurio –de interés analítico y medioambiental por su elevada toxicidad– coordinen de manera selectiva a través de esta posición. Este tipo de ligandos suele dar constantes de estabilidad bastante elevadas para Hg^{2+} , de manera que además, se espera que el proceso de reconocimiento sea efectivo en medio acuoso.⁴¹ Esto sería muy interesante ya que los ejemplos de fluorionóforos para Hg^{2+} que funcionen en agua son realmente escasos, sobre todo en el caso de compuestos que

⁴¹ Ejemplos de cromo/fluoróforos funcionalizados con ligandos que contienen heteroátomos de azufre para el reconocimiento de Hg^{2+} , a) M. V. Alfimov, S. P. Gromov, E. V. Fedorov, O. A. Fedorova, A. I. Verdenikov, A. V. Churakov, L. G. Kuz'mina, J. A. K. Howard, S. Bossmann, A. Braun, M. Woerner, D. F. Sears, J. Saltiel, *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, *121*, 4992; c) K. Rurack, M. Kollmannsberger, U. Resch-Genger, J. Daub, *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, *122*, 968; d) K. Rurack, U. Resch-Genger, J. L. Bricks, M. Spieles, *Chem. Commun.*, **2000**, 2103; e) K. Rurack, J. L. Bricks, G. Reck, R. Radeglia, U. Resch-Genger, *J. Phys. Chem. A*, **2000**, *104*, 3087; f) K. Rurack, J. L. Bricks, B. Schulz, M. Maus, G. Reck, U. Resch-Genger, *J. Phys. Chem. A*, **2000**, *104*, 6171; g) H. Sakamoto, J. Ishikawa, S. Nakao, H. Wada, *Chem. Commun.*, **2000**, 2395; h) E. M. Nolan, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 14270; i) J. V. Ros-Lis, R. Martínez-Máñez, K. Rurack, F. Sancenón, J. Soto, M. Spieles, *Inorg. Chem.*, **2004**, *43*, 5183.

además cambien de color tras la coordinación del catión, que es lo que se pretende conseguir aquí.

b) La mayoría de los sistemas D-A han sido diseñados para el reconocimiento de cationes alcalinos y alcalinotérreos mediante el empleo de ligandos tipo éter corona,^{1-3,42,41e,f} de manera que la selectividad para cada grupo está bien establecida en base a su relación carga/radio. La introducción de los grupos receptores en el núcleo de fenoxazinona se realizará a través de la posición electrón dadora mediante la sustitución del grupo dimetilamino por macrociclos tipo aza-tetraoxa (**A15C5**, como en los ejemplos **1** y **2**) o aza-pentaoxa (**A18C6**). Mediante el incremento del tamaño del macrociclo se pretende favorecer la coordinación de cationes de un determinado radio (Ca^{2+} en el caso de **A15C5**, o Ba^{2+} , de mayor radio, en el caso de **A18C6**).

♦ Los ejemplos de sensores para aniones son más escasos que en el caso de cationes. Una propiedad interesante de los cromóforos estudiados aquí es la posibilidad de modular sus propiedades ópticas de manera que la determinación de especies de muy diversas características es posible. Mediante la introducción del receptor apropiado se pretende llevar a cabo la determinación de aniones mediante espectroscopia de UV/Vis empleando el núcleo de fenoxazinona.

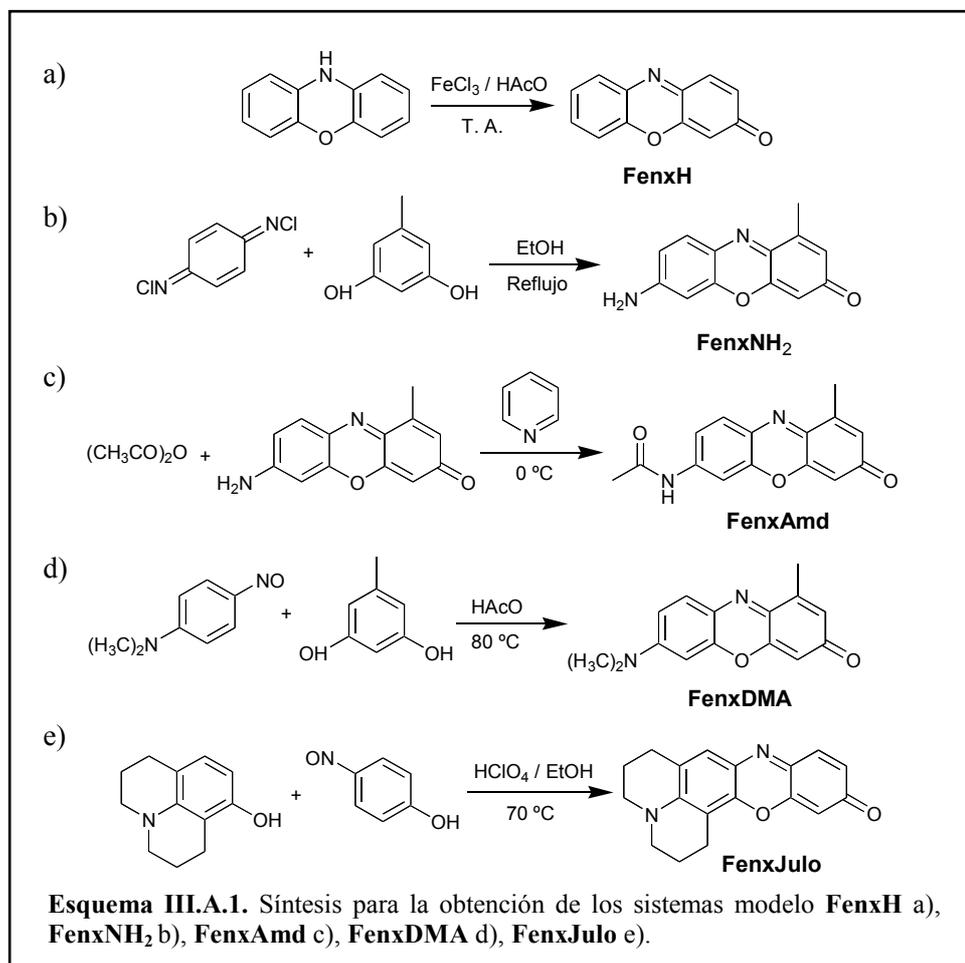
A.3.- ESTUDIOS SOLVATOCRÓMICOS.

A.3.1.- Síntesis de Sistemas Modelo para los Estudios Solvatocrómicos.

Ninguno de los compuestos empleados como modelo para los estudios espectroscópicos de RMN, IR o UV/Visible son comerciales, de manera que fue necesaria su preparación de acuerdo a procedimientos previamente descritos en la literatura (excepto en el caso de **FenxJulo** para el que no se encontró ningún

⁴² Ejemplos en los que se emplean los ligandos **A15C5** y **A18C6** en sistemas D-A para la detección de cationes alcalinos y alcalinotérreos, a) H.-G. Löhr, F. Vögtle, *Acc. Chem. Res.*, **1985**, *18*, 65 y referencias aquí citadas; b) M. Kollmannsberger, K. Rurack, U. Resch-Genger, J. Daub, *J. Phys. Chem. A*, **1998**, *102*, 10211; c) K. Rurack, M. Sczegan, M. Spieles, U. Resch-Genger, W. Rettig, *Chem. Phys. Lett.*, **2000**, *320*, 87.

ejemplo, por lo que fue necesario desarrollar un método de síntesis) y que se explican a continuación (ver Esquema III.A.1).



Para la obtención del compuesto **FenxH** se siguió el procedimiento descrito en 1902 por Kehrman y Saager que consiste en la oxidación de la fenoxazina en medio ácido acético glacial con cloruro de hierro (III).⁴³

⁴³ F. Kehrman, A. Saager, *Chem. Ber.*, **1902**, 341.

El derivado **FenxNH₂** se preparó según el procedimiento de Musso y Wager descrito en 1961 mediante condensación del orcinol y la N,N'-dicloro-*p*-benzoquinondiimina en etanol a reflujo.⁴⁴ La N,N'-dicloro-*p*-benzoquinondiimina se obtuvo mediante oxidación de la *p*-fenilendiamina con hipoclorito sódico en medio HCl acuoso, según el procedimiento de Willstaeter y Mayer.⁴⁵

El derivado 7-acetamido de la fenoxazinona, **FenxAmd**, se obtuvo de forma análoga a la descrita por Musso y Wager⁴⁴ mediante reacción del anhídrido acético con **FenxNH₂** en piridina en baño de hielo. La adición de un gran exceso del anhídrido con respecto a la fenoxazinona es necesaria debido a la pobre reactividad del grupo amino.

El derivado dimetilamino, **FenxDMA**, se preparó siguiendo un procedimiento similar al descrito por Kotouček y colaboradores en 1965⁴⁶ mediante la condensación, en ácido acético glacial, de orcinol y el *p*-nitroso derivado de la N,N-dimetilanilina, que fue preparado mediante un método convencional de nitrosación de la N,N-dimetilanilina con nitrito sódico en HCl 6 M en baño de hielo.⁴⁷

Para la síntesis de **FenxJulo** en un primer momento se pensó en seguir el mismo procedimiento empleado para la obtención de **FenxDMA**, mediante condensación del orcinol y el 9-nitrosojulolidino en ácido acético. Sin embargo, la nitrosación del julolidino con ácido nitroso no es posible debido a la gran inestabilidad del julolidino. Tal y como describen Smith y Yu,⁴⁸ en lugar de la nitrosación se produce la oxidación en la posición 9 de julolidino –que presenta una elevada tendencia a la oxidación por la coplanaridad del par de electrones libres del nitrógeno con la nube electrónica π de anillo aromático– obteniéndose el 9,9'-bijulolidilo de color rojo. Un procedimiento alternativo de síntesis, mediante la condensación del 8-hidroxijulolidino y el *p*-nitrosfenol en medio EtOH/ HClO₄, condujo al producto deseado, aunque con rendimientos bastante bajos ya que se obtiene una mezcla de diversos productos coloreados.

En la Fig. III.A.8 se muestran los espectros de RMN heteronuclear (¹H-¹³C) HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Correlation*) de la parte alifática (a) y

⁴⁴ H. Musso, P. Wager, *Chem. Ber.*, **1961**, 94, 2551.

⁴⁵ R. Willstaetter, E. Mayer, *Chem. Ber.*, **1904**, 1494.

⁴⁶ M. Kotouček, M. Martinek, E. Ružička, *Monatsh. Chem.*, **1965**, 96, 1433.

⁴⁷ *Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry*, 4th Ed., 1978, Longman, pág. 677.

⁴⁸ P. A. S. Smith, T.-Y. Yu, *J. Org. Chem.*, **1952**, 17, 1281.

aromática (b) para **FenxJulo** en CDCl_3 y la asignación de las señales para los protones según la numeración del esquema que aparece en la figura.

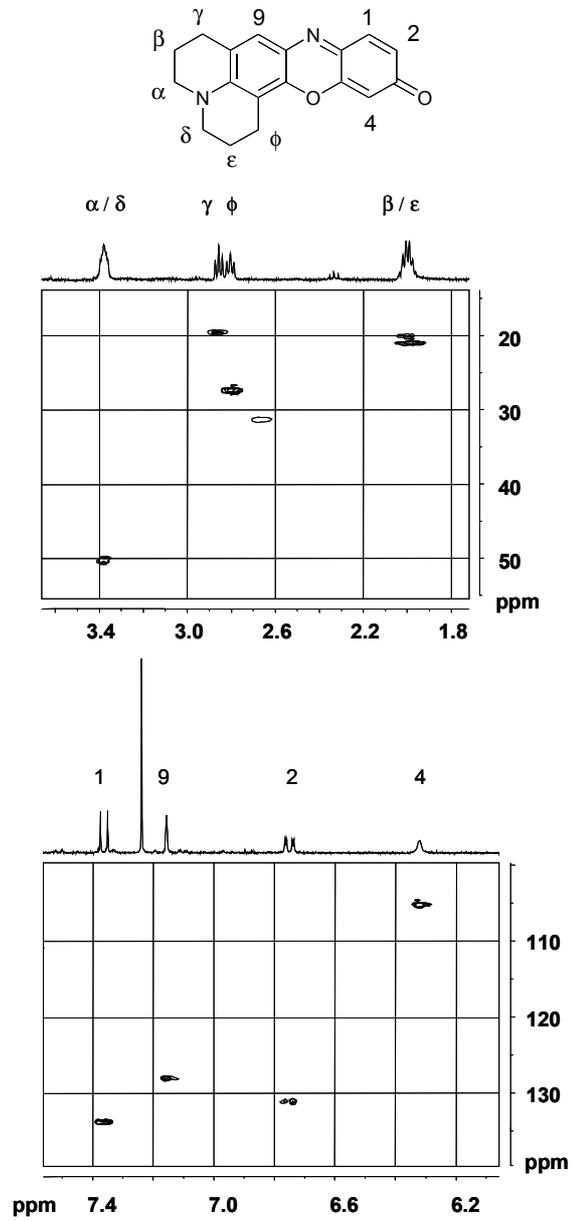


Figura III.A.8. Espectros de HSQC para la región alifática y aromática de **FenxJulo** en CDCl_3 y asignación de las señales de protón.

El multiplete que aparece a 2 ppm y que integra 4 H corresponde a los metilenos β y ϵ de la subunidad de julolidino, señales que aparecen a 19.8 y 20.8 ppm en el espectro de ^{13}C . Los tripletes a 2.80 y 2.85 ppm que integran 2 H cada uno se asignan a los metilenos del julolidino enlazados directamente a la fenoxazinona, que se corresponden con las señales a 27.2 y 19.3 ppm en ^{13}C , respectivamente. El multiplete a 3.36 ppm pertenece a los metilenos enlazados al N aromático (α y δ), que son prácticamente equivalentes, tal y como se aprecia en la única señal de ^{13}C a 50.3 ppm. En la parte aromática aparece un doblete a 6.29 ppm con una constante de acoplamiento de 2.1 Hz que corresponde al protón 4 que acopla en *meta*- con el protón 2. Este protón 2 aparece a 6.74 ppm como un doblete, ya que también acopla en *orto*- con el 1 que aparece a 7.36 ppm. Finalmente, el protón 9 aparece como un singlete a 7.15 ppm.

A.3.2.- Estudios Espectroscópicos para FenxDMA.

En la Tabla III.A.2 se muestran los datos espectroscópicos obtenidos para **FenxDMA** en varios disolventes a 298 K. λ_{abs} y λ_{em} representan las longitudes de onda máximas de la banda de absorción y emisión, respectivamente, en nanómetros. $\tilde{\nu}_{\text{abs}}$ y $\tilde{\nu}_{\text{em}}$ representan los números de onda máximos para la absorción y la emisión, respectivamente, en la escala lineal de energía (en cm^{-1}). Para la conversión de los espectros en la escala de energía en el caso de la emisión se ha tenido en cuenta la corrección descrita en el apartado 2.2 del Capítulo V. Los desplazamientos de Stokes ($\Delta\tilde{\nu}_{\text{abs-em}}$, en cm^{-1}) se calculan como la diferencia entre los máximos de absorción y emisión en número de onda.

Las características espectroscópicas favorables del compuesto modelo **FenxDMA** son obvias a partir de los resultados obtenidos en la Tabla III.A.2. En medios apróticos altamente polares, así como en medios alcohólicos o acuosos, las bandas de absorción y emisión están centradas sobre 500 y 600 nm, respectivamente y bien separadas por desplazamientos de Stokes ($>1000 \text{ cm}^{-1}$). En la Fig. III.A.9 se pueden ver los espectros de absorción y emisión para algunos de los disolventes próticos y no próticos.

Tabla III.A.2. Datos espectroscópicos para **FenxDMA** en varios disolventes a 298 K.

| Disolvente | λ_{abs} (nm) | $\tilde{\nu}_{\text{abs}}$ (10^3 cm^{-1}) | λ_{em} (nm) | $\tilde{\nu}_{\text{em}}$ (10^3 cm^{-1}) | $\Delta\tilde{\nu}_{\text{abs-em}}$ (cm^{-1}) |
|---------------------------------|--------------------------------|--|-------------------------------|---|---|
| H ₂ O | 594 | 16.83 | 636 | 15.67 | 1160 |
| Glycerol | 591 | 16.92 | 633 | 15.76 | 1160 |
| Etilenglicol | 584 | 17.12 | 632 | 15.78 | 1340 |
| MeOH | 562 | 17.78 | 620 | 16.05 | 1730 |
| EtOH | 553 | 18.10 | 619 | 16.13 | 1970 |
| DMSO | 548 | 18.25 | 626 | 15.92 | 2320 |
| MeCN | 527 | 18.97 | 608 | 16.42 | 2550 |
| PrCN | 524 | 19.07 | 605 | 16.47 | 2590 |
| Acetona | 522 | 19.14 | 604 | 16.50 | 2640 |
| Ciclohexanona | 528 | 18.96 | 602 | 16.53 | 2430 |
| CH ₂ Cl ₂ | 527 | 18.97 | 597 | 16.72 | 2250 |
| THF | 515 | 19.40 | 589 | 16.89 | 2510 |
| AcOEt | 512 | 19.53 | 586 | 16.96 | 2570 |
| Et ₂ O | 500 | 20.00 | 567 | 17.51 | 2490 |
| Bu ₂ O | 496 | 20.15 | 570 | 17.45 | 2700 |
| Hexano | 482 | 20.75 | 567 | 17.39 | 3360 |

El marcado solvatocromismo de estos compuestos es evidente, habiendo una variación en el máximo de absorción de más de 100 nm al pasar de hexano ($\lambda_{\text{abs}} = 482 \text{ nm}$) a agua ($\lambda_{\text{abs}} = 594 \text{ nm}$). Este desplazamiento batocrómico al aumentar la polaridad del disolvente (solvatocromismo positivo) estaría de acuerdo con un mayor momento dipolar en el estado excitado S_1 que en el fundamental como se sugiere en los ejemplos descritos previamente en la introducción. Este cambio en el momento dipolar puede ser atribuido a una transferencia de carga intramolecular del grupo NMe_2 al $\text{C}=\text{O}$ que tiene lugar tras la excitación electrónica del cromóforo. Sin embargo, en el caso de los espectros de emisión, este solvatocromismo no es tan marcado, lo que causa una disminución gradual de los desplazamientos de Stokes (tendencia más marcada todavía en el caso de

disolventes próticos). Así por ejemplo en hexano $\Delta\tilde{\nu}_{\text{abs-em}} = 3360 \text{ cm}^{-1}$, en MeCN es de 2550 cm^{-1} y en H_2O el desplazamiento de Stokes es de 1160 cm^{-1} . Esta disminución en los desplazamientos de Stokes no es lo que se suele observar en el caso de compuestos de un marcado carácter de CT (por ejemplo, chalconas con sustituyentes D-A con carácter CT intramolecular se caracterizan por un aumento en el desplazamiento de Stokes con el aumento de la polaridad del disolvente, así en hexano $\Delta\tilde{\nu}_{\text{abs-em}} = 3200 \text{ cm}^{-1}$, en Et_2O es 4700 cm^{-1} y en MeCN de 6000 cm^{-1} ⁴⁹).

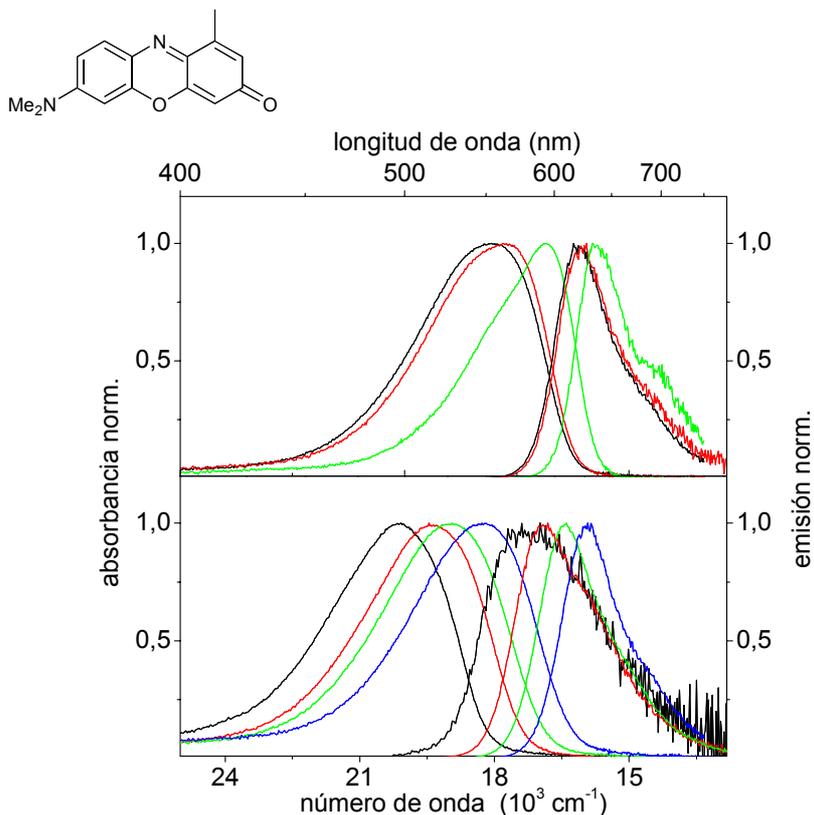


Fig. III.A.9. Espectros de absorción y emisión para **FenxDMA** en varios disolventes, en la gráfica superior, los disolventes próticos EtOH (—), MeOH (—) y H_2O (—) y en la inferior los apróticos, Bu_2O (—), THF (—), MeCN (—) y DMSO (—).

⁴⁹ K. Rurack, M. Dekhtyar, J. L. Bricks, U. Resch-Genger, W. Rettig, *J. Phys. Chem. A*, **1999**, *103*, 9626.

Esta tendencia inversa en la variación de los desplazamientos de Stokes en el caso de **FenxDMA** al aumentar la polaridad del disolvente sugiere que las diferencias en los momentos dipolares entre el estado fundamental y el excitado emisivo son cada vez más pequeñas, es decir, que la naturaleza del estado que absorbe y el emisor es cada vez más similar. Esto estaría de acuerdo con un aumento en el carácter polimetínico del colorante al aumentar la polaridad del disolvente, lo que también se refleja en el estrechamiento de las bandas. Por ejemplo en el caso de **FenxDMA** la anchura de la banda a mitad altura (fwmh) va disminuyendo con la polaridad del disolvente (fwhm en Et₂O = 3270 cm⁻¹, DMSO = 3200 cm⁻¹ y en H₂O = 2410 cm⁻¹), ver Fig. III.9. Un compuesto polimetínico ideal (como los derivados tipo cianina simétricos, en los que D = A = NR₂) muestra espectros de absorción y emisión estrechos cuya posición del máximo de la banda es independiente de la polaridad del disolvente con pequeños desplazamientos de Stokes (por ejemplo, en el caso de colorantes tipo BDP⁵⁰ fwhm < 1000 cm⁻¹ y $\Delta\tilde{\nu}_{\text{abs-em}} < 800 \text{ cm}^{-1}$).

En la Fig. III.A.10 se muestra una representación gráfica del máximo de absorción para **FenxDMA** en los distintos disolventes (datos de la Tabla III.A.2) en función de la polaridad del disolvente, según la escala E_T(30). Se puede apreciar que el ajuste es lineal, lo que muestra que **FenxDMA** es sensible a las interacciones por enlace de hidrógeno, al igual que el colorante empleado para la obtención de la escala empírica (la betaína de Reichardt⁵).

⁵⁰ Z. Shen, H. Röhr, K. Rurack, H. Uno, M. Spieles, B. Schulz, G. Reck, N. Ono, *Chem. Eur. J.*, **2004**, *10*, 4853.

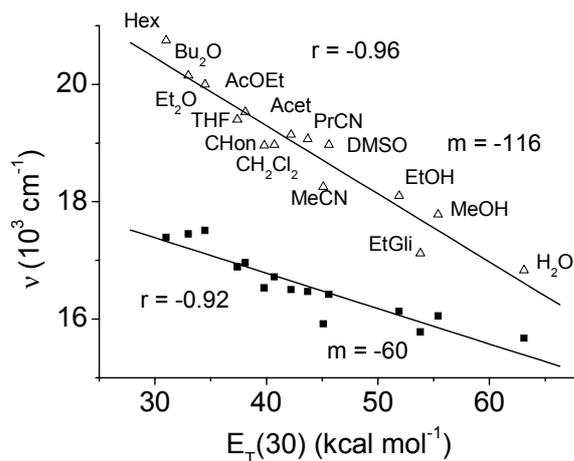


Fig. III.A.10. Máximos de absorción (Δ) y emisión (\blacksquare) en número de onda vs. la escala $E_T(30)$, para **FenxDMA** en varios disolventes.

En esta gráfica se incluye además el ajuste para los datos de emisión. Se puede observar la mayor variación en el máximo de absorción con respecto al de emisión comentado anteriormente. Así por ejemplo, la pendiente de la recta el ajuste para los datos de absorción es de $-116 \text{ cm}^{-1} \text{ kcal}^{-1} \text{ mol}$ mientras que la de emisión es tan sólo de -60 .

Con el objetivo de confirmar la observación anterior (aumento del carácter polimetínico al aumentar la polaridad del disolvente, es decir, mayor contribución de la estructura (b) en la Fig. III.A.6 en el estado fundamental), se procede a medir los espectros de IR en varios disolventes para **FenxDMA**. Este desplazamiento hacia la forma más polimetínica debería resultar en un debilitamiento del enlace C=O, que debería reflejarse en una disminución de la frecuencia de vibración de este enlace en el espectro de infrarrojo. Se intenta ver por tanto si el aumento del número de onda en la absorción en el visible se puede relacionar con el debilitamiento del enlace C=O.

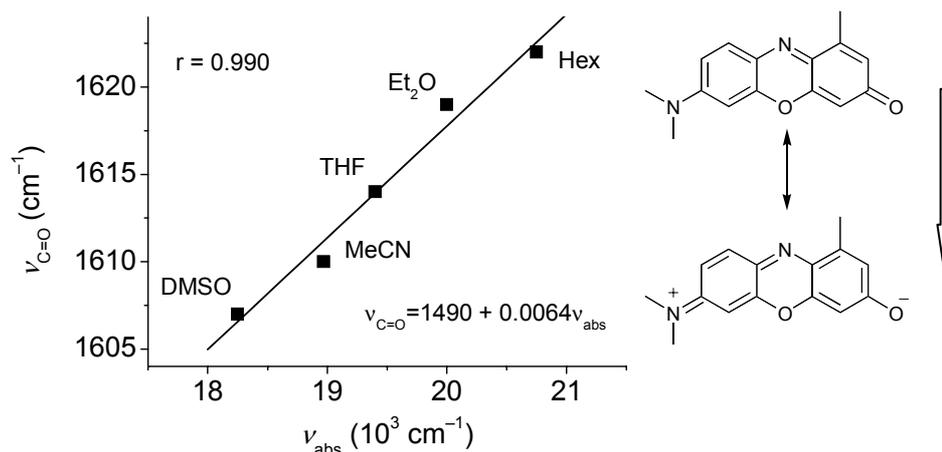


Fig. III.A.11. Correlación de la vibración del grupo C=O obtenida mediante espectroscopia de IR con el máximo de absorción de **FenxDMA** en varios disolventes.

Se obtiene una relación lineal de la frecuencia de vibración en el IR para el grupo C=O vs. número de onda máximo para la absorbancia en el visible. Esta relación muestra por tanto que la responsable de la variación en el máximo de absorción es el debilitamiento del enlace C=O, lo que está de acuerdo con un paso hacia la estructura más polimetínica en el estado fundamental al aumentar la polaridad del disolvente.

Esta menor frecuencia de vibración también se observa en los derivados del azul de fenol descritos en la introducción, así por ejemplo en el caso del compuesto **5** está relacionada con la formación de enlaces de hidrógeno a través del carbonilo, o en el caso de la referencia 33, la disminución de la frecuencia de vibración IR para el C=O es consecuencia del aumento del carácter enólico del grupo C=O inducido por la coordinación de Ca(II) a través de esta posición.

Atendiendo a los desplazamientos de ¹³C-RMN del grupo C=O para **FenxDMA** en CDCl₃ ($\delta = 186$ ppm) en relación con los resultados descritos por otros autores, se puede considerar que la estructura resonante que predomina en **FenxDMA** es la quinoidal en lugar de la zwitteriónica (ver Fig. III.A.4). Morley y Fitton encuentran por ¹³C RMN un $\delta = 188$ ppm para el azul de fenol en CDCl₃ (de carácter idéntico al carbono carbonílico de la benzoquinona, $\delta = 187.1$ o la 4,4-dimetilciclohexa-2,5-dien-1-ona, $\delta = 185,8$ ppm, mientras que para el carbono de un anión fenóxido el C unido a oxígeno resuena a 168.1 ppm).³¹ Estos

mismos autores, encuentran que en el caso de la merocianina de Brooker (compuesto **3**), por lo contrario, se observa un predominio de la estructura zwitterionica,⁵¹ incluso en disolventes de baja constante dieléctrica. Estudios de ¹³C RMN revelan en este caso que la resonancia del grupo C=O (179 ppm en CDCl₃) es intermedia entre la de la benzoquinona y el anión fenóxido.

En la Tabla III.A.3 se muestran los resultados obtenidos para el estudio solvatocinético de **FenxDMA** en varios disolventes. Φ_f representa el rendimiento cuántico de fluorescencia calculado tal y como se describe en el apartado 2.2 del Capítulo V. τ_f es el tiempo de vida en nanosegundos y las constantes radiativas (k_r) y no radiativas (k_{nr}), en segundos⁻¹ se calcularon a partir de Φ_f y τ_f tal y como se describe en el mismo apartado del Capítulo V. Otra característica espectroscópica favorable de **FenxDMA**, según se puede apreciar en esta tabla es su elevado rendimiento cuántico, especialmente en el caso de disolventes polares apróticos.

Los rendimientos cuánticos de fluorescencia muestran un aumento al aumentar la polaridad del disolvente, tendencia que se invierte en el caso de disolventes próticos, en los que hay de nuevo una disminución en la emisión presumiblemente por la formación de enlaces de hidrógeno a través del grupo carbonilo, lo que está de acuerdo con lo observado por otros autores para las 7-aminofenoxazinonas^{10,12} y el rojo nilo²⁸ y para otros compuestos con grupos carbonilo capaces de formar enlaces de hidrógeno.²⁷ En el caso de disolventes próticos la disminución en los rendimientos cuánticos de fluorescencia estaría relacionada con el aumento de la capacidad dadora de enlace de hidrógeno del disolvente, más que con el aumento de la polaridad del mismo.

⁵¹ J. O. Morley, R. M. Morley, R. Docherty, M. H. Charlton, *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, *119*, 10192.

Tabla III.A.3. Datos espectroscópicos para **FenxDMA** en varios disolventes a 298 K.

| Disolvente | Φ_f | τ_f (ns) | k_r (10^8 s^{-1}) | k_{nr} (10^8 s^{-1}) |
|---------------------------------|----------|-------------------|------------------------------------|---------------------------------------|
| H ₂ O | 0.052 | 0.34 | 1.52 | 28 |
| Glicerol | 0.20 | n.d. ^a | n.d. | n.d. |
| Etilenglicol | 0.21 | n.d. | n.d. | n.d. |
| MeOH | 0.23 | 1.45 | 1.56 | 5 |
| EtOH | 0.39 | n.d. | n.d. | n.d. |
| DMSO | 0.59 | 3.39 | 1.73 | 1.2 |
| MeCN | 0.67 | 3.80 | 1.78 | 0.9 |
| PrCN | 0.48 | 3.42 | 1.40 | 1.5 |
| Acetona | 0.52 | 2.98 | 1.76 | 1.6 |
| Ciclohexanona | 0.48 | 2.72 | 1.76 | 1.9 |
| CH ₂ Cl ₂ | 0.38 | 2.05 | 1.83 | 3 |
| THF | 0.14 | 0.79 | 1.74 | 11 |
| AcOEt | 0.098 | 0.67 | 1.47 | 14 |
| Et ₂ O | 0.009 | 0.06 | 1.43 | 163 |
| Bu ₂ O | 0.005 | 0.03 | 1.62 | 311 |
| Hexano ^b | < 0.001 | 0.04 ^c | 0.22 | 238 |

^a No determinado.

^b Los valores en hexano no son demasiado fiables ya que debido a la baja solubilidad de **FenxDMA** en este disolvente, parece observarse la aparición de agregados, incluso a bajas concentraciones.

^c Con un segundo componente $\tau_2 = 1.373 \text{ ns}$ (amplitud relativa $\tau_2/\tau_1 = 0.0009$).

En la Fig. III.A.12 se muestra la variación del logaritmo de las constantes radiativas y no radiativas para **FenxDMA** en función de la polaridad del disolvente para la escala E_T(30).

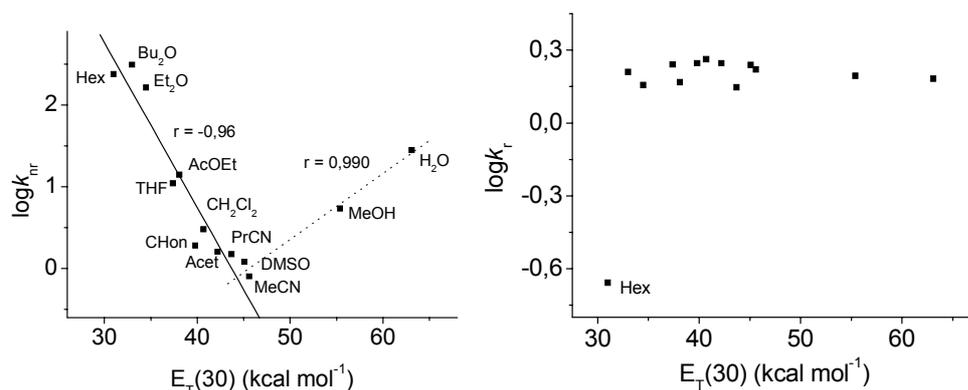


Fig. III.A.12. Variación del logaritmo de k_{nr} (izquierda) y k_r (derecha) en función de la polaridad del disolvente según la escala $E_T(30)$ para **FenxDMA**.

En el caso de k_r los valores son prácticamente constantes (excepto para el hexano, disolvente que se descarta por la posible formación de agregados debido a la baja solubilidad del colorante en este medio). Esto da una idea de la similitud de la especie emisiva en todos los disolventes.

Por otro lado, en disolventes altamente polares pero apróticos, la k_{nr} aumenta significativamente al disminuir la polaridad, pero se ve incrementada, de manera menos importante, al ir aumentando la proticidad del disolvente. Los procesos que conducen a una desactivación de la fluorescencia en ambos regímenes de disolventes son por tanto presumiblemente distintos. En combinación con lo descrito en sistemas merocianínicos relacionados, esto sugiere que la emisión en disolventes polares apróticos tiene lugar desde un estado excitado plano que posee un cierto carácter de transferencia de carga. El paso de una naturaleza más poliénica a más polimetínica parece conducir a un aumento en el rendimiento cuántico de fluorescencia y sugiere los efectos favorables para un sensor de aumentar la fuerza electrón dadora en esta posición.

Los desplazamientos batocrómicos más pronunciados y la mayor estructuración de las bandas observadas al pasar de un medio aprótico a uno alcohólico o acuoso pueden racionalizarse como un desplazamiento más pronunciado del equilibrio quinonimina–zwitterión hacia el último, lo que probablemente está facilitado por una mayor interacción por enlace de hidrógeno con el disolvente. Esta interacción posibilita la desactivación no radiativa desde el

estado excitado por las vibraciones asociadas al enlace de hidrógeno que es la causante de la disminución de los rendimientos cuánticos en estos disolventes.

En el caso de MeOH, etilenglicol y glicerol, disolventes alcohólicos de polaridad similar pero diferente viscosidad, se pone de manifiesto la influencia despreciable de la viscosidad del disolvente en los rendimientos cuánticos de fluorescencia y en los tiempos de vida de **FenxDMA**. Tal y como se refleja en Φ_f de 0.23 en MeOH ($\eta_{298K} = 0.544$ mPa s) y 0.21 en etilenglicol (16.1 mPa s), así como 0.20 en glicerol (934 mPa s)⁵² muestra que la dependencia de la población de un estado emisor con movimientos intramoleculares en el estado excitado, tal y como se requeriría para TICT es más bien improbable.

A.3.3.- Estudios Espectroscópicos para **FenxJulo**.

Una táctica concluyente en lo que respecta al TICT es impedir la rotación por la introducción de puentes en el N que bloquean el movimiento con respecto al grupo aceptor. En la Tabla III.A.4 se incluyen los resultados obtenidos para el derivado puentado de la fenoxazinona, **FenxJulo**, obtenidos de la misma manera que para **FenxDMA**.

En el caso de **FenxJulo** se observa un desplazamiento batocrómico de las bandas de absorción y emisión con respecto a **FenxDMA** para un mismo disolvente, por ejemplo, en MeCN $\lambda_{abs} = 527$ nm para **FenxDMA** mientras que para **FenxJulo** el máximo aparece a 583 nm. En el caso de la emisión, el efecto es algo menor pero también importante, así de nuevo en MeCN, para **FenxDMA** $\lambda_{em} = 608$ nm y para **FenxJulo** el máximo está centrado en 630 nm. En este caso, los cambios espectroscópicos pueden ser atribuidos a un aumento en el carácter electrón dador del sustituyente en la posición 7, ya que en **FenxJulo** los puentes etileno “obligan” al par de electrones libre del nitrógeno a disponerse de forma coplanar con el anillo de fenoxazinona, lo que favorece la deslocalización del par electrónico.

⁵² Datos de viscosidad tomados de *CRC Handbook of Chemistry and Physics*; D. R. Lide, Ed.; CRC Press: Boca Raton, 1993, 73rd edn., pp. 6-166–6-170.

Tabla III.A.4. Datos espectroscópicos para **FenxJulo** en varios disolventes a 298 K.

| Disolvente | λ_{abs} (nm) | $\tilde{\nu}_{\text{abs}}$ (10^3 cm^{-1}) | λ_{em} (nm) | $\tilde{\nu}_{\text{em}}$ (10^3 cm^{-1}) | $\Delta\tilde{\nu}_{\text{abs-em}}$ (cm^{-1}) |
|-------------------|--------------------------------|--|-------------------------------|---|---|
| H ₂ O | 626 | 15.97 | 646 | 15.46 | 520 |
| MeOH | 612 | 16.33 | 644 | 15.53 | 800 |
| DMSO | 599 | 16.69 | 642 | 15.53 | 1170 |
| MeCN | 583 | 17.14 | 630 | 15.85 | 1300 |
| THF | 564 | 17.72 | 617 | 16.15 | 1570 |
| Et ₂ O | 544 | 18.37 | 596 | 16.75 | 1620 |
| Bu ₂ O | 542 | 18.47 | 592 | 16.89 | 1570 |
| Hexano | 517 | 19.36 | 578 | 17.24 | 2120 |

Por otro lado, **FenxJulo** muestra un solvatocromismo importante. Al igual que en el caso de **FenxDMA** hay un desplazamiento en el máximo de absorción de más 100 nm al pasar de hexano a agua. De nuevo, los desplazamientos en los máximos de emisión son menores que en los de absorción (ver Fig. III.A.15). Sin embargo, en el caso de **FenxJulo** se observa una disminución significativa en los desplazamientos de Stokes para un mismo disolvente con respecto a **FenxDMA** (por ejemplo, $\Delta\tilde{\nu}_{\text{abs-em}}$ en Bu₂O = 1570 cm^{-1} , en MeCN = 1300 cm^{-1} y 520 cm^{-1} en H₂O para **FenxJulo**, mientras que para **FenxDMA** $\Delta\tilde{\nu}_{\text{abs-em}}$ en Bu₂O = 2700 cm^{-1} , en MeCN = 2550 cm^{-1} y 1160 cm^{-1} en H₂O) y se observan bandas más estructuradas (ver Fig. III.A.13). Esto parece estar relacionado con un mayor carácter polimetínico del colorante al aumentar la fuerza electrón dadora del sustituyente en la posición 7.

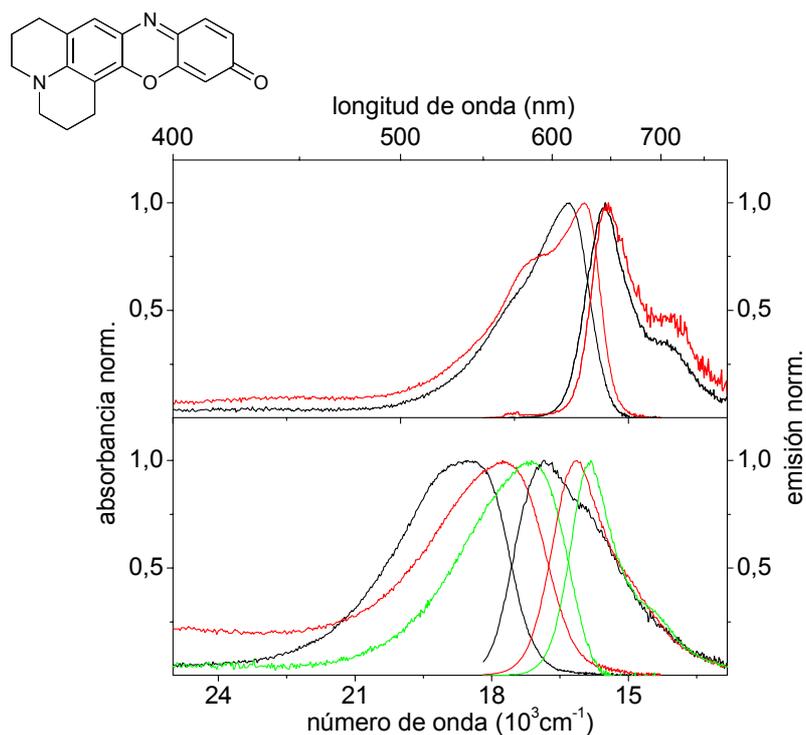


Fig. III.A.13. Espectros de absorción y emisión para **FenxJulo** en varios disolventes. En la gráfica superior, los disolventes próticos, MeOH (—) y H₂O (—) y en la inferior los apróticos, Bu₂O (—), THF (—) y MeCN (—).

En la Fig. III.A.14 se muestra cómo varían los máximos de absorción y emisión en función de la polaridad del disolvente. Se observa un comportamiento muy similar al descrito para **FenxDMA**; mayor solvatochromismo en los espectros de absorción ($m = -97 \text{ cm}^{-1} \text{ kcal}^{-1} \text{ mol}$) y en menor medida en los de emisión ($m = -54 \text{ cm}^{-1} \text{ kcal}^{-1} \text{ mol}$).

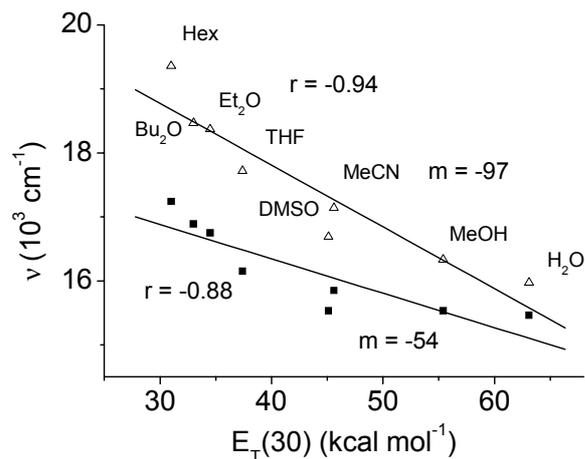


Fig. III.A.14. Máximos de absorción (Δ) y emisión (\blacksquare) en número de onda vs. la escala $E_T(30)$, para **FenxDMA** en varios disolventes.

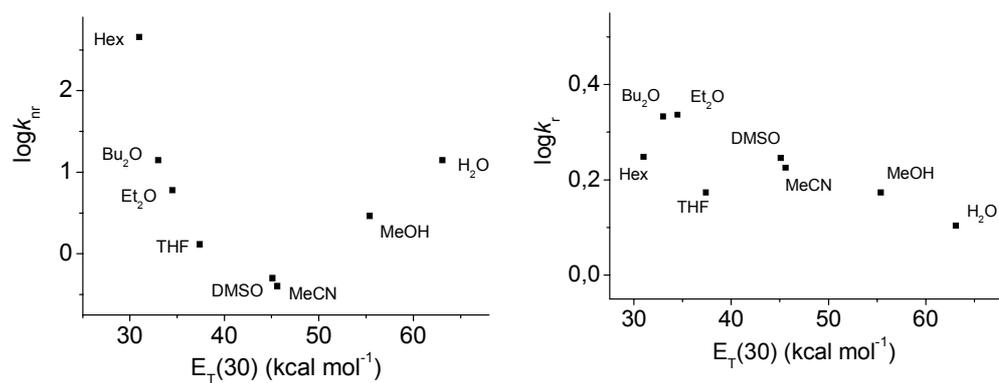
El ligero aumento en Φ_f con respecto a **FenxDMA** (ver Tabla III.A.5) podría inducir a pensar es debido a la inhibición del proceso TICT por impedir la rotación. Sin embargo esta no parece ser la causa, ya que la inhibición de TICT conduciría a cambios más dramáticos. Además, la k_r apenas varía y la k_{nr} sigue la misma tendencia que **FenxDMA** (ver Fig. III.A.15), lo que parece indicar que tanto los procesos radiativos como no radiativos en **FenxDMA** y **FenxJulo** y la naturaleza de las especies emisivas son muy similares. Como ya se ha comentado, parece más un efecto del aumento del carácter electrón dador del sustituyente en la posición 7. El aumento del carácter polimetínico al aumentar la fuerza electrón dadora del sustituyente se traduce en cambios espectroscópicos favorables como desplazamientos batocrómicos de las bandas de absorción y emisión y un aumento de los rendimientos cuánticos de fluorescencia (algo que también se pone de manifiesto con los compuestos **FenxNH₂**, **FenxUr** y **FenxAmd**, ver apartado A.5).

Tabla III.A.5. Datos espectroscópicos para **FenxJulo** en varios disolventes a 298 K.

| Disolvente | Φ_f | τ_f (ns) | k_r (10^8 s^{-1}) | k_{nr} (10^8 s^{-1}) |
|-------------------|----------|-------------------|------------------------------------|---------------------------------------|
| H ₂ O | 0.083 | 0.65 | 1.27 | 14 |
| MeOH | 0.34 | 2.29 | 1.49 | 2.9 |
| DMSO | 0.79 | 4.48 | 1.76 | 0.5 |
| MeCN | 0.80 | 4.77 | 1.68 | 0.4 |
| THF | 0.53 | 3.56 | 1.49 | 1.3 |
| Et ₂ O | 0.28 | 1.29 ^a | 2.17 | 6 |
| Bu ₂ O | 0.13 | 0.61 ^b | 2.15 | 14 |
| Hexano | 0.004 | 0.02 ^c | 1.77 | 453 |

^a $\tau_2 = 2.63$ ns (amplitud relativa $\tau_2/\tau_1 = 0.23$); ^b $\tau_2 = 2.35$ (a_{rel} $\tau_2/\tau_1 = 0.012$);
^c $\tau_2 = 2.12$ ($\tau_2/\tau_1 = 0.11$); en hexano: posible formación agregados.

En la Fig. III.A.15 se representan los valores de k_r y k_{nr} para **FenxJulo** en función de la escala ET(30).


Fig. III.A.15. Variación del logaritmo de k_{nr} (izquierda) y k_r (derecha) en función de la polaridad del disolvente según la escala $E_T(30)$ para **FenxJulo**.

En resumen, para los sistemas **FenxDMA** y **FenxJulo** se ha encontrado que:

- El aumento de la polaridad del disolvente parece inducir un aumento del carácter polimetínico del colorante (momento dipolar del estado excitado y fundamental cada vez más similares), pero no se trata de compuestos polimetínicos ideales como pueden ser la cianinas simétricas (que no presentan dependencia con la polaridad del disolvente), si no que existe una CT parcial tras la excitación electrónica.

- El aumento de la fuerza electrón dadora en la posición 7 se traduce en cambios espectroscópicos favorables como desplazamientos batocrómicos de las bandas de absorción y emisión y aumentos en los rendimientos cuánticos de fluorescencia.

- Se descarta TICT por la nula influencia de la viscosidad del disolvente en el rendimiento cuántico en el caso de **FenxDMA** y por las propiedades espectroscópicas similares del compuesto modelo **FenxJulo** en el que se inhibe cualquier posible rotación del grupo dador con respecto al aceptor.

A.4.- DETECCIÓN DE CATIONES.

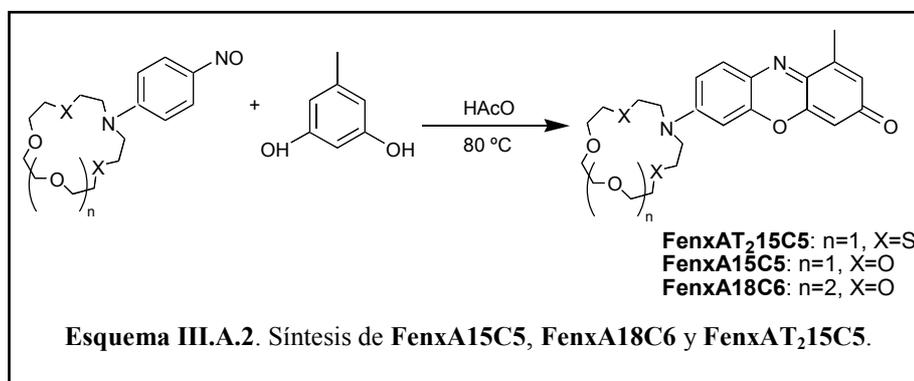
A.4.1.- Síntesis de Derivados de 7-aminofenoxazinona con Grupos Receptores para la Coordinación de Cationes.

Los compuestos **FenxAT₂15C5**, **FenxA15C5** y **FenxA18C6** se sintetizaron siguiendo un procedimiento similar al descrito para **FenxDMA**, a través de la condensación de orcinol y el *p*-nitrosfenil derivado del correspondiente ligando macrocíclico en ácido acético glacial a 90 °C durante un breve periodo de tiempo. Para la síntesis de las subunidades macrocíclicas se emplean condiciones de alta dilución⁵³ y tiempos elevados de adición de los reactivos para favorecer la reacción de ciclación frente a la de polimerización. Se trata de una sustitución nucleofílica de grupos mesilo por grupos tiol o alcohol que se lleva a cabo en acetonitrilo en presencia de una base. Los *p*-nitrosfenil derivados de **A15C5** y **A18C6**, han sido descritos previamente por Dix y Vögtle⁵⁴ y por Al-Amir y colaboradores,⁵⁵

⁵³ D. Parker, *Macrocyclic Synthesis: a Practical Approach*, Ed. L. M. Harwood, C. Moody, Oxford University Press, 1996.

⁵⁴ J. P. Dix, F. Vögtle *Chem. Ber.* **1980**, *113*, 457.

respectivamente. Para la obtención del *p*-nitrososfenil derivado de **AT₂15C5** se procedió a la nitrosación del fenil derivado del ligando oxa-tia-aza macrocíclico **PhAT₂15C5** con nitrito sódico en HCl acuoso (ver procedimiento experimental en el Capítulo V).



En la Fig. III.A.16 se muestran los espectros de ¹H y ¹³C RMN para **FenxA₂15C5**. En el espectro a) se indica la asignación de las señales de protón. En la parte alifática aparece un singlete a 2.37 ppm que integra 3 H, correspondiente al grupo metilo (a) enlazado a la subunidad aromática (que aparece a 16.8 ppm en el espectro de ¹³C). Además se pueden diferenciar las señales correspondientes a los grupos metileno unidos a azufre de la subunidad macrocíclica que aparecen como un triplete a 2.74 y 2.90 ppm en el espectro de ¹H y a 29.5 y 31.6 ppm en el espectro de ¹³C. En el intervalo de 3.6 - 3.8 ppm se observan los protones correspondientes a los metilenos del macrociclo unidos a oxígeno (que aparecen a 70.7 y 74.4 ppm en ¹³C) y al nitrógeno aromático (a 52.4 ppm en ¹³C). La simetría del ciclo se aprecia en el singlete que aparece para el metileno f. En la región aromática aparece un doblete a 7.55 ppm con una constante de acoplamiento de 9,1 Hz, correspondiente a un acoplamiento en *orto*-que se asigna al protón 9. A 6.62 ppm aparece un doblete con constantes de acoplamiento de 9.2 y 2.6 Hz correspondiente al protón 8. En el caso del protón 2, que aparece a 6.58 ppm, se puede apreciar el acoplamiento con el metilo vecino, sin embargo es un acoplamiento pequeño y no permite el cálculo de las constantes

⁵⁵ S. M. S. Al-Amir, D. C. Ashworth, R. Narayanaswamy, R. E. Moss, *Talanta* **1989**, 36, 645.

de acoplamiento. Finalmente, los dobletes que aparecen a 6.17 y 6.38, con una constante de acoplamiento de *ca.* 2 Hz, se corresponden con los protones 4 y 6, respectivamente. En el caso del espectro de ^{13}C , la señal más característica de los derivados de fenoxazinona es la correspondiente al grupo carbonilo en la posición 3 del anillo de fenoxazinona que aparece a 186.0 ppm.

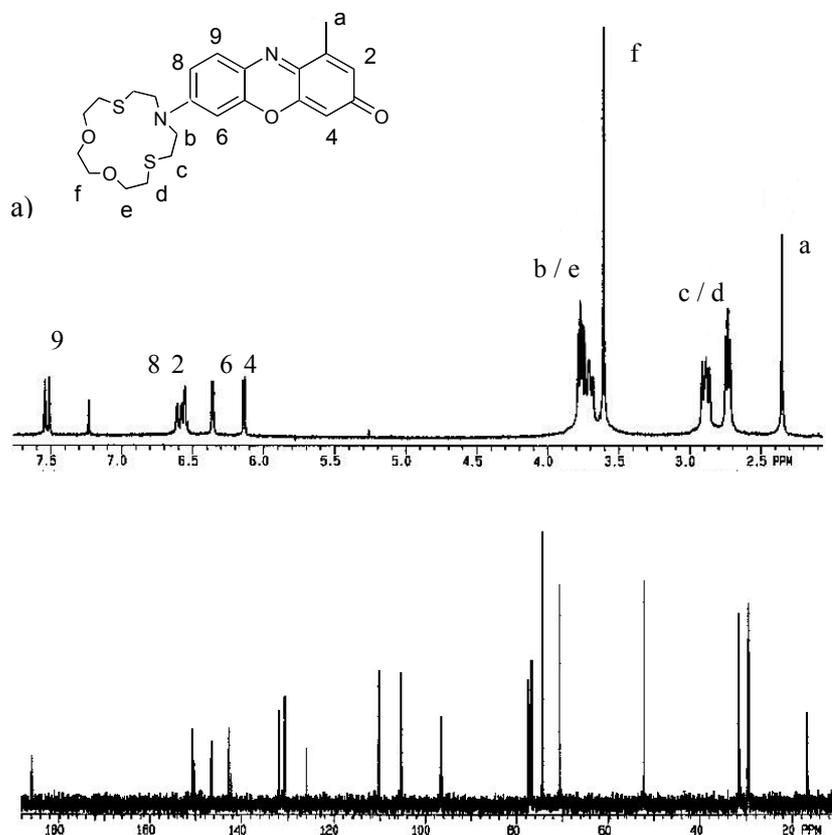


Figura III.A.16. Espectros de a) ^1H y b) ^{13}C RMN para FenxAT₂15C₅ en CDCl_3 .

En la Fig. III.A.17 a) se muestra la asignación de las señales de protón para FenxA15C5. Aquí, aparte de las señales características del grupo de fenoxazinona comentadas anteriormente, se puede diferenciar en el intervalo de 3.6 - 3.8 ppm los protones correspondientes a los metilenos del macrociclo unidos a oxígeno. La

simetría del ciclo se aprecia en el singlete que aparece para el metileno f. En el caso del espectro de ^{13}C , aparece de nuevo la señal característica de los derivados de fenoxazinona correspondiente al grupo carbonilo a 185.9 ppm. Aparte de ésta, cabe señalar las 4 señales que aparecen en la región comprendida entre 68 y 71 ppm correspondientes a los 4 metilenos unidos a oxígeno del macrociclo (c-f). A 53.3 ppm aparece el metileno unido al nitrógeno aromático (b). Y finalmente, a 16.7 ppm se observa la señal correspondiente al grupo metilo unido al anillo aromático (a).

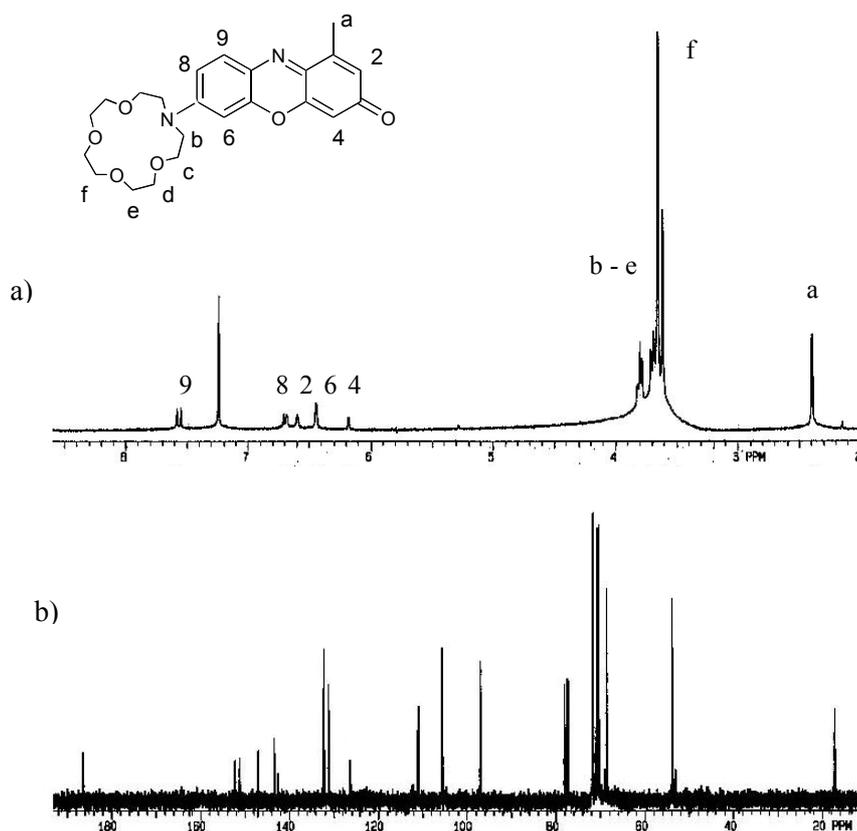


Figura III.A.17. Espectros de a) ^1H y b) ^{13}C RMN para FenxA15C5 en CDCl_3 .

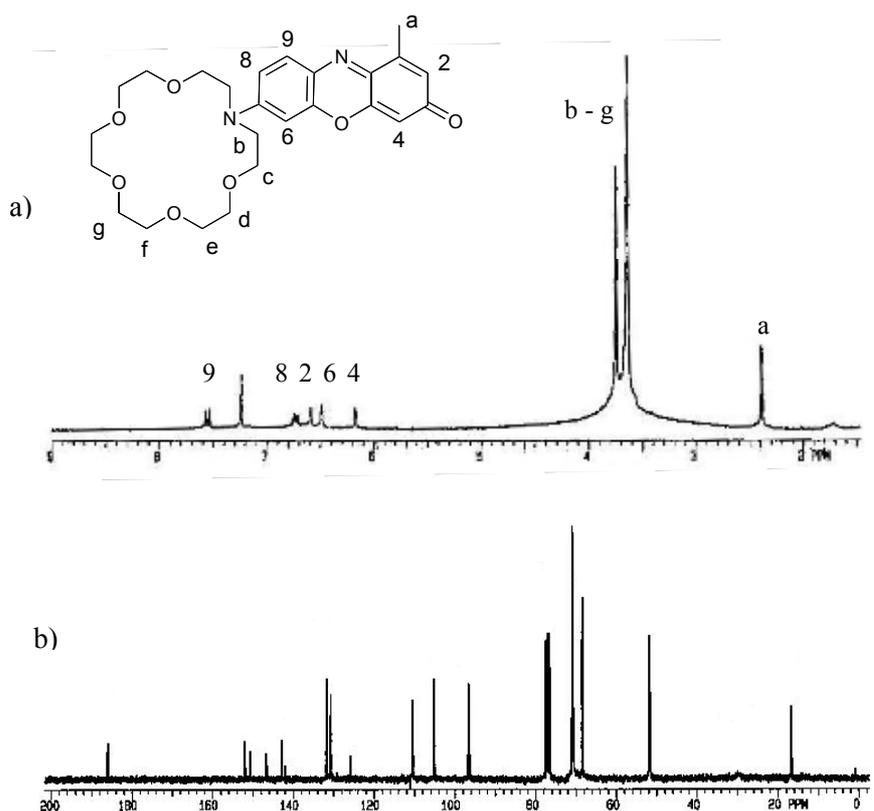


Figura III.A.18. Espectros de a) ^1H y b) ^{13}C RMN para FenxA18C6 en CDCl_3

En la Fig. III.A.18 se muestra la asignación de las señales para el espectro de ^1H RMN del compuesto FenxA18C6, que es muy similar a la asignación anterior para el ligando FenxA15C5. En el ^{13}C también aparece la señal característica del grupo carbonilo a 186.0 ppm y en este caso, en la región comprendida entre 68 y 71 ppm aparecen 5 señales correspondiente a los 5 grupos metileno del macrociclo unidos a oxígeno (c-g).

A.4.2.- Estudios Solvato-crómicos para FenxAT₂15C5, FenxA15C5 y FenxA18C6.

Tabla III.A.6. Datos espectroscópicos para los derivados macrocíclicos a 298 K.

| | λ_{abs} (nm) | $\tilde{\nu}_{\text{abs}}$ (10^3 cm^{-1}) | λ_{em} (nm) | $\tilde{\nu}_{\text{em}}$ (10^3 cm^{-1}) | $\Delta\tilde{\nu}_{\text{abs-em}}$ (cm^{-1}) |
|-------------------------------|-----------------------------|---|----------------------------|--|--|
| FenxAT₂15C5 | | | | | |
| H ₂ O | 585 | 17.09 | 635 | 15.67 | 1420 |
| MeOH | 560 | 17.86 | 627 | 15.90 | 1940 |
| MeCN | 527 | 18.98 | 610 | 16.37 | 2600 |
| THF | 518 | 19.30 | 590 | 16.89 | 2410 |
| Et ₂ O | 504 | 19.82 | 574 | 17.47 | 2320 |
| Bu ₂ O | 502 | 19.92 | 573 | 17.33 | 2470 |
| FenxA15C5 | | | | | |
| H ₂ O | 583 | 17.16 | 631 | 15.80 | 1270 |
| MeOH | 559 | 17.89 | 622 | 16.03 | 1870 |
| MeCN | 527 | 18.99 | 607 | 16.39 | 2560 |
| THF | 519 | 19.27 | 590 | 16.89 | 2410 |
| Et ₂ O | 506 | 19.78 | 572 | 17.42 | 2330 |
| Bu ₂ O | 503 | 19.89 | 571 | 17.41 | 2440 |
| FenxA18C6 | | | | | |
| H ₂ O | 586 | 17.06 | 633 | 15.75 | 1280 |
| MeOH | 566 | 17.67 | 627 | 15.90 | 1690 |
| MeCN | 530 | 18.88 | 612 | 16.29 | 2540 |
| THF | 523 | 19.11 | 597 | 16.69 | 2370 |
| Et ₂ O | 509 | 19.66 | 581 | 17.15 | 2400 |
| Bu ₂ O | 506 | 19.76 | 576 | 17.24 | 2490 |

Los estudios solvato-crómicos para los distintos ligandos de este apartado se llevaron a cabo manera análoga a los de **FenxDMA**. En la Tabla III.A.6 se muestran los máximos de absorción y emisión así como los desplazamientos de

Stokes. Los datos para los tres ligandos se corresponden bastante bien entre sí y con los obtenidos para **FenxDMA**, al igual que los datos de la Tabla III.A.7.

Tabla III.A.7. Datos espectroscópicos para los derivados macrocíclicos a 298 K.

| Disolvente | Φ_f | $\tau_f(\text{ns})$ | $k_f (10^8 \text{ s}^{-1})$ | $k_{nr} (10^8 \text{ s}^{-1})$ |
|-------------------------------|----------|---------------------|-----------------------------|--------------------------------|
| FenxAT₂15C5 | | | | |
| H ₂ O | 0.08 | 0.48 | 1.68 | 19 |
| MeOH | 0.20 | 1.14 | 1.72 | 7 |
| MeCN | 0.63 | 3.56 | 1.78 | 1.0 |
| THF | 0.15 | 0.90 | 1.64 | 9 |
| Et ₂ O | 0.013 | 0.08 | 1.61 | 127 |
| Bu ₂ O | 0.008 | 0.05 | 1.63 | 202 |
| FenxA15C5 | | | | |
| H ₂ O | 0.10 | 0.73 | 1.42 | 12 |
| MeOH | 0.19 | 1.27 | 1.53 | 6.3 |
| MeCN | 0.59 | 3.43 | 1.72 | 1.2 |
| THF | 0.18 | 1.05 | 1.76 | 7.8 |
| Et ₂ O | 0.017 | 0.10 | 1.72 | 100 |
| Bu ₂ O | 0.011 | 0.06 | 1.66 | 155 |
| FenxA18C6 | | | | |
| H ₂ O | 0.097 | 0.52 | 1.89 | 18 |
| MeOH | 0.18 | 0.96 | 1.83 | 8.6 |
| MeCN | 0.65 | 3.44 | 1.90 | 1.0 |
| THF | 0.31 | 1.69 | 1.81 | 4.1 |
| Et ₂ O | 0.02 | 0.13 | 1.55 | 75 |
| Bu ₂ O | 0.014 | 0.08 | 1.66 | 117 |

A.4.3.- Estudios Mediante Espectroscopía UV/Vis para FenxAT₂15C5, FenxA15C5 y FenxA18C6 en Presencia de Distintos Cationes.

A.4.3.a) *Estudios con FenxAT₂15C5.*

Teniendo en cuenta que el oxígeno del grupo carbonilo a través del cual tiene lugar la protonación¹² (y previsiblemente por tanto, la coordinación de cationes) es un átomo de carácter duro, se piensa que la introducción de un ligando con átomos blandos como el azufre permitiría la coordinación preferente de cationes de carácter más blando como el mercurio (II) a través de la posición electrón dadora del cromóforo. La determinación de mercurio en agua es de una gran importancia, debido a la elevada toxicidad de este elemento. A pesar de su toxicidad, el mercurio y sus sales son empleados en un número elevado de productos y procesos industriales. Por ejemplo, los compuestos inorgánicos de mercurio se pueden encontrar en equipos eléctricos, catalizadores, pinturas o como subproductos de la industria minera. Un aspecto importante en el tratamiento de este contaminante es el desarrollo y mejora de nuevos métodos de detección de mercurio aplicables en un amplio rango de entornos diferentes. Una ventaja de los derivados de fenoxazinona es que son solubles en agua, por lo que permiten llevar a cabo estudios en el medio en el que normalmente interesa llevar a cabo la determinación.

En primer lugar, se procede a estudiar la respuesta del compuesto modelo, **FenxDMA** en presencia de Hg²⁺ y H⁺ para comprobar que, efectivamente, la coordinación tanto de cationes como la protonación tienen lugar a través del grupo carbonilo. Tal y como se aprecia en la Fig. III.A.19, la adición de mercurio causa un desplazamiento batocrómico de la banda de absorción lo que confirma la coordinación del catión a través del grupo electrón aceptor del cromóforo. La adición de HClO₄ induce un cambio similar, y en ambos casos, se produce una desactivación de la fluorescencia prácticamente total.

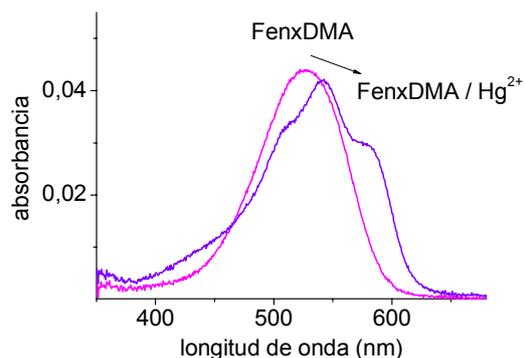


Fig. III.A.19. Espectros de absorción para **FenxDMA** ($c = 2 \times 10^{-6}$ M) (—) y **FenxDMA-Hg²⁺** (—) en acetonitrilo.

La adición de otros cationes como Zn^{2+} (ver Tabla III.A.8) o Ca^{2+} (ver Fig. III.A.29) en acetonitrilo también causa en un desplazamiento hacia el rojo. Los desplazamientos batocrómicos indican un aumento en la fuerza electrón aceptora debido a la interacción de un catión con el grupo carbonilo. Es más, además de aparecer a mayores longitudes de onda, la absorción en presencia de cationes es significativamente más estructurada, sugiriendo que la interacción de especies electrofílicas con el aceptor cambian el carácter del colorante de menos a más polimetínico. Cuando dichos complejos formados a través del grupo aceptor en cromóforos de carácter CT son excitados, el aumento de la densidad de carga en el grupo aceptor de la molécula produce un reforzamiento del enlace coordinativo. Por tanto, si la especie enlazada es un ion de un metal de transición, generalmente tiene lugar una desactivación de la fluorescencia debido a una transferencia electrónica, transferencia de energía o a un aumento del acoplamiento espín-órbita. De acuerdo con esto, **FenxDMA-Hg²⁺** apenas muestra fluorescencia.

En segundo lugar, se procede al estudio del sistema **FenxAT₂15C5**, con el receptor macrocíclico en la posición 7. Se obtiene entonces la respuesta deseada cuando se añade Hg^{2+} a una disolución de este ligando en acetonitrilo. La banda de absorción muestra un desplazamiento hipso- e hipocrómico ($\lambda_{\text{abs}}(\text{FenxAT}_2\text{15C5}) = 527$ nm y $\lambda_{\text{abs}}(\text{FenxAT}_2\text{15C5-Hg}^{2+}) = 446$ nm) tal y como se muestra en la Fig. III.A.21. Este cambio de color de rosa a amarillo claramente indica la coordinación de Hg^{2+} en la subunidad macrocíclica. La pérdida de conjugación debida a la abstracción del par electrónico en la posición 7 es consistente con el paso de **FenxAT₂15C5** a **FenxH** (ver Fig. III.A.20, donde los espectros de ambas especies, el complejo **FenxAT₂15C5-Hg²⁺** y **FenxH** prácticamente se superponen). Mientras que ahora Hg^{2+} coordina en el macrociclo, el resto de especies potencialmente

interferentes todavía prefieren el grupo carbonilo tal y como ocurre con **FenxDMA** (ver por ejemplo el Zn^{2+} en la Tabla III.A.8).

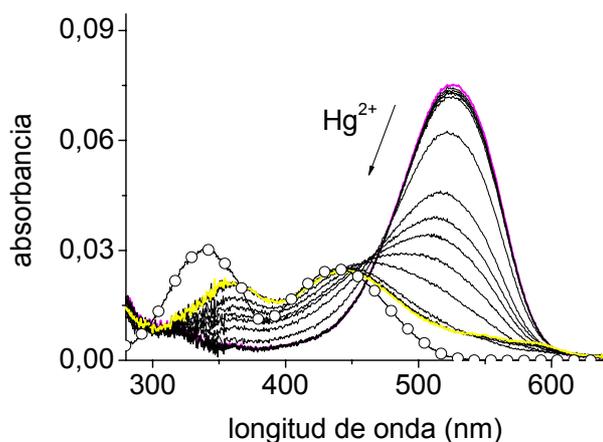


Fig. III.A.20. a) Espectros de absorción para una valoración de **FenxAT₂15C5** ($c = 2.0 \times 10^{-6}$ M) con $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$ en MeCN (—), en color rosa el ligando libre y en amarillo tras la adición de 10 equivalentes de Hg^{2+} , y comparación con **FenxH** en el mismo disolvente (—o—o).

La constante de estabilidad del proceso de coordinación del Hg^{2+} en MeCN es demasiado elevada para permitir llevar a cabo un ajuste fiable mediante los métodos espectroscópicos de absorción UV/Vis aquí empleados. Además en este caso los datos no parecen ajustarse a complejos de una estequiometría 1:1 clara, algo que se refleja en la ausencia de un punto isobéptico⁵⁶ bien definido en los espectros de la Fig. III.A.20 y además en la aparición de un pequeño hombro sobre 585 nm, que podría ser indicativo de una la coordinación parcial a través del grupo carbonilo tras la adición de un exceso de Hg^{2+} . Esto sugiere, que a pesar de que la mayoría del Hg^{2+} coordina a través del macrociclo, tal y como se indica por los cambios de color, también puede coordinar parcialmente a través del grupo C=O.

El empleo de la subunidad de fenoxazinona garantiza una suficiente solubilidad en agua. Esto, junto con la elevada interacción del receptor con Hg^{2+} (que podría ayudar a vencer la solvatación competitiva del agua) lleva a pensar que la determinación de Hg^{2+} en este disolvente sería posible. El siguiente paso por tanto es el estudio de la aplicabilidad del sensor en medio acuoso.

⁵⁶ El *punto isobéptico* se define como la longitud de onda de intersección de los espectros de absorción de dos especies. Es la longitud de onda en la que la absorbancia total de una muestra no varía durante una reacción química o un cambio físico de la muestra. La aparición de un punto isobéptico durante una reacción química es una evidencia de que únicamente hay dos especies presentes en una concentración total constante.

A pesar de que al cambiar a agua se reduce sustancialmente el rendimiento cuántico de fluorescencia ($\Phi_f = 0.08$ para **FenxAT₂15C5**), éste sigue siendo todavía razonablemente elevado. Además, el coeficiente de absorción molar es importante ($4.2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 585 nm para **FenxAT₂15C5** en agua). En la Fig. III.A.21 se muestran los resultados para el calibrado en agua bidestilada del sistema **FenxAT₂15C5**– Hg^{2+} . Se observa un desplazamiento hipsocrómico (de 585 a 476 nm) con una disminución en el coeficiente de absorción molar de unas 4 veces (para **FenxAT₂15C5**– Hg^{2+} $\epsilon = 9.7 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, a 476 nm).

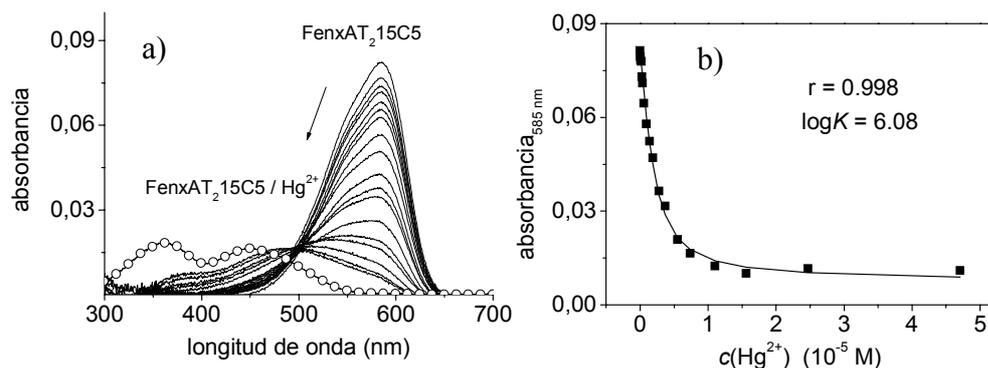


Fig. III.A.21. a) (—) Espectros de absorción para una valoración de **FenxAT₂15C5** con $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$ en agua bidestilada y (—○—○) comparación con **FenxH** en el mismo disolvente; b) curva de calibrado donde se representa la variación de la absorbancia a 585 nm para la misma valoración con Hg^{2+} . La línea continua representa el ajuste para el cálculo de $\log K$ a partir de la ecuación para complejos 1:1.

Además de por el desplazamiento batocrómico de la banda de absorción, la coordinación exclusiva de Hg^{2+} en el macrociclo es también indicada por dos hechos:

(i) en este caso la constante de enlace sí que sigue un modelo de estequiometría estrictamente 1:1, por tanto se pudo calcular la constante de estabilidad a partir de la ecuación (1) empleada para complejos 1:1,⁵⁷ resultando en un $\log K = 6.08 \pm 0.04$ (Fig. III.A.21 b)).

⁵⁷ J. Bourson, J. Pouget, B. Valeur, *J. Phys. Chem.*, **1993**, *97*, 4552.

$$A = A_0 + \frac{[A_{LM} - A_L]}{2c_0} \left[c_0 + c_M + \frac{1}{K} - \left[\left(c_0 + c_M + \frac{1}{K} \right)^2 - 4c_0c_M \right]^{1/2} \right] \quad (1)$$

En la ecuación (1) A representa la densidad óptica leída para cada punto del calibrado (en el caso de la Fig. III.A.21, a 585 nm) y A_L y A_{LM} las intensidades de la disolución del ligando en ausencia de catión metálico y con un exceso del catión (valor límite), respectivamente. c_0 es la concentración de ligando (mol L^{-1}) y c_M es la concentración del catión añadida (mol L^{-1}).

(ii) el complejo sigue siendo emisoro en agua (Fig. III.A.22), concebible con la descoordinación del catión en el estado excitado, frecuentemente observada para sondas con un grupo dador como centro de enlace (ver Fig. III.A.23)⁵⁸

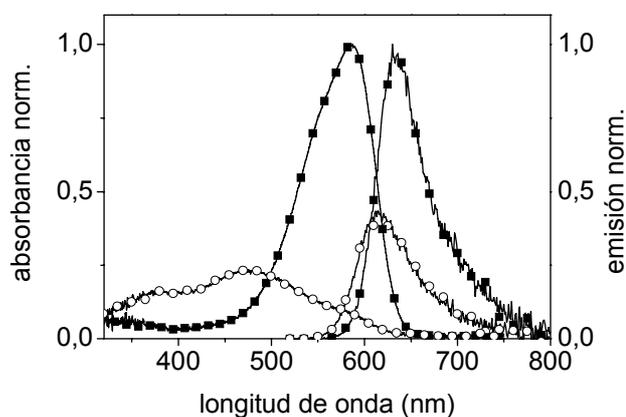


Fig. III.A.22. Espectros de absorción y emisión ($\lambda_{\text{exc}} = 500 \text{ nm}$) para (■) **FenxAT₂15C5** ($c = 2 \times 10^{-6} \text{ M}$) y (○) **FenxAT₂15C5** con 10 equivalentes de Hg^{2+} en agua.

⁵⁸ W. Rettig, K. Rurack, M. Sczegan, *New Trends in Fluorescence Spectroscopy: Applications to Chemical and Life Sciences*; Ed. B. Valeur, J. C. Brochon, Springer: Berlin, 2001; págs. 125–155.

La desactivación parcial de la fluorescencia en presencia de un exceso de Hg^{2+} puede explicarse por una descoordinación parcial del catión en el complejo excitado. Esta descoordinación reduce el acoplamiento espín-órbita que suele ser el responsable de la desactivación de la fluorescencia por la coordinación de Hg^{2+} .⁵⁹ Como en la mayoría de sondas CT, la excitación está conectada con un desplazamiento significativo de la carga. Como consecuencia de la proximidad con el grupo dador tipo catión radical, el ion metálico positivamente cargado experimenta una repulsión electrostática, de manera que el complejo inicial excitado sufre una “disociación interna parcial” ultrarrápida en la escala de sub-picosegundos, causando un desplazamiento hacia el azul del espectro de emisión mucho menor en comparación con el espectro de absorción. Esta disociación no es total y el catión sigue residiendo en el anillo macrocíclico.⁶⁰ Como consecuencia se forma un par cromóforo-catión separado por el disolvente (ver Fig. III.A.23).

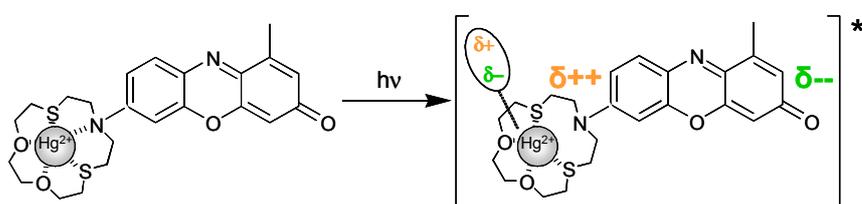


Fig. III.A.23. Esquema representativo, en el caso concreto de **FenxAT₂15C5**- Hg^{2+} , del proceso de descoordinación parcial en el estado excitado como consecuencia de la CT.

En la Tabla III.A.8 se muestran algunos datos espectroscópicos (longitudes de onda de absorción y emisión, rendimientos cuánticos y tiempos de vida) para **FenxAT₂15C5** y el compuesto modelo **FenxDMA** y los correspondientes complejos con Hg^{2+} y Zn^{2+} por comparación en actetonitrilo y agua.

⁵⁹ K. Rurack, *Spectrochim. Acta Part A*, **2001**, 57, 2161.

⁶⁰ a) P. Dumon, G. Jonusaucas, F. Dupuy, Ph. Pée, C. Rullière, J.-F. Letard, R. Lapouyade, *J. Phys. Chem.*, **1994**, 98, 10391 ; b) M. M. Martin, P. Plaza, N. Dai Hung, Y. H. Meyer, J. Bourson, B. Valeur, *Chem. Phys. Lett.*, **1993**, 202, 425.

Tabla III.A.8. Datos espectroscópicos para **FenxDMA** y **FenxAT₂15C5** y tras la adición de Hg^{2+} y Zn^{2+} en agua y acetonitrilo.

| | Disolvente | λ_{abs} (nm) | λ_{em} (nm) | Φ_f | τ_f (ns) |
|---|------------------|-----------------------------|----------------------------|----------|------------------------|
| FenxDMA | MeCN | 527 | 608 | 0.67 | 3.80 |
| FenxAT₂15C5 | MeCN | 527 | 610 | 0.63 | 3.50 |
| FenxDMA–Hg²⁺ | MeCN | 543(583) ^a | D ^b | D | n.d. ^c |
| FenxAT₂15C5–Hg²⁺ | MeCN | 446 | D | D | n.d. |
| FenxDMA–Zn²⁺ | MeCN | 538(588) | 610 | n.d. | n.d. |
| FenxAT₂15C5–Zn²⁺ | MeCN | 531(597) | 613 | n.d. | n.d. |
| FenxDMA | H ₂ O | 594 | 636 | 0.05 | 0.34 |
| FenxAT₂15C5 | H ₂ O | 585 | 635 | 0.08 | 0.47 |
| FenxAT₂15C5–Hg²⁺ | H ₂ O | 476 | 615 | 0.04 | 0.24,0.91 ^d |

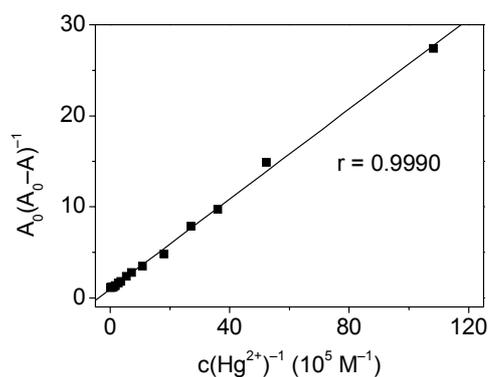
^a Entre paréntesis se indica la posición del hombro de la banda estructurada.

^b La emisión está fuertemente desactivada y la intensidad es prácticamente nula.

^c No determinado.

^d Amplitud relativa de los dos valores es 0.6 y 0.4, respectivamente.

Aplicabilidad del Sensor.



Pensando en una aplicación más analítica, se puede incluso obtener una buena correlación lineal representando $A_0/(A_0-A)$ vs. la inversa de la concentración de Hg^{2+} añadido.^{41f}

Fig. III.A.24. Calibrado para una valoración de **FenxAT₂15C5** ($c = 2 \times 10^{-6}$ M) con $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$ en agua. La línea continua muestra el ajuste lineal de los puntos.

Con las concentraciones de fluoroionóforo empleadas en los estudios ($c = 2 \times 10^{-6}$ M), el catión Hg^{2+} puede ser detectado en una concentración de hasta 10^{-7} M, es decir, al nivel de ppb.

Valoración en función del pH. La valoración llevada a cabo con **FenxAT₂15C5** en agua con HClO_4 mediante la medida de la variación de la intensidad de fluorescencia revela que en el intervalo de pH de 4 a 8 la protonación del sensor no tiene lugar, por lo que se puede trabajar seguro en este intervalo de pH (ver Fig. III.A.5). La adición del ácido causa una disminución de la fluorescencia como consecuencia de la protonación del grupo carbonilo hasta valores de emisión muy bajos, con una disminución en la intensidad de unas 20 veces al pasar de pH 7 a pH 0.5.

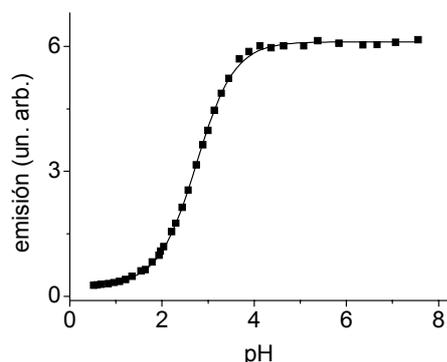


Fig. III.A.25. Valoración por fluorescencia de **FenxAT₂15C5** ($c = 2 \times 10^{-6}$ M) en función del pH ($\lambda_{\text{exc}} = 535$ nm). No se incluyen puntos a $\text{pH} > 8$ porque se observa la precipitación del ligando a pH básico.

A partir del punto de inflexión de la curva de la Fig. III.A.25 se puede estimar el pK_a del ligando en 2.75. Los cambios espectroscópicos inducidos por los protones tan sólo tienen lugar por tanto a $\text{pH} < 3.5$.

Estabilidad de las Disoluciones de FenxAT₂15C5. Las disoluciones en acetonitrilo y agua del ligando son estables durante el tiempo suficiente y la respuesta del sensor reproducible durante un periodo de varios días. Sin embargo, al cabo de varias semanas de uso de las disoluciones stock la respuesta del sensor empeora sensiblemente. Al intentar reproducir el calibrado con Hg^{2+} al cabo de un mes la sensibilidad de la respuesta del sensor disminuye y, aunque la intensidad de la banda de absorción decrece, ya no se observa la banda característica a 476 nm. Los espectros de absorción del ligando libre al cabo de un mes tampoco se corresponden con los mismos espectros para una disolución recién preparada del mismo (ver Fig. III.A.26). Esto no sucede en el caso del derivado dimetilamino

FenxDMA, y tampoco se observa si se tiene la precaución de burbujear con argón las disoluciones stock de **FenxAT₂15C5** tras su uso. Por estas razones se piensa que pueda ser debido a la oxidación de los grupos tioéter del macrociclo, lo que resulta en una menor interacción con el Hg^{2+} , por lo que se deja de observar la banda de absorción a menores longitudes de onda. Este problema se evita manteniendo las disoluciones stock bajo argón.

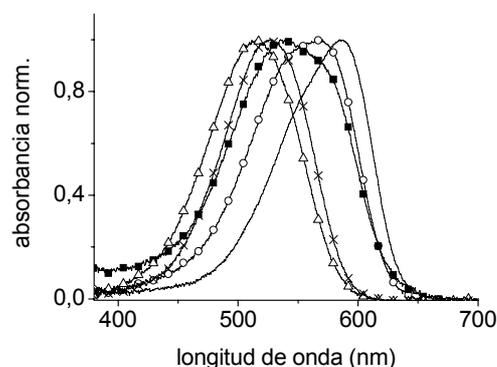


Fig. III.A.26. Comparación de los espectros de absorción (normalizados a 1) para el ligando **FenxAT₂15C5** ($c = 2 \times 10^{-6}$ M) en función del tiempo. Disolución recién preparada (—) y al cabo de un mes (○) en agua bidestilada, y disolución de un mes de antigüedad en agua bidestilada tras la adición de Hg^{2+} (10^{-5} M) (■); disolución nueva de **FenxAT₂15C5** (X) y al cabo de un mes (Δ) en acetonitrilo.

Reversibilidad. La formación del complejo puede ser modulada por la acidificación/neutralización de la disolución acuosa mediante el empleo de HCl y NaOH.

Estudios Competitivos. Se llevaron a cabo estudios competitivos mediante espectroscopía de UV/Vis para varios cationes metálicos, tales como Zn^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Cr^{3+} y Pb^{2+} , así como para los aniones que más frecuentemente se suelen encontrar en muestras acuosas como son NO_3^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} y CO_3^{2-} (el anión Cl^- no interfiere, lo que permite realizar los estudios de reversibilidad descritos anteriormente).

Se realizaron dos series de experimentos cuyo procedimiento se explica a continuación. En una primera serie, el complejo **FenxAT₂15C5**– Hg^{2+} se somete a una valoración en cinco pasos con una disolución conteniendo las especies potencialmente interferentes. Los cationes metálicos se añadieron en una concentración de hasta $20 \mu\text{M}$ y los aniones hasta 2 mM . La segunda serie de experimentos se llevó a cabo de manera inversa, es decir, los cationes y los aniones se añadieron en concentraciones de $20 \mu\text{M}$ y de 2 mM a una disolución de **FenxAT₂15C5**, tras lo cual se llevó a cabo una valoración en cinco pasos con una disolución stock de Hg^{2+} ($c_{\text{FenxAT}_2,15\text{C5}} = 2 \times 10^{-6} \text{ M}$ para todos los experimentos). En la Tabla III.A.9 se muestra la relación entre la intensidad de absorción a una

longitud de onda próxima a la del complejo (470 nm) antes y después de cada experimento.

Tabla III.A.9. Resultados de los experimentos de competición con algunos iones potencialmente interferentes en agua.

| serie | especies competidoras | | | | | | | | | |
|----------------|-----------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | – ^c | Zn ²⁺ | Cd ²⁺ | Cu ²⁺ | Cr ³⁺ | Pb ²⁺ | NO ₃ ⁻ | SO ₄ ²⁻ | PO ₄ ³⁻ | CO ₃ ²⁻ |
| 1 ^a | 1.00 | 1.00 | 1.01 | 1.03 | 1.03 | 1.00 | 1.00 | 1.01 | 0.99 | 1.02 |
| 2 ^b | 0.26 | 0.25 | 0.28 | 0.27 | 0.24 | 0.26 | 0.26 | 0.24 | 0.25 | 0.25 |

^aRelación de absorción a 470 nm antes y después de la adición completa del interferente.

^bRelación de absorbancia a 470 nm antes y después de la adición completa de Hg²⁺.

^cErrores relativos determinados a partir de ocho experimentos en agua: ± 0.02 .

En el caso de la serie 1, donde el complejo se forma antes de la adición de otras especies, la absorción debería de permanecer inalterada tras la valoración cuando no hay interferencia, es decir, la relación se ha de mantener en 1. Para la segunda serie, cuando el interferente potencial se añade al ligando libre (sin la observación de ningún cambio de las características espectrales para los iones de la Tabla III.A.9), el máximo cambio posible se representa por el valor de 0.26, obtenido de la valoración de **FenxAT₂15C5** con Hg²⁺ en ausencia de cualquiera de las otras especies. Por tanto, cuando tiene lugar una reacción competitiva, este valor debería de ser mayor a 0.26. Tal y como se muestra en la Tabla III.A.9, no se encontró ninguna interferencia significativa en ninguno de los casos. La única excepción fue un 50 % de disminución de la banda de absorción a 585 nm tras la adición de Ag⁺ (catión metálico de carácter ácido blando que al igual que el mercurio presenta una gran afinidad por ligandos que contienen grupos azufre) en una concentración de 10 μ M. Sin embargo la nueva banda desplazada al azul característica del complejo con Hg²⁺ no aparece en este caso, por lo que no es una interferencia significativa.

No sólo la importancia de que la mayoría de cationes potencialmente interferentes prefieren el carbonilo como posición de coordinación en disolventes apróticos como el acetonitrilo, si no que en agua la coordinación a través del C=O no es suficientemente fuerte, de manera que esta posición no es susceptible de coordinar cationes en medio acuoso. Además, mediante la monitorización de la banda en el UV del grupo anilino del receptor **PhAT₂15C5** (ver Fig. III.A.27) se aprecia cómo en medio acuoso tan sólo el Hg²⁺ forma un complejo con este

ligando (la disminución de la intensidad de la banda indica la abstracción del par electrónico del N por la coordinación del catión). Por ejemplo, la coordinación del Zn^{2+} no induce ningún cambio, ni si quiera en acetonitrilo. En el caso de Cu^{2+} aunque disminuye la intensidad de la banda UV en acetonitrilo, no se aprecia la interacción con el ligando en agua.

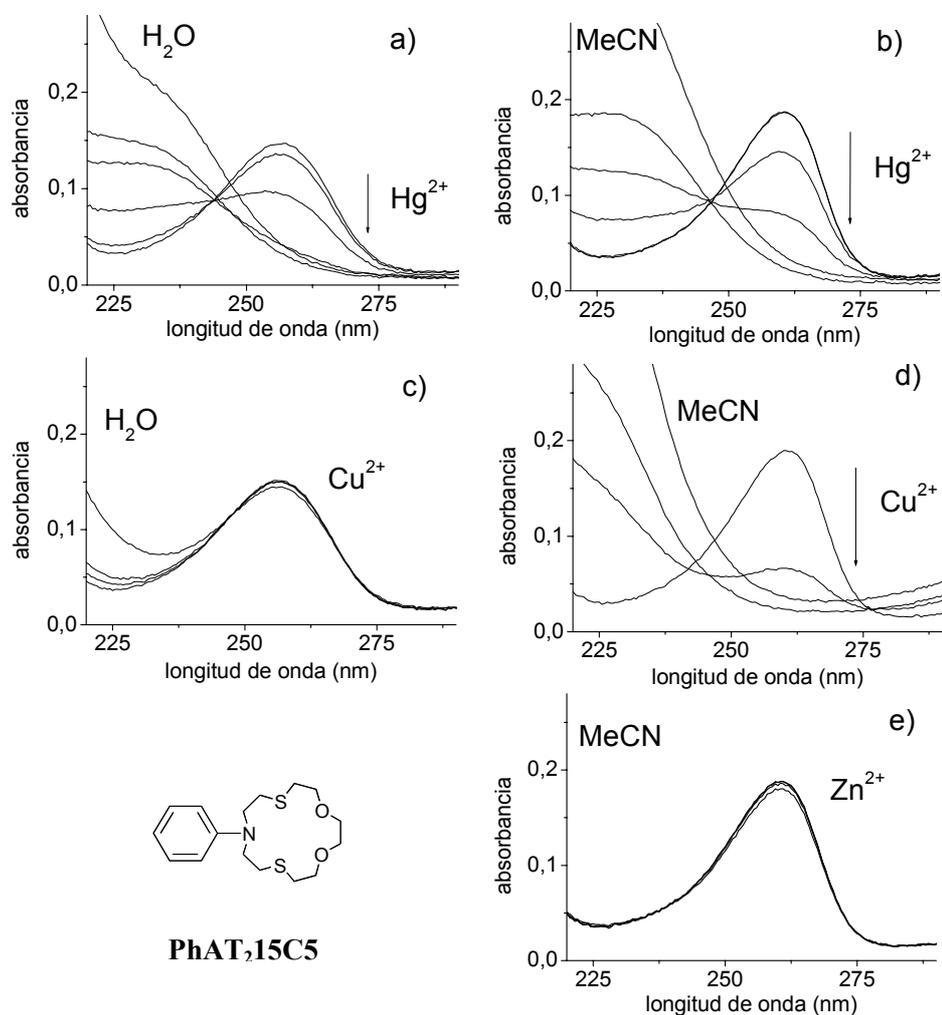


Fig. III.A.27. Espectros de absorción en H_2O y MeCN para el ligando **PhAT_{215C5}** (10^{-5} M) y tras la adición de cantidades crecientes de distintos cationes metálicos ($c(\text{M}^{2+})/c(\text{L}) = 0.1, 0.5, 1.0, 2.0$ y 10 para a) y b), y $1.0, 2.0$ y 10 para c), d) y e)).

A pesar de que se ha dedicado un esfuerzo considerable al diseño de nuevos fluoróionoforos para Hg^{2+} –también se han descrito algunos ejemplos únicamente por cambio de color⁶¹–, muchos de estos sensores químicos moleculares muestran limitaciones, tales como la interferencia de otros cationes metálicos,⁶² necesidad de trabajar con disolventes orgánicos^{63b,41e-f} o mezclas de disolventes orgánicos–agua^{41c,63} por la baja o nula solubilidad en agua o la incapacidad del ligando por competir con la solvatación del catión. Recientemente se han descrito fluoróionoforos que son capaces de detectar Hg^{2+} selectivamente en agua con muy buenos límites de detección, además por un aumento de la fluorescencia producido por la inhibición del proceso no radiativo de ET a causa de la coordinación con el catión, que siempre es preferible para una mejor diferenciación de la señal espectroscópica y la minimización de “falsos positivos”.^{41h,64} Así por ejemplo en el trabajo de Nolan y Lippard se describe el empleo de un derivado de fluoresceína que absorbe a 505 nm y emite a 524 nm. El sensor descrito por Guo et al. presenta el máximo de emisión a 548 nm. Sin embargo, debido al carácter ET de estos fluoróforos apenas se producen desplazamientos en las bandas de absorción y emisión y sólo hay cambios en la intensidad de fluorescencia. Además la amina implicada en el proceso ET es sensible a los cambios de pH ($\text{pK}_a = 7.1$ y 5.2 respectivamente, aunque es posible tamponar las disoluciones).

En conclusión, **FenxAT₂15C5** es uno de los pocos sensores moleculares capaces de detectar selectivamente Hg^{2+} en el intervalo de ppb en agua mediante el empleo de medidas bien de absorción (con el máximo centrado por encima de lo 500 nm), bien de emisión (más allá de los 600 nm), con un cambio de color fácilmente apreciable a simple vista. No interfiere la protonación/desprotonación del cromóforo a pH neutro y además, es el único sensor ditópico capaz de

⁶¹ a) O. Brummer, J. J. La Clair, K. D. Janda, *Org. Lett.*, **1999**, *1*, 415 ; b) F. Sancenón, R. Martínez-Mañez, J. Soto, *Chem. Commun.*, **2001**, 2262; c) F. Sancenón, R. Martínez-Mañez, J. Soto, *Tetrahedron Lett.*, **2001**, *42*, 4321; d) D. Jiménez, R. Martínez-Mañez, F. Sancenón, J. Soto, *Tetrahedron Lett.*, **2004**, *45*, 1257.

⁶² a) J. Yoon, N. E. Ohler, D. H. Vance, W. D. Aumiller, A. W. Czarnik, *Tetrahedron Lett.*, **1997**, *38*, 3845 ; b) R. S. Addleman, J. Bennett, S. H. Tweedy, S. Elshani, C. M. Wai, *Talanta*, **1998**, *46*, 573.

⁶³ a) H. Sakamoto, J. Ishikawa, S. Nakao, H. Wada, *Chem. Commun.*, **2000**, 2395; b) L. Prodi, C. Bargossi, M. Montalti, N. Zaccheroni, N. Su, J. S. Bradshaw, R. M. Izzat, P. B. Savage, *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, *122*, 6769; c) S. Y. Moon, N. R. Cha, Y. H. Kim, S.-K. Chang, *J. Org. Chem.*, **2004**, *69*, 181; d) J. V. Ros-Lis, R. Martínez-Mañez, K. Rurack, F. Sancenón, J. Soto, M. Spieles, *Inorg. Chem.*, **2004**, *43*, 5183.

⁶⁴ X. Guo, X. Qian, L. Jia, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 2272.

coordinar selectivamente a un catión en una de las posiciones, mientras que el resto de especies potencialmente interferentes presentan una preferencia por la coordinación en otra posición diferente de la molécula, lo que resulta en una respuesta espectroscópica diferente.

A.4.3.b) *Estudios con FenxA15C5.*

Como este tipo de ligando macrocíclico aza-tetraoxa ha demostrado poseer mayores constantes de estabilidad para Ca^{2+} en acetonitrilo que el resto de cationes alcalinos y alcalinotérreos (por ejemplo, en la referencia 41(f) $\log K = 4.89$ para un derivado de pirazolina funcionalizado con **A15C5** y en 42(b) $\log K = 4.40$ para un derivado del colorante BDP en acetonitrilo) se evalúa la respuesta para este catión.

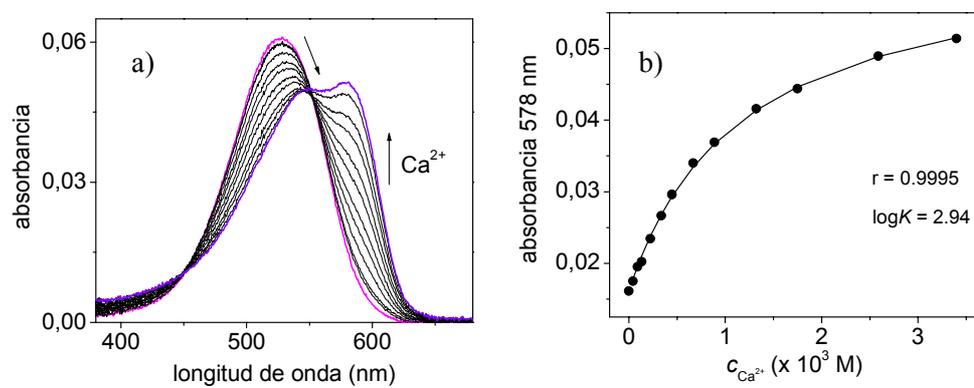


Fig. III.A.28. a) Espectros de absorción para una valoración de **FenxA15C5** ($c = 2.0 \times 10^{-6}$ M) con $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$ en MeCN y b) calibrado correspondiente en el que se representa la absorbancia leída a 578 nm frente a la concentración de Ca^{2+} añadida. La línea continua muestra el ajuste para la determinación de la constante de estabilidad.

Sorprendentemente, en este caso y a pesar de la introducción de un grupo receptor en la posición 7 de la fenoxazinona que presenta una gran afinidad por Ca^{2+} , la coordinación del catión en acetonitrilo causa un desplazamiento batocrómico (de 528 nm para **FenxA15C5** a 578 nm para el complejo) como corresponde a la coordinación a través del grupo carbonilo, en lugar del cambio de color de rosa a amarillo que cabía esperar por la coordinación a través del macrociclo (ver Fig. III.A.28).

Por comparación, se realiza la misma medida con el compuesto modelo **FenxDMA**, obteniendo el mismo desplazamiento batocrómico (de 528 nm para **FenxDMA** a 581 nm para **FenxDMA-Ca²⁺**) y una constante de estabilidad prácticamente idéntica ($\log K = 2.94$ para **FenxA15C5-Ca²⁺** y 2.89 para **FenxDMA-Ca²⁺**).

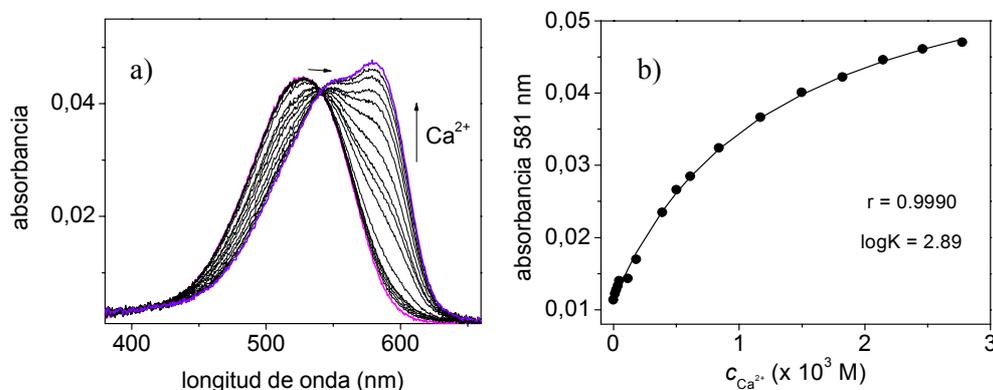


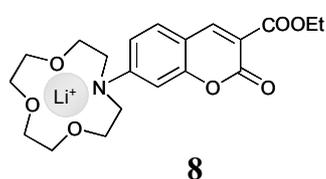
Fig. III.A.29. a) Espectros de absorción para una valoración de **FenxDMA** ($c = 2.0 \times 10^{-6}$ M) con $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$ en MeCN y b) calibrado correspondiente en el que se representa la absorbancia leída a 581 nm frente a la concentración de Ca^{2+} añadida. La línea continua muestra el ajuste para la determinación de la constante de estabilidad.



Cabe resaltar que en el caso del derivado análogo del azul de fenol funcionalizado con el macrociclo **A15C5** a través del nitrógeno que actúa como electrón dador (**6**), descrito por Dix y Vögtle en 1981,⁶⁵ sí que se observa el desplazamiento hipsocrómico esperado. Estudios en acetonitrilo para este ligando con distintos cationes alcalinos y alcalinotérreos muestran un desplazamiento hacia el azul con una disminución en la intensidad de la banda de absorción, que es mayor en el caso del Ca^{2+} (de 585 nm para el ligando libre a 485 nm para el complejo) como es de esperar para este tipo de macrociclos. En el caso de la

⁶⁵ J. P. Dix, F. Vögtle, *Chem. Ber.*, **1981**, 114, 638.

introducción del receptor en las proximidades del carbonilo (compuesto 7), de manera que la coordinación del catión se vea favorecida en esta posición, se observa exactamente el efecto contrario, que es el esperado cuando la coordinación de un catión tiene lugar a través del grupo electrón aceptor, un desplazamiento batocrómico (de 590 nm para el ligando libre a 668 nm para el complejo con Ca^{2+}), con un aumento en el coeficiente de absorción molar.



O este otro ejemplo de una cumarina con el receptor en D.⁶⁶ En acetonitrilo el compuesto **8** absorbe a 412 nm y emite a 466 nm con un coeficiente de absorción molar de $59.0 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y un Φ_f de 0.12. La coordinación de Li^+ causa un desplazamiento de la absorción a 324 nm, una disminución del coeficiente de absorción molar (a $4.6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y una desactivación de la fluorescencia.

A.4.3.c) Estudios con FenxA18C6.

Este fluoroionóforo con un receptor macrocíclico de mayor tamaño y con un mayor número de oxígenos, **A18C6**, en principio debería dar una interacción importante con Ba^{2+} a través de la posición 7, y con este objetivo fue diseñado el cromóforo. En la Tabla III.A.10 se muestra el valor del radio iónico y tamaño aproximado de la cavidad macrocíclica para varios cationes alcalinotérreos.

Tabla III.A.10. Valores de diámetro iónico para algunos cationes alcalinotérreos y del tamaño de la cavidad macrocíclica para **A15C5** y **A18C6**.

| Catión | Mg^{2+} | Ca^{2+} | Sr^{2+} | Ba^{2+} |
|--|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Diámetro Catión (Å) ^a | 1.44 | 2.12 | 2.52 | 2.94 |
| Macrociclo | A15C5 | | A18C6 | |
| Diámetro de la Cavidad (Å) ^a | 1.7-1.8 | | 2.6-3.2 | |

^a Valores tomados de la ref. 42b y de H. K. Frensdorff, *J. Am. Chem. Soc.*, **1971**, 93, 600.

⁶⁶ C. Blackburn, M. Bai, K. A. LeCompte, M. E. Langmuir, *Tetrahedron Lett.*, **1994**, 35, 7915.

En efecto, en este caso la interacción sí que tiene lugar a través del grupo electrón dador tal y como se aprecia en la Fig. III.A.30. La adición de <100 equivalentes de Ba^{2+} en acetonitrilo induce un cambio en la banda de absorción similar al inducido por el Hg^{2+} en el caso de **FenxAT₂15C5**, lo que causa un cambio de color de rosa a amarillo. Se realizó un estudio similar para el resto de cationes alcalinos y alcalinotérreos más comunes (Li^+ , Na^+ , K^+ , Rb^+ , Cs^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} y Sr^{2+}). En el caso de los cationes alcalinos no se obtiene ninguna respuesta, incluso tras la adición de un exceso de 1000 equivalentes con respecto a **FenxA18C6**.

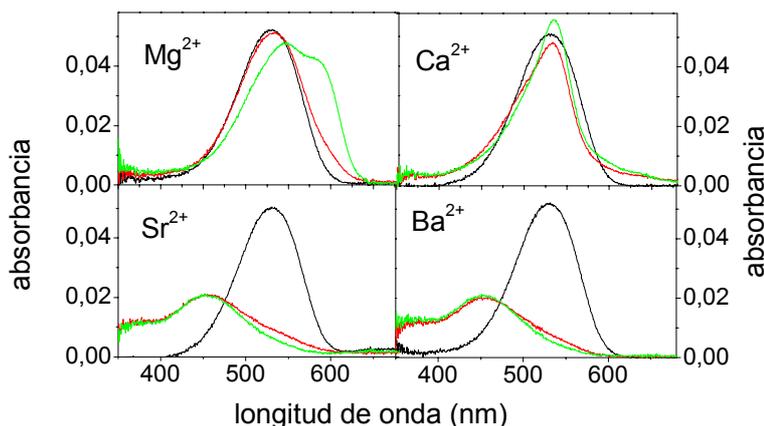


Fig. III.A.30. Espectros de absorción para **FenxA18C6** ($c = 2.0 \times 10^{-6}$ M) (—) y tras la adición de 100 (—) y 1000 (—) equivalentes de varias sales de cationes alcalinotérreos en acetonitrilo.

Los resultados para los cationes alcalinotérreos, se muestran en la Fig. III.A.30. Se observa un desplazamiento batocrómico en el caso de Mg^{2+} , mientras que para los cationes de mayor tamaño, Sr^{2+} y Ba^{2+} se produce un desplazamiento hacia menores longitudes de onda. Parece por tanto que la relación carga/radio del catión metálico influye de forma significativa en la coordinación a través del grupo electrón aceptor o dador, y por tanto en la respuesta del sensor. El tamaño de la cavidad macrocíclica y/o el carácter ácido duro/blando del catión parecen los factores determinantes para la diferencia observada. La mayor constante de estabilidad para los complejos con Ba^{2+} y Sr^{2+} se pone de manifiesto en el menor número de equivalentes necesarios para alcanzar la saturación en la respuesta (<100 equivalentes), mientras que la coordinación a través del carbonilo necesita más de 100 equivalentes del catión metálico (**FenxDMA**- Ca^{2+} , **FenxA15C5**- Ca^{2+}

y **FenxA18C6–Mg²⁺**) para inducir un cambio espectroscópico. Si bien todo esto son estudios preliminares, la aplicabilidad del sensor para la discriminación de cationes alcalinotérreos parece evidente.

A.5.- DETECCIÓN DE ANIONES.

Desde el punto de vista de una transducción eficiente del evento de enlace, uno de los mayores requisitos que debe cumplir una subunidad emisora es que la presencia de un sustrato sea indicada por un aumento en la emisión en lugar de una desactivación de la fluorescencia, lo que es ventajoso en términos de límite de detección, la relación señal-ruido y la medida del tiempo de vida de fluorescencia (que es específico para un cierto complejo).

Como hemos visto en el caso de los derivados **FenxDMA** y **FenxJulo**, parece que la disminución del carácter electrón dador del sustituyente en la posición 7 (julolidino > DMA) o la disminución de densidad electrónica producida por la coordinación de un catión (en el caso de los compuestos macrocíclicos **FenxAT₂15C5** y **FenxA18C6**) en esta posición inducen una disminución en la intensidad de fluorescencia así como desplazamientos hipsocrómicos, principalmente en la banda de absorción. Esto condujo a pensar que mediante la disminución de carácter electrón dador de D deprimiríamos las propiedades espectroscópicas favorables de las fenoxazinonas. Tras esto, la coordinación de una especie con una elevada densidad electrónica (un anión) en la posición 7 debería inducir cambios espectroscópicos favorables como el aumento de la fluorescencia y desplazamiento al rojo de la banda de absorción.

Con el objetivo de confirmar estas hipótesis, se sintetizaron los derivados **FenxNH₂** y **FenxAmd** en los que el carácter electrón dador del sustituyente disminuye sustancialmente (julolidino > DMA > NH₂ > NHCOCH₃), para evaluar en primer lugar la variación de las propiedades espectroscópicas al disminuir la disponibilidad del par electrónico del N en esta posición.

A.5.1.- Fuerza Electrón Dadora de D y Propiedades Espectroscópicas de las Fenoxazinonas.

La determinación de las longitudes de onda de absorción y emisión y los rendimientos cuánticos de fluorescencia se llevó a cabo de la misma manera que para **FenxDMA**. En la Tabla III.A.11 se presentan los resultados obtenidos.

Tabla III.A.11. Datos espectroscópicos para **FenxNH₂** y **FenxDMA** a 298 K.

| Disolvente | λ_{abs} (nm) | λ_{em} (nm) | $\Delta\tilde{\nu}_{\text{abs-em}}$ (cm ⁻¹) | Φ_f |
|---------------------------------|-----------------------------|----------------------------|---|----------|
| FenxNH₂ | | | | |
| H ₂ O | 559 | 593 | 1090 | 0.222 |
| MeOH | 530 | 587 | 1890 | 0.557 |
| DMSO | 529 | 597 | 2180 | 0.591 |
| MeCN | 498 | 579 | 2920 | 0.304 |
| CH ₂ Cl ₂ | 486 | 570 | 4060 | 0.105 |
| Et ₂ O | 489 | 568 | 2970 | 0.043 |
| FenxAmd | | | | |
| H ₂ O | 476 | 596 | 4290 | 0.007 |
| MeOH | 465 | 599 | 5200 | 0.018 |
| DMSO | 467 | 602 | 4900 | 0.004 |
| MeCN | 454 | 589 | 5260 | 0.003 |
| CH ₂ Cl ₂ | 456 | 590 | — | 0.002 |
| AcOEt | 452 | 579 | — | 0.001 |
| Et ₂ O | 449 | 576 | — | 0.001 |

Es evidente, a partir de los datos mostrados en la Tabla III.A.11 para **FenxNH₂** y **FenxAmd**, que la disminución de la fuerza electrón dadora del N causa un marcado desplazamiento al azul de los espectros de absorción, tal y como se muestra en la Fig. III.A.32 para un mismo disolvente. Este desplazamiento es menor en el caso de los espectros de emisión, lo que produce un aumento importante de los desplazamientos de Stokes al disminuir el carácter electrón dador. Lo que indica una mayor diferencia del momento dipolar entre el estado

fundamental y el primer estado excitado S_1 , en relación con la disminución del carácter polimetínico de los compuestos (ver Fig. III.A.34). Esto también se pone de manifiesto en el aumento gradual de la anchura de las bandas de absorción en un mismo disolvente a medida que disminuye la fuerza electrón dadora del N (por ejemplo, fwhm (en cm^{-1}) en H_2O = 3040, DMSO = 3240 y Et_2O = 3700 para **FenxNH₂**, mientras que fwhm (en cm^{-1}) en H_2O = 7820, DMSO = 6520, Et_2O = 7350 para **FenxAmd**, en ambos casos, mayores que para **FenxDMA**).

Al mismo tiempo, se observa un menor solvatocromismo en estos compuestos, es decir, una menor diferencia entre las posiciones de las bandas de absorción en disolventes de diferente polaridad. Por ejemplo, en el caso de DMSO y Et_2O , $\Delta\tilde{\nu}_{\text{abs}}(\text{Et}_2\text{O}-\text{DMSO}) = 1750 \text{ cm}^{-1}$ para **FenxDMA**, 1550 cm^{-1} para **FenxNH₂** y 860 cm^{-1} para **FenxAmd**. El menor carácter solvatocrómico parece indicar la disminución gradual del momento dipolar en la molécula.

La disminución de la fuerza electrón dadora también resulta en una disminución significativa del rendimiento cuántico de fluorescencia (por ejemplo, en MeCN, al pasar de **FenxJulo** a **FenxAmd** el Φ_f disminuye más de 250 veces).

Por todo esto, es de esperar que la coordinación de una especie rica en electrones (un anión) a través de la posición 7 en el caso de **FenxAmd**, produzca los cambios espectroscópicos favorables mencionados anteriormente (un aumento en la intensidad de fluorescencia y un desplazamiento batocrómico de la banda de absorción). Sin embargo, a pesar de que se han descrito ejemplos en la bibliografía del empleo de grupos amida como receptores para aniones por la posibilidad de formación de enlaces de hidrógeno, la interacción con los aniones es débil ya que los grupos amida únicamente poseen un punto de coordinación para el enlace de hidrógeno y es necesario emplear receptores con múltiples grupos amida.⁶⁷

Por esta razón, es más frecuente el empleo de derivados de urea en lugar de los grupos amida. Las (tio)ureas son compuestos con una capacidad dadora de enlaces de hidrógeno particularmente buena y además son capaces de formar complejos bidentados con aniones en forma de “Y”, como los carboxilatos (ver Fig. III.A.31),^{67a,68} de manera que las constantes de formación suelen ser considerablemente más elevadas que en el caso de los grupos amida. De hecho,

⁶⁷ a) P. D. Beer, P. A. Gale, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2001**, *40*, 486; b) P. Piateck, J. Jurczak, *Chem. Commun.*, **2002**, 2450.

⁶⁸ R. J. Fitzmaurice, G. M. Kyne, D. Douheret, J. D. Kilburn, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **2002**, 841.

este tipo de derivados ha sido ampliamente utilizado durante los últimos años para el diseño de cromó- fluoróforos para aniones.⁶⁹

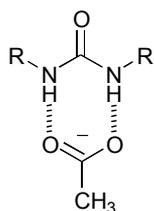
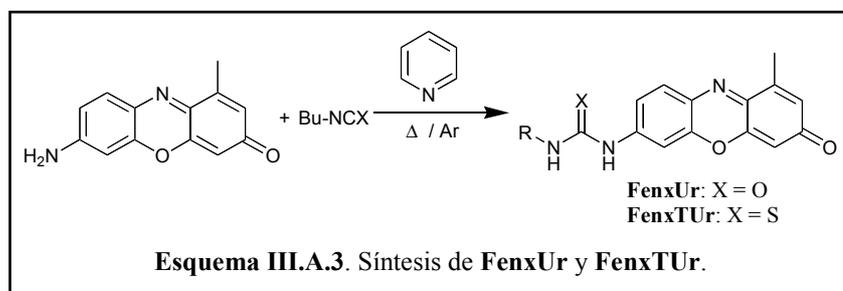


Fig. III.A.31. Representación de la coordinación a través de enlaces de hidrógeno del anión acetato con los grupos NH de un receptor urea.

Por todo ello, y con el objetivo de evaluar el efecto de la coordinación de aniones en las propiedades espectroscópicas de un derivado de fenoxazinona con un grupo D débil, se decide introducir un grupo urea en esta posición (**FenxUr**, ver Esquema III.A.3).

A.5.2.- Síntesis de Derivados de 7-aminofenoxazinona con Grupos Receptores para la Coordinación de Aniones.

Procedimiento general para la síntesis de los compuestos FenxUr y FenxTUR. Los derivados de urea y tiourea de la fenoxazinona se obtienen mediante reacción del isocianato o isotiocianato con **FenxNH₂** en piridina anhidra (Esquema III.A.3), de manera análoga a la descrita para **FenxAmd**. Debido a la pobre reactividad del grupo amino en **FenxNH₂** es necesario añadir el correspondiente isocianato o isotiocianato en un gran exceso (de hasta 30 equivalentes) y calentar la mezcla de reacción a 80 °C.



⁶⁹ R. Martínez-Mañez, F. Sancenón, *Chem. Rev.*, **2003**, *103*, 4419.

A.5.3.- Estudios Espectroscópicos para FenxUr.

En primer lugar se procede a la caracterización espectroscópica del cromóforo en distintos disolventes. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla III.A.12.

Tabla III.A.12. Datos espectroscópicos de **FenxUr** en varios disolventes a 298 K.

| Disolvente | λ_{abs} (nm) | λ_{em} (nm) | $\Delta\tilde{\nu}_{\text{abs-em}}$ (cm^{-1}) | Φ_f | τ_f (ns) | k_r (10^8 s^{-1}) | k_{nr} (10^8 s^{-1}) |
|-------------------|--------------------------------|-------------------------------|---|----------|------------------|------------------------------------|---------------------------------------|
| H ₂ O | 500 | 595 | 3330 | 0.008 | 0.14 | 0.55 | 71 |
| Glicerol | 500 | 592 | 3260 | 0.082 | 0.61 | 1.35 | 15 |
| Etilenglicol | 492 | 590 | 3440 | 0.065 | 0.46 | 1.41 | 20 |
| MeOH | 481 | 582 | 3740 | 0.065 | 0.46 | 1.42 | 20 |
| DMSO | 482 ^a | 595 | 4160 | 0.024 | 0.13 | 1.87 | 75 |
| MeCN | 467 | 589 | 4430 | 0.015 | 0.09 | 1.66 | 109 |
| Acetona | 468 | 588 | 4410 | 0.010 | 0.06 | 1.62 | 165 |
| Et ₂ O | 461 | 579 | 4670 | 0.001 | — | — | — |

^a $\epsilon_{\text{max}} = 13,460 \pm 280 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ obtenido a partir de $N = 8$ experimentos.

Observando las tendencias en las constantes de desactivación radiativa y no radiativa vemos que mientras que k_r es más o menos constante en los disolventes apróticos ($\sim 1.7 \pm 0.1 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$), este valor disminuye sustancialmente al aumentar la proticidad del disolvente, dando por ejemplo $k_r = 1.4 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$ en metanol y $k_r = 0.55 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$ en agua. Esto último indica que la naturaleza de las especies emisivas cambia en mayor medida en función de la proticidad del disolvente que de la polaridad. Por otro lado, en disolventes apróticos polares, k_{nr} aumenta significativamente al ir disminuyendo la polaridad (al igual que ocurría con **FenxDMA**) y aumenta de nuevo en agua, disolvente con una gran capacidad dadora de enlace de hidrógeno.

Aquí de nuevo el efecto de la viscosidad del disolvente en la emisión de fluorescencia es prácticamente nulo (Φ_f en MeOH = 0.065, en etilenglicol = 0.065 y en glicerol = 0.082) descartando por tanto también para **FenxUr** posibles movimientos intramoleculares (TICT) en el estado excitado.

En lo que respecta a los máximos de absorción y emisión, **FenxUr** está dentro de la tendencia esperada en relación a su fuerza electrón dadora (entre los valores de **FenxAmd** y **FenxNH₂**). Para una mejor comparación, en la Fig. III.A.32 se representan los espectros de absorción y emisión normalizados para D = NHC₂H₅, NHCONHBu, NH₂, DMA y julolidino en un mismo disolvente (acetonitrilo) en orden decreciente de la fuerza electrón dadora.

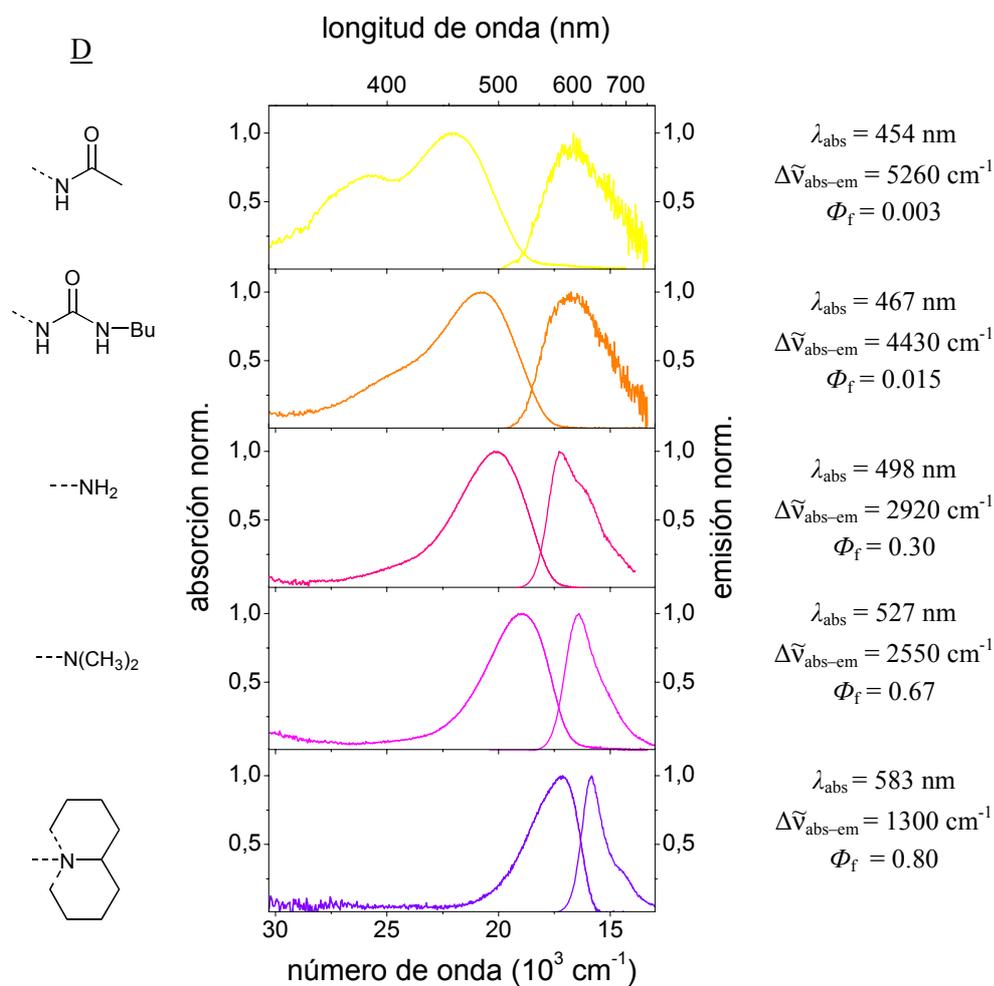


Fig. III.A.32. Espectros de absorción y emisión para **FenxAmd** (—), **FenxUr** (—), **FenxNH₂** (—), **FenxDMA** (—) y **FenxJulo** (—).

Las observaciones más destacables en la Fig. III.A.32 se enumeran a continuación:

- desplazamiento batocrómico de la absorción y en menor medida de la emisión (el desplazamiento de Stokes va disminuyendo),
- estrechamiento de las bandas, y
- un importante incremento del rendimiento cuántico (de **FenxAmd** a **FenxJulo** de > 250 veces), al aumentar la fuerza electrón dadora de D.

A partir de los datos en acetonitrilo, se puede establecer una correlación lineal entre el máximo de la banda de absorción y el logaritmo del rendimiento cuántico de fluorescencia (ver Fig. III.A.33) en función de la fuerza electrón dadora del sustituyente en posición 7 en base a la constante de Hammett (σ_p , para sustituyentes en posición *para*-),⁷⁰ valores tabulados en la referencia 70 (en el caso de R = NHCONHBu que no se incluye en estas tablas, se emplea el valor de σ_p correspondiente a NHCONHEt que es el R más similar encontrado). En las gráfica a) de la Fig. III.B.33 también se incluye la absorbancia para R = H (**FenxH**), pero no se incluyen los valores de rendimiento cuántico porque el tratamiento de los espectros de emisión de este compuesto es algo complejo.

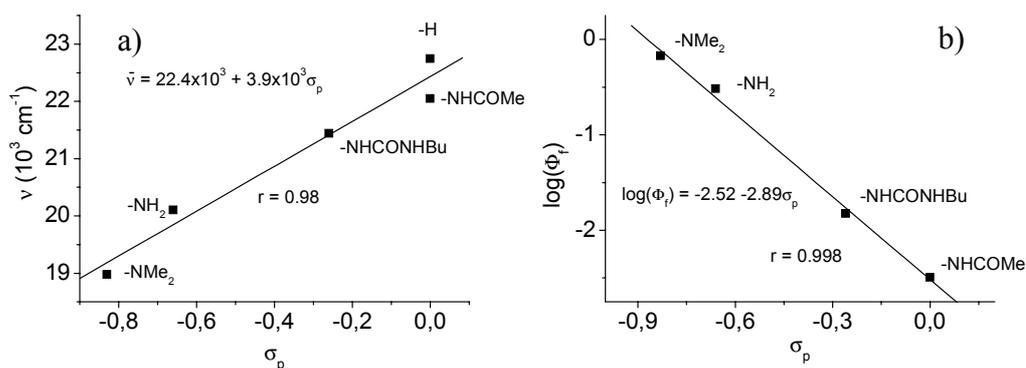


Fig. III.A.33. Representación de la variación del máximo de la banda de absorción (en número de onda a) y del $\log \Phi_f$ b) (datos en acetonitrilo) en función de la constante de Hammett.

⁷⁰ Las constantes de Hammett (σ) obtenidas a partir de la ionización de ácidos orgánicos en disolución se emplean para evaluar la influencia de los efectos electrónicos de los sustituyentes en el orden de las constantes y mecanismos de las reacciones orgánicas en disolución. Para una revisión general ver C. Hansch, A. Leo, R. W. Taft, *Chem. Rev.*, **1991**, *91*, 165.

La pendiente negativa para $\log \Phi_f$ vs. σ_p y positiva en el caso de $\tilde{\nu}_{\text{obs}}$ vs. σ_p o, en otras palabras, el intercambio de un grupo R densidad electrónica pobre (por ejemplo en **FenxUr**) por un grupo electrón dador de mayor densidad electrónica, sugiere que la coordinación del anión debería conducir a la respuesta analíticamente favorable de un desplazamiento batocrómico y un aumento de la fluorescencia.

El paso de una naturaleza más poliénica a más polimetínica tentativamente es el responsable de las características encontradas al aumentar la fuerza electrón dadora del sustituyente en la posición 7.

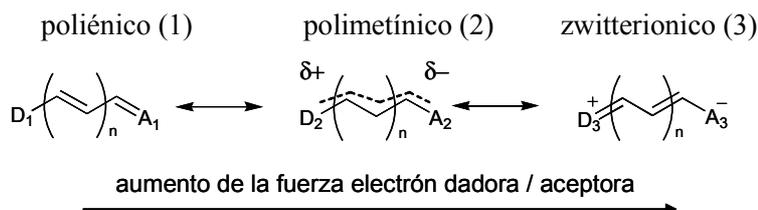


Fig. III.A.34. Representación del efecto de la capacidad electrón dadora o aceptora de D y A en las cadenas poliénicas.

Según Bublitz y colaboradores⁷¹ si ambos D y A son débiles (Fig. III.A.34), la estructura molecular será como la de un polieno sin perturbar (1). Al ir aumentando la fuerza electrón dadora/aceptora la estructura electrónica del puente poliénico se vuelve más deslocalizada y dipolar, es decir, cambia hacia la estructura totalmente deslocalizada polimetínica (2), tipo cianina. Finalmente el mayor aumento del carácter dador y/o aceptor, conduce a la estructura límite (3) con separación de cargas (zwitterión). En nuestro caso el aumento del carácter electrón dador del sustituyente en la posición 7 parece estar de acuerdo con el mayor carácter polimetínico del cromóforo.

⁷¹ G. U. Bublitz, R. Ortiz, S. R. Marder, S. G. Boxer, *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, *119*, 3365

A.5.4.- Respuesta de FenxUr y FenxAmd Frente a Distintos Aniones.

Una vez establecido el comportamiento fotofísico de **FenxUr**, el siguiente paso es comprobar las características del mismo como sensor. Empleando condiciones comunmente utilizadas para los estudios para la interacción con aniones de dichos receptores, es decir, MeCN o DMSO como disolvente⁷² y aniones como sales de tetraalquilamonio, se probó la respuesta de **FenxUr** frente a varios carboxilatos, así como frente a una serie de aniones inorgánicos monovalentes que pueden representar competidores potenciales por la coordinación con el receptor en estos disolventes.

Tal y como se esperaba, el acetato modula las propiedades espectroscópicas de **FenxUr**. La presencia de este anión conduce a un cambio de color de naranja (**FenxUr**: $\lambda_{\text{abs}} = 467 \text{ nm}$) a rosa (**FenxUr**-AcO⁻: $\lambda_{\text{abs}} = 486 \text{ nm}$) así como un aumento en la intensidad de fluorescencia de 16 veces (**FenxUr**: $\Phi_f = 0.015$; **FenxUr**-AcO⁻: $\Phi_f = 0.24$) en acetonitrilo, tras la adición de una concentración de TBAACO = 10^{-3} M , para la que se observa la saturación de la señal (ver Fig. III.A.35). Esta banda de emisión además está desplazada ligeramente al rojo con respecto a la del ligando libre. Estos efectos muestran que el paso de **FenxUr** a **FenxUr**-AcO⁻ es comparable al paso de **FenxUr** a **FenxNH₂**, de la Fig. III.A.32. En otras palabras, la formación del complejo a través de enlace de hidrógeno entre el ligando y el acetato incrementa la densidad electrónica en el nitrógeno en la posición 7, lo que conduce a estos efectos analíticamente favorables.

⁷² a) E. Fan, S. A. van Arman, S. Kinkaid, A. D. Hamilton, *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, *115*, 369; b) S. Nishizawa, P. Bühlmann, M. Iwao, Y. Umezawa, *Tetrahedron Lett.*, **1995**, *36*, 6483; c) B. H. M. Snellink-Ruël, M. M. G. Antonisse, J. F. J. Engbersen, P. Timmerman, D. N. Reinhoudt, *Eur. J. Org. Chem.*, **2000**, 165; d) B. R. Linton, M. S. Goodman, E. Fan, S. A. van Arman, A. D. Hamilton, *J. Org. Chem.*, **2001**, *66*, 7313; e) S. K. Kim, J. Yoon, *Chem. Commun.*, **2002**, 770; f) D. Jiménez, R. Martínez-Máñez, F. Sancenón, J. Soto, *Tetrahedron Lett.*, **2002**, *43*, 2823.

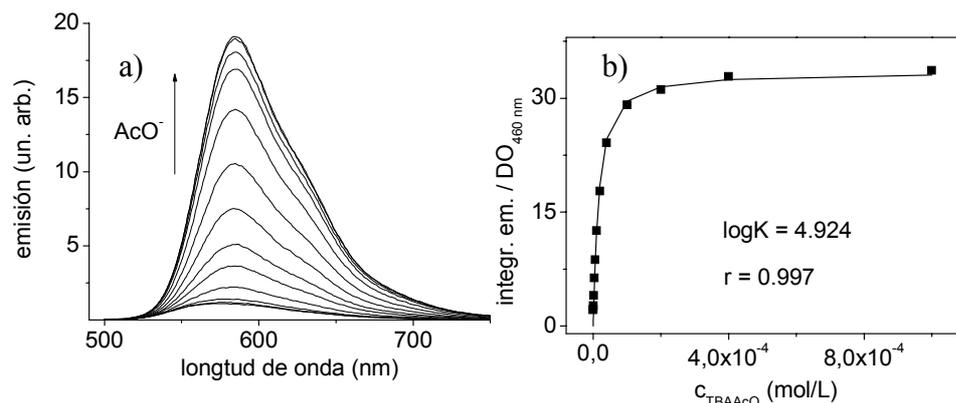


Figura III. 35. a) Espectros de emisión para la valoración fluorimétrica de **FenxUr** ($c = 4 \times 10^{-6}$ M) con TBAAcO en MeCN, y b) puntos experimentales y curva de ajuste (línea continua) para la integral de fluorescencia dividida por la densidad óptica a la longitud de onda de excitación (460 nm) vs. concentración de anión, con el $\log K$ indicado.

Las valoraciones por fluorescencia indican la formación de un complejo de estequiometría 1:1 con un logaritmo para la constante de estabilidad, $\log K = 4.924 \pm 0.005$ (expresado como la media de dos experimentos individuales).

Debido a problemas de solubilidad de **FenxUr** en acetonitrilo, sobre todo en el caso de los estudios de RMN, se descarta seguir empleándolo como disolvente. En lugar de éste se emplea un disolvente más polar como el DMSO. Al ser un disolvente con un mayor poder de solvatación para los aniones, se observa una menor interacción con el sensor ($\log K = 2.12 \pm 0.03$ para la interacción con acetato, expresado como la media de dos experimentos individuales), aun así, sigue observándose el aumento de la fluorescencia y el cambio de color (ver Figs. III.A.36 y 37).

En este caso, el acetato también induce un cambio de color de naranja a rosa así como un aumento en la intensidad de fluorescencia de 5 veces (**FenxUr**: $\Phi_f = 0.024$, $\tau_f = 0.13$ ns; **FenxUr**-AcO⁻: $\Phi_f = 0.12$, $\tau_f = 0.70$ ns). Aquí de nuevo se muestra el efecto comparable que ejerce la coordinación del ion al pasar de **FenxUr** a **FenxUr**-AcO⁻ (Fig. III.A.37) con el paso de **FenxUr** a **FenxNH₂**.

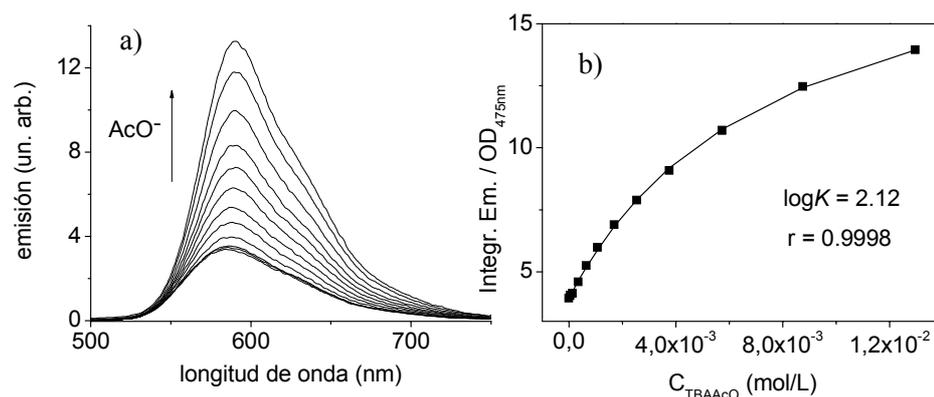


Figura III.A.36. a) Espectros de emisión para la valoración fluorimétrica de **FenxUr** ($c = 4.5 \times 10^{-6}$ M) con TBAACO en DMSO, y b) puntos experimentales y curva de ajuste (línea continua) para la integral de fluorescencia dividida por la densidad óptica a la longitud de onda de excitación (475 nm) vs. concentración de anión, con el $\log K$ indicado.

Asimismo, la respuesta del sensor **FenxUr** fue comprobada para una serie de aniones de pequeño tamaño. Para ello se tomó un exceso de 1500 equivalentes con respecto al ligando ($c_{\text{total anión}} = 6.7 \times 10^{-3}$ M) como referencia para las medidas de todos los aniones. Para tal exceso, el H_2PO_4^- indujo un incremento en la emisión de 7 veces, Cl^- de 1.4 veces y HSO_4^- tan sólo de 1.2 veces. En el caso de NO_3^- , Br^- así como de Γ^- no se observó ningún efecto (ver Tabla III.A.13).⁷³ La respuesta del sensor está por tanto en línea con lo observado para otros sensores de aniones cromo- fluorogénicos descritos con el mismo receptor urea, es decir, respuesta de aniones básicos con capacidad de formar enlaces de hidrógeno.^{72a-c,e} Sin embargo, el fluoruro indujo cambios completamente distintos que pueden interpretarse en base a la desprotonación del colorante (Figs. III.A.37 y 39). Una explicación de la respuesta en presencia de F^- se da junto con los resultados de ^1H RMN más adelante.

⁷³ Además de los aniones se hizo una prueba con Fe^{3+} en DMSO con el fin de confirmar que la coordinación de los cationes a través del carbonilo no interfiere. Ni siquiera en el caso de este catión con una carga tan elevada se observó ninguna interferencia, incluso tras la adición de 200 equivalentes de $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3$ con respecto a **FenxUr**, probablemente debido a la menor densidad electrónica en este caso en el carbonilo por el menor carácter electrón dador del grupo urea en comparación con las dialquilaminas estudiadas en el apartado de cationes.

Tabla III.A.13. Incremento producido en la intensidad de fluorescencia para disoluciones de **FenxUr** en DMSO ($c = 4.5 \times 10^{-6}$ M) tras la adición de varios aniones.

| Anión | F ⁻ | Cl ⁻ | Br ⁻ | I ⁻ | H ₂ PO ₄ ⁻ | AcO ⁻ | HSO ₄ ⁻ | NO ₃ ⁻ |
|----------------|----------------|-----------------|-----------------|----------------|---|------------------|-------------------------------|------------------------------|
| I_{LA}/I_L^a | ^b | 1.4 | 1.0 | 1.0 | 6.7 | 5.4 | 1.2 | 1.0 |

^a Relación entre la integral de fluorescencia de la especie **FenxUr-A⁻** y **FenxUr** libre.

^b El fluoruro produce una respuesta diferente al resto de aniones ya que en este caso se trata de desprotonación en lugar de coordinación. Ver Fig. III.A.37.

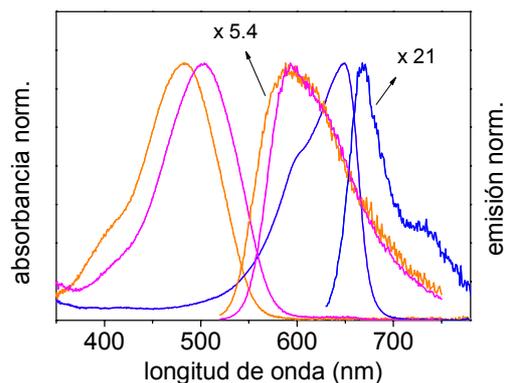


Fig. III.A.37. Espectros de absorción y emisión normalizados para (\rightarrow) **FenxUr** ($c = 4.5 \times 10^{-6}$ M), y tras la adición de 1500 equivalentes de (\leftarrow) TBAAcO y (\leftarrow) TEAF en DMSO. Los números señalados por una flecha indican el factor por el que se ha multiplicado la intensidad de las bandas correspondientes de emisión para normalizarlas con respecto a la de la especie más fluorescente (**FenxUr-AcO⁻**, \leftarrow).

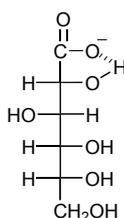
Otros Carboxilatos. Así mismo se evaluó la respuesta de otro tipo de carboxilatos (estudios requeridos para la parte B2 de este capítulo). Sobre los distintos carboxilatos probados, la única respuesta positiva cualitativamente similar al acetato se encontró para benzoato y tan sólo una pequeña respuesta para glucuronato (Tabla III.A.14). Ambos aniones se emplearon en forma de sal sódica. Otros carboxilatos como el salicilato sódico, la sal trisódica del citrato o varios carboxilatos de cadena larga considerados, como hexanoato, dodecanoato, hexadecanoato y octadecanoato no son solubles en DMSO.

Tabla III.14. Aumento de la fluorescencia ($\lambda_{exc} = 475 \text{ nm}$) para **FenxUr** tras la adición de diferentes carboxilatos ($c_{\text{carboxilato}} = 6 \text{ mM}$) en DMSO.

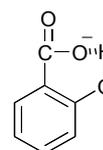
| | TBAAcO | NaBzO | NaGlucO | NaSalO |
|----------------|--------|-------|---------|--------|
| I_{LA}/I_L^a | 5.4 | 4.3 | 1.8 | 1.2 |

^a Relación entre la integral de fluorescencia de la especie **FenxUr-A⁻** y **FenxUr** libre.

Posiblemente la pobre respuesta del glucuronato y el salicilato sea debida a la formación de un enlace de hidrógeno intramolecular que inhibe la coordinación con el grupo urea.



Glucuronato



Salicilato

Efecto del Contraión. Con el objetivo de evaluar la influencia del contraión se realizaron valoraciones con distintas sales de acetato, empleándose para ello las sales de cationes monovalentes de distinto tamaño/hidrofilia como Li^+ , Rb^+ , tetrametilamonio (TMA^+) y TBA^+ , observándose la misma respuesta en todos los casos en DMSO (Fig. III.A.38).

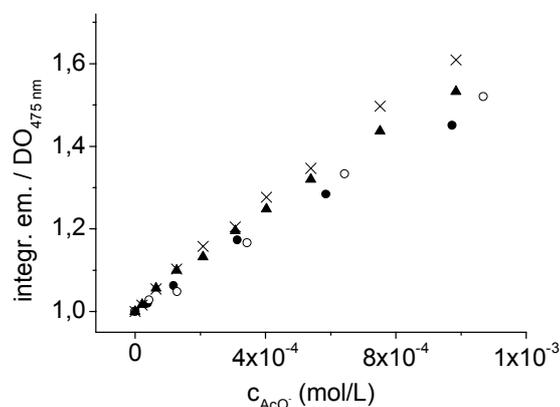


Fig. III.A.38. Valoración de **FenxUr** ($c = 4.5 \times 10^{-6} \text{ M}$) con (\blacktriangle) LiAcO (\times) RbAcO , (\bullet) TMAAcO y (\circ) TBAAcO en DMSO. Se representa la integral de fluorescencia dividida por la densidad óptica leída a la λ_{exc} (475 nm) frente a la concentración de la sal.

Parece que los cationes se solvatan bien en el DMSO y no tienden a formar pares iónicos en este disolvente, lo que podría resultar en un efecto diferente en la respuesta en función de la sal empleada.

Desprotonación con Fluoruro. Las valoraciones por UV/Vis de **FenxUr** con TEAF ponen de manifiesto la distinta respuesta del sensor por el distinto proceso implicado en el reconocimiento (coordinación en el caso del AcO^- vs. desprotonación en el caso del F^-). La curva de valoración (absorbancia leída a 650 nm vs. $\log[\text{F}^-]$) es de tipo sigmoideal, característica de las valoraciones ácido-base).

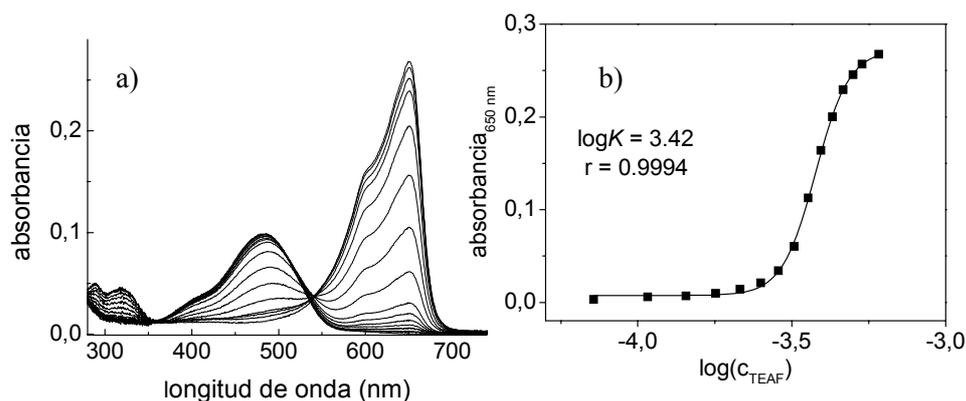


Figura III.A.39. a) Espectros para la valoración por absorción de UV/Vis de **FenxUr** ($c = 4.5 \times 10^{-6}$ M) con TEAF en DMSO, y b) absorbancia leída a 650 nm para los distintos puntos del calibrado vs. $\log([\text{F}^-])$ con el ajuste de la curva sigmoideal (línea continua) empleado para el cálculo de $\log K$.

Se puede apreciar además en esta valoración cómo los espectros de absorbancia no presentan un punto isobéptico bien definido, lo que podría atribuirse a la existencia de más de un proceso de equilibrio (ver Fig. III.A.41)

Compuesto Modelo Acetamido. Estudios comparativos con el compuesto modelo **FenxAmd**, que únicamente posee un grupo amida para coordinación por enlace de hidrógeno, revelan que en este caso apenas se produce interacción con el anión acetato en DMSO. Sin embargo sí que se observa el desplazamiento batocrómico del espectro de absorción tras la adición de fluoruro tal y como se muestra en la Fig. III.A.40, lo que está más de acuerdo con un proceso de

desprotonación del nitrógeno directamente unido al anillo de fenoxazinona, tal y como se ha propuesto para **FenxUr**.

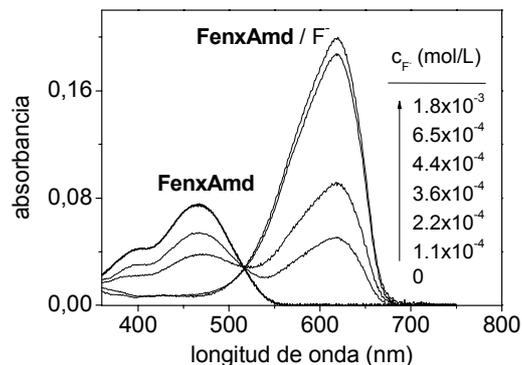


Fig. III.A.40. Espectros de absorción para **FenxAMD** (4.5×10^{-6} M) y tras la adición de cantidades crecientes de TEAF en DMSO.

Además del desplazamiento batocrómico, la nueva banda a > 600 nm en ambos compuestos, **FenxUr** y **FenxAMD** presenta una absorbancia 2.5 veces más intensa que el correspondiente cromóforo. Estos cambios tan importantes en los espectros de absorción y emisión (Fig. III.A.37) estarían de acuerdo con un cambio importante en la estructura electrónica del cromóforo, resultante de la desprotonación, ver estructura (c) en la Fig. III.A.41. Aparentemente, cuando el esqueleto de 7-amido- ó 7-urea-fenoxazinona se desprotona tiene lugar una redistribución de carga en la molécula. Los aniones resultantes **FenxAMD**⁻ y **FenxUr**⁻ muestran características prácticamente típicas de las cianinas (mayor carácter polimetínico, bandas más estructuradas y menores desplazamientos de Stokes).

Sin embargo, este proceso de desprotonación parece ligeramente diferente en el caso de **FenxUr** y **FenxAMD**, ya que mientras que en el segundo caso, se aprecia un punto isobéptico claro en los espectros de absorción de la valoración con fluoruro (Fig. III.A.40), como ya se ha comentado, en el caso de **FenxUr** el punto isobéptico no es tan definido (Fig. III.A.39), lo que parece indicar la existencia de una tercera especie, que podría ser atribuida a la estructura (b) en el equilibrio de la Fig. III.A.41. A bajas concentraciones de fluoruro tiene lugar una coordinación con el ligando. Cuando añadimos un exceso, este equilibrio se desplaza para dar lugar a la especie desprotonada (c).

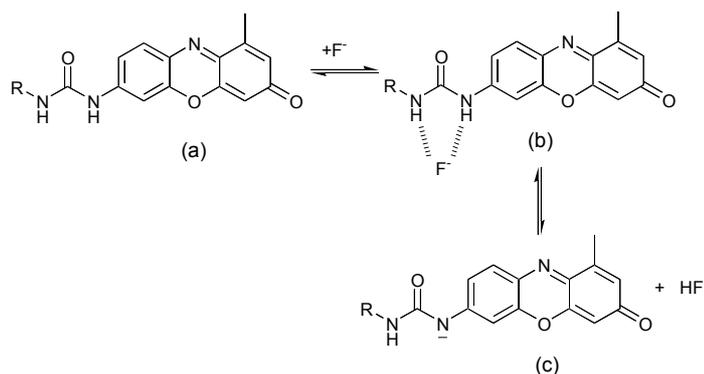


Fig. III.A.41. Distintos equilibrios en DMSO para el sistema **FenxUr**-F⁻.

Esta última observación se confirma con los espectros de RMN (Fig. III.A.44 para **FenxUr** y III.A.45 para **FenxAmd**, ver siguiente apartado).

El hecho de que el fluoruro pueda conducir a la desprotonación de grupos con protones ácidos como los derivados de amida aquí estudiados no es sorprendente, ya que el anión fluoruro es altamente básico en disolventes orgánicos apróticos como el DMSO, $\text{p}K_{\text{a}}(\text{F}^-)_{\text{DMSO}} = 15 \pm 2$, mientras que el acetato es algo menos básico por la mejor capacidad de solvatación del anión (base conjugada) correspondiente en DMSO, $\text{p}K_{\text{a}}(\text{AcO}^-)_{\text{DMSO}} = 12.3$.⁷⁴

A.5.5.- Estudios Mediante Espectroscopia de RMN para **FenxUr** y **FenxAmd** en Presencia de Aniones.

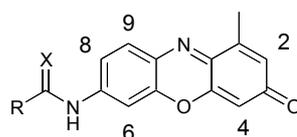
El uso de moléculas sensoras con grupos amido, urea tiourea o tipo pirrol para el reconocimiento de fluoruro en disolventes orgánicos centra una controversia acerca de si se trata de formación de complejos con el anión a través de enlace de hidrógeno o si de lo que ocurre es de la desprotonación del ligando inducida por el fluoruro.⁷⁵ Por esta razón, la respuesta de **FenxUr** y **FenxAmd** también se investigó por espectroscopía de RMN.

⁷⁴ F. G. Bordwell, *Acc. Chem. Res.*, **1988**, *21*, 456.

⁷⁵ a) C. B. Black, B. Andrioletti, A. C. Try, C. Ruiperez, J. L. Sessler, *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, *121*, 10438; b) H. Miyaji, J. L. Sessler, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2001**, *40*, 154; d) S.-S. Sun, A. J. Lees, *Chem. Commun.* **2000**, 1687; e) S. K. Kim, J. Yoon, *Chem. Commun.*, **2002**, 770; f) D. Aldakov, P. Anzenbacher, Jr., *Chem. Commun.*, **2003**, 1394;

Las valoraciones de los correspondientes ligandos con los aniones acetato y fluoruro se llevaron a cabo añadiendo a una disolución del ligando en DMSO- d_6 cantidades crecientes de una disolución en DMSO- d_6 de la sal correspondiente de tetrabutil o tetraetilamonio en relaciones molares a) 1:0; b) 1:0.25; c) 1:1 y d) 1:4 de ligando:anión. Los resultados se muestran en las Figs. III.A.42-45.

Para la numeración de los protones aromáticos de la fenoxazina asignados en los distintos espectros de RMN se ha seguido el siguiente esquema:



Los resultados de los estudios de RMN para **FenxUr** con acetato, concuerdan con la interpretación dada para una coordinación por enlace de hidrógeno a través de los grupos NH de la urea. **FenxUr** muestra una fuerte interacción con AcO^- que resulta en un cambio de color fácilmente discernible y un desplazamiento dramático de los protones NH del grupo urea en el espectro de RMN (Fig. III.A.42). Tal y como era de esperar, ambas señales NH se desplazan fuertemente hacia campo más bajo sobre todo el rango de composiciones estudiado. La variación en los desplazamientos químicos $\Delta\delta$ ($= \delta_{\text{FenxUr/anión}} - \delta_{\text{FenxUr}}$) de 2.83 y 2.71 ppm para NH-CO y NH-CH₂, respectivamente, muestran que ambos grupos NH participan de la misma manera en la interacción por enlace de hidrógeno. Aparte de los desplazamientos a campo bajo de los protones de NH, únicamente se observa desplazamientos menores para el resto de protones de la molécula, indicando la ausencia de otras interacciones intermoleculares fuertes entre **FenxUr** y los iones AcO^- .

g) T. Gunnlaugsson, P. E. Kruger, P. Jensen, F. M. Pfeffer, G. M. Hussey, *Tetrahedron Lett.*, **2003**, 44, 8909; h) J. Y. Lee, E. J. Cho, S. Mukamel, K. C. Nam, *J. Org. Chem.*, **2004**, 69, 943; i) A. M. Costero, M. J. Bañuls, M. J. Aurell, M. D. Ward, S. Argent, *Tetrahedron*, **2004**, 60, 9471.

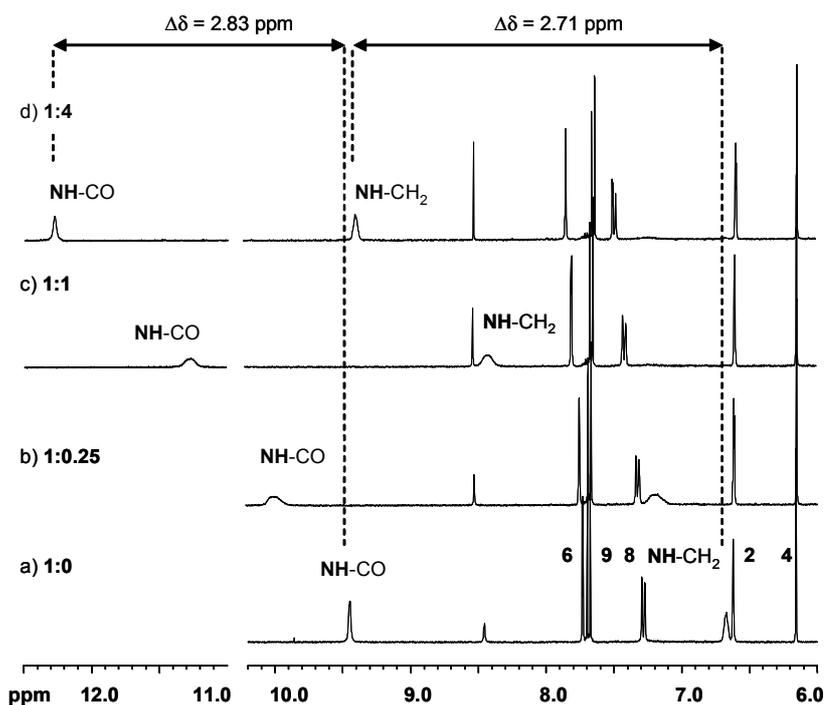


Fig. III.A.42. Espectro de ¹H RMN para **FenxUr** en DMSO-d₆ y tras la adición de cantidades crecientes de TBAACO.

Para comparar comportamientos, también se estudió el derivado acetamido de la fenoxazina, **FenxAmd**. En contraste a **FenxUr**, únicamente se observaron desplazamientos químicos Δδ inducidos muy pequeños durante la valoración (Fig. III.A.43), indicando únicamente interacciones débiles y una tendencia despreciable para la formación de enlace de hidrógeno en este par anión-colorante. Δδ para el NH de la amida es tan sólo de 0.38 ppm y el resto de señales de **FenxAmd** se ven todavía menos afectadas.

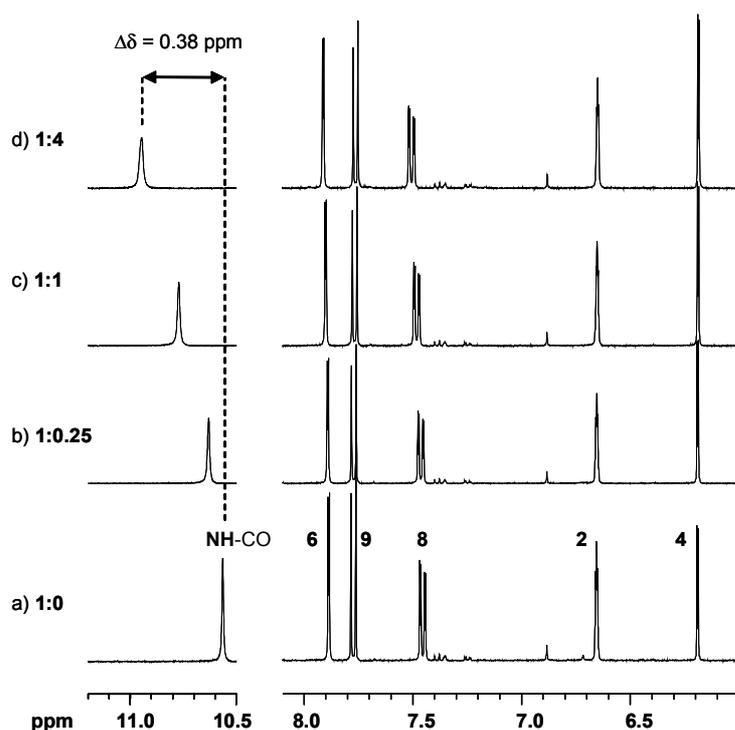


Fig. III.A.43. Espectro de ^1H RMN para **FenxAmd** en DMSO- d_6 y tras la adición de cantidades crecientes de TBAACO.

En el caso de las valoraciones con fluoruro, tal y como se puede deducir de la Fig. III.A.44, **FenxUr** muestra cualitativamente las mismas características descritas anteriormente para **FenxUr** / AcO^- a bajas concentraciones del anión con respecto a las del cromóforo (**FenxUr**: $\text{F}^- = 1:0.25$). Sin embargo, en los siguientes puntos de la valoración, las señales de protón de los grupos NH se ensanchan considerablemente y prácticamente desaparecen para una relación equimolar de anión y **FenxUr**.

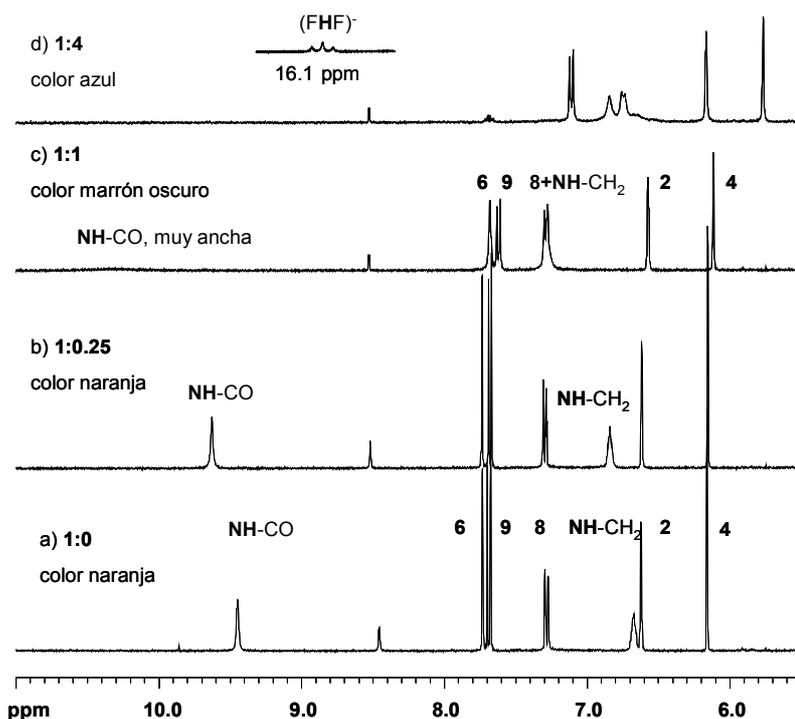


Fig. III.A.44. Espectro de ^1H RMN para **FenxUr** en DMSO-d_6 y tras la adición de cantidades crecientes de TEAF.

Simultáneamente a la desaparición de las señales de NH, aparece una nueva señal 1:2:1 triplete a 16.1 ppm, que puede ser atribuida al ion bi-fluoruro (FHF^-) con una constante de acoplamiento $^1J_{\text{HF}} \approx 120 \text{ Hz}$.⁷⁶ La aparición de esta nueva especie señala a la desprotonación bien del grupo urea, bien del disolvente. El fuerte desplazamiento a campos altos de todas los protones de la parte aromática de la fenoxazinona indican el cambio global de la distribución electrónica en el cromóforo, lo que da indicación de la desprotonación de la subunidad de urea. La aparición de la señal a 16 ppm correspondiente a FHF^- también podría ser debida a la desprotonación de trazas de agua que pueda contener el disolvente deuterado o incluso la sal de TEA^+ . Sin embargo, estudios de referencia con la sal de TEAF en

⁷⁶ I. G. Shenderovich, H.-H. Limbach, S. N. Smirnov, P. M. Tolstoy, G. S. Denisov, N. S. Golubev, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2002**, *4*, 5488.

DMSO-d₆ no mostraron la aparición de esta señal, por lo que se descarta esta posibilidad.

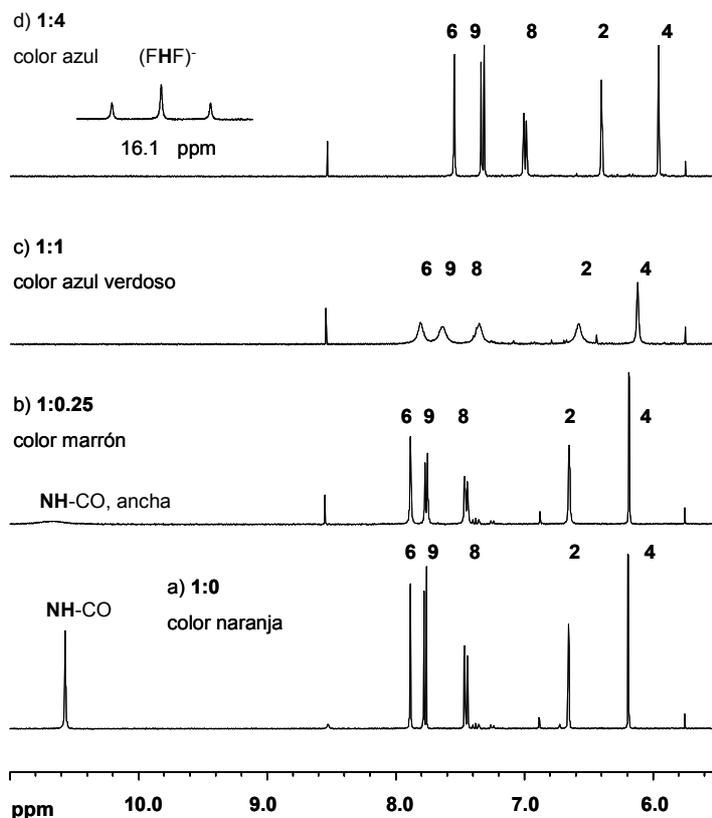


Fig. III.A.45. Espectro de ¹H RMN para **FenxAmd** en DMSO-d₆ y tras la adición de cantidades crecientes de TEAF.

Resultados similares se obtienen durante la valoración del compuesto modelo **FenxAmd** con F⁻. La reacción de desprotonación ocurre incluso a concentraciones menores del anión (Fig. III.A.45). Se encuentra ya un fuerte ensanchamiento de la señal NH-CO y un cambio de color de naranja a marrón en una relación **FenxAmd**:F⁻ de (1:0.25) (espectro b) de la Fig. III.A.45). Con un exceso de 4 veces de fluoruro la desprotonación de la amida es completa.

Estos resultados de RMN apoyan fuertemente los cambios cromo- y fluorogénicos inequívocamente diferentes observados para acetato y fluoruro en los estudios espectroscópicos (Fig. III.A.37).

Sin embargo, a pesar de los cambios espectroscópicos favorables inducidos por la coordinación de AcO^- y H_2PO_4^- , el paso de disolventes apróticos a medios acuosos conduce a la bien conocida descalificación de dichos sensores basados en receptores simples como la urea, ya que no son capaces de vencer la solvatación de los aniones en agua. Es decir, **FenxUr** no muestra ninguna respuesta para los aniones en medio acuoso (tampoco se observa la desprotonación con fluoruro).

A.5.6.- Estudios Espectroscópicos para FenxTUr.

Teniendo en cuenta que los grupos NH de las tioureas son más ácidos, y que por tanto, suelen dar mayores interacciones con los aniones básicos capaces de formar enlaces de hidrógeno (ver por ejemplo las referencias 72 (b) y (d) para una comparación entre ligandos urea-tiourea análogos), se pensó en comprobar cómo se comportaría el derivado análogo de **FenxUr** con un grupo tiourea como centro coordinante. Es más, tal y como han mostrado recientemente los grupos de Teramae⁷⁷ y Kubo,⁷⁸ se puede obtener una interacción sustrato-receptor todavía mayor por la conversión del grupo tiourea en un derivado isotiouronio, cargado positivamente, por la introducción de interacciones electrostáticas favorables adicionales. Sin embargo, mientras que la síntesis de **FenxTUr** pudo llevarse a cabo siguiendo un procedimiento similar al descrito para **FenxUr** (ver Esquema III.A.3), cualquier intento de preparar estos derivados de acuerdo con los procedimientos descritos por Kubo y colaboradores para la obtención de la sal de hexafluorofosfato de 2-[(*S*-bencil-*N'*-metil-*N*-isotiouronio)metilnaftaleno] o por Teramae y colaboradores para la preparación del bromuro de *S*-(2-naftilmetil)-*N,N'*-dimetilisotiouronio, resultaron infructuosos.

FenxTUr se somete a estudios espectroscópicos similares a **FenxUr** y los resultados obtenidos se resumen en la Tabla III.A.15. Sin embargo, mientras que en el caso de los espectros de **FenxUr** los espectros de excitación de fluorescencia y

⁷⁷ S. Nishizawa, Y.-Y. Cui, M. Minagawa, K. Morita, Y. Kato, S. Taniguchi, R. Kato, N. Teramae, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **2002**, 866.

⁷⁸ Y. Kubo, S. Ishihara, M. Tsukahara, S. Tokita, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **2002**, 1455.

los de absorción coinciden, no ocurre lo mismo en el caso de **FenxTUR** tal y como se muestra en la Fig. III.A.46. Por esta razón, los rendimientos cuánticos de fluorescencia no pueden ser determinados de manera fiable, ya que muestran una dependencia con la longitud de onda de excitación que no puede ser corregida por la densidad óptica del cromóforo. Esto revela un comportamiento complicado para este derivado incluso en el estado fundamental.

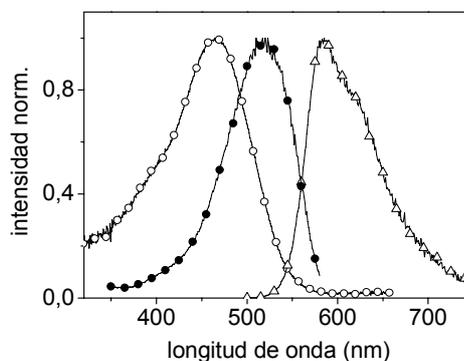


Fig. III.A.46. Espectros de absorción (○), excitación (●) y emisión (Δ) para a) **FenxTUR** en MeCN.

Tabla III.A.15. Datos espectroscópicos obtenidos a 298 K para **FenxTUR** en una serie de disolventes.

| Disolvente | $\lambda_{\text{abs}}(\text{máx})$ /nm | $\lambda_{\text{em}}(\text{máx})$ /nm |
|---------------------------------|--|---------------------------------------|
| H ₂ O | 516 | 597 |
| MeOH | 484 | 592 |
| DMSO | 487 | 610 |
| MeCN | 466 | 584 |
| Acetona | 470 | 586 |
| CH ₂ Cl ₂ | 458 | 578 |
| Et ₂ O | 465 | 571 |

La fuerza electrón dadora del sustituyente en la posición 7 del anillo de fenoxazinona para **FenxTUR** parece por tanto comparable a la de **FenxUr**, atendiendo a los valores de longitud de onda máxima de absorción y emisión (por ejemplo, en acetonitrilo $\lambda_{\text{abs}} = 467$ nm para **FenxUr** y 466 nm para **FenxTUR**, en el caso de $\lambda_{\text{em}} = 589$ nm para **FenxUr** y 584 nm para **FenxTUR**).

En vistas de los intentos sintéticos infructuosos para preparar la sal de isotiouronio y teniendo en cuenta la facilidad con la que desprotonan **FenxUr** y **FenxAmd** en presencia de fluoruro en DMSO, se llevaron a cabo los estudios espectroscópicos y espectrofotométricos con AcO^- y F^- para **FenxTUR** en analogía a los descritos anteriormente. Tal y como se puede apreciar en la Fig. III.A.48, los desplazamientos en el espectro de RMN inducidos por acetato son mayores que los encontrados en el caso de **FenxUr** y es posible incluso apreciar una desprotonación parcial con el AcO^- en el espectro de absorción de **FenxTUR** (Fig. III.A.47) en DMSO.

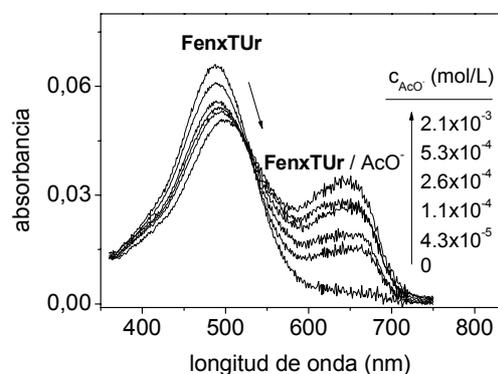


Fig. III.A.47. Espectros de absorción para **FenxTUR** (4.5×10^{-6} M) y tras la adición de cantidades crecientes de TBAAcO en DMSO.

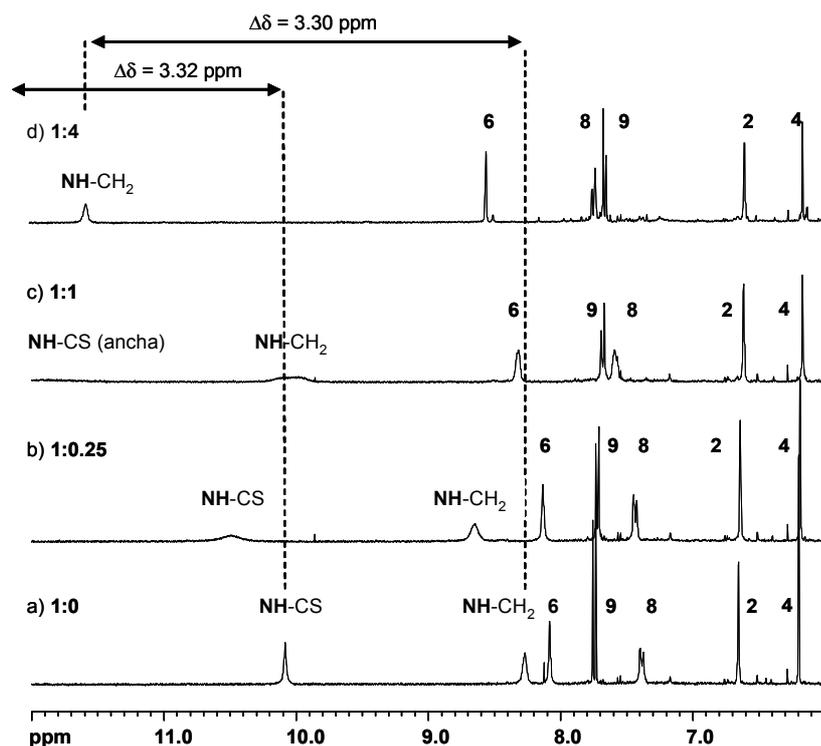


Figura III.A.48. Espectro de ^1H RMN para FenxTUr en DMSO- d_6 y tras la adición de cantidades crecientes de TBAAcO.

La desprotonación del derivado de tiourea incluso con el anión menos básico AcO^- (en DMSO) parece lógica si tenemos en cuenta que los grupos NH de las tioureas son mucho más ácidos (unas 6 unidades de pK_a) que los derivados análogos de urea o amida (ver Tabla III.A.16).⁷⁹

Tabla III.A.16. Valores de pK_a para algunos derivados de amida, urea y tiourea en DMSO según los valores tabulados en la referencia 79.

| Compuesto | PhCONHPh | $(\text{H}_2\text{N})_2\text{CO}$ | $(\text{PhNH})_2\text{CO}$ | $(\text{H}_2\text{N})_2\text{CS}$ | $(\text{PhNH})_2\text{CS}$ |
|---------------|-------------------|-----------------------------------|----------------------------|-----------------------------------|----------------------------|
| pK_a | 18.8 | 26.9 | 19.5 | 21.0 | 13.5 |

⁷⁹ F. G. Bordwell, G.-Z. Ji, *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, *113*, 8398.

En esta tabla se puede apreciar como los derivados de tiourea son unas 10^6 veces más ácidos que los derivados correspondientes de amida y urea y además que la introducción de sustituyentes aromáticos en los grupos NH incrementa sustancialmente la acidez de estos protones (en ambos casos, para la urea y tiourea el intercambio de un H en los dos grupos NH por un fenilo resulta en un aumento de la acidez de hasta 7 unidades del pK_a). Esto confirma los resultados obtenidos por RMN y absorción de UV/Vis que la desprotonación en el caso de **FenxUr** y **FenxTUR** ha de tener lugar en el grupo NH conectado directamente al anillo de fenoxazinona. Las características de este sistema *push-pull* de la fenoxazinona hacen que el aumento de la acidez de estos grupos NH sea tan elevada en el caso de la tiourea que la desprotonación, incluso con el anión menos básico acetato, se vea favorecida.

En el caso del fluoruro, la presencia de este anión conduce no sólo a un ensanchamiento de las señales NH, sino también a una reducción no específica de todas las señales, lo más probable, debido a la descomposición del compuesto (Fig. III.A.49).

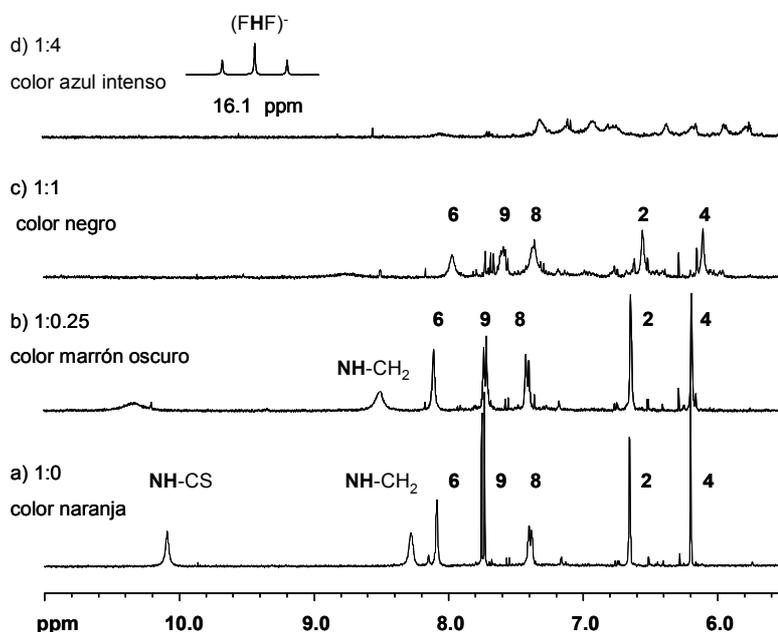


Figura III.A.49. Espectro de ^1H RMN para **FenxTUR** en DMSO-d_6 y tras la adición de cantidades crecientes de TEAF.

Se asume aquí tentativamente que debido al fuerte carácter *push-pull* del sistema de fenoxazinona, la subunidad tiourea es demasiado ácida para producir un comportamiento espectroscópico adecuado. Teniendo en cuenta además que **FenxTUR** ya desprotona incluso con AcO^- , lo que sugiere que el compuesto podría no ser suficientemente estable, o podría dar lugar a una interacción substrato-receptor no muy bien definida, no se considera **FenxTUR** apropiado para el desarrollo de sensores.

A continuación se incluye una tabla resumen con las características espectroscópicas de UV/Vis principales para **FenxUr**, **FenxAmd** y **FenxTUR** y en presencia de AcO^- y F en DMSO^- .

Tabla III.A.17. Longitudes de onda máximas de absorción y emisión para los distintos derivados de fenoxazinona tipo amida en DMSO ($c_L = 4.5 \times 10^{-6}$ M) y tras la adición de 1500 equivalentes de acetato y fluoruro.

| Ligando (L) | λ_{abs} (L) (nm) | λ_{abs} (L-AcO ⁻) (nm) | λ_{abs} (L-F ⁻) (nm) | λ_{em} (L) (nm) | λ_{em} (L-AcO ⁻) (nm) | λ_{em} (L-F ⁻) (nm) |
|----------------|---------------------------------|---|---|--------------------------------|--|--|
| FenxAmd | 467 | 468 | 619 | 602 | 602 | 652 |
| FenxUr | 482 | 502 | 651 | 595 | 594 | 668 |
| FenxTUR | 487 | 510, 652 ^a | 652 | 610 | ^b | ^b |

^a Desprotonación parcial. Dos bandas, ver Fig. III.A.47.

^b No se ha realizado un análisis de los espectros de emisión por los problemas mencionados anteriormente (no coincidencia de los espectros de excitación y absorción).

A.6.- CONCLUSIONES.

♦ Se ha descrito un potente sistema cromo- fluorogénico (con elevados coeficientes de absorción molar, rendimientos cuánticos y bandas de absorción y emisión centradas por encima de 500 nm) para el desarrollo de sensores químicos moleculares ópticos basado en el núcleo de 7-amino-3H-fenoxazin-3-ona. La versatilidad de los procedimientos sintéticos permite incorporar diferentes sustituyentes en la estructura, como receptores para cationes metálicos o aniones.

♦ Los estudios espectroscópicos de UV/Vis de una serie de compuestos modelo han permitido racionalizar la respuesta de los sensores en función de la fuerza electrón dadora del sustituyente en posición 7 (D) y de la polaridad del disolvente. Las principales conclusiones han sido:

- Hay una gran dependencia en la posición de los máximos de absorción con la polaridad del disolvente (solvatocromismo positivo), atribuida a un proceso de transferencia interna de carga parcial que tiene lugar tras la excitación electrónica. Esta CT genera en un mayor momento dipolar en el estado excitado que en el fundamental, y por tanto, una mayor estabilización del estado excitado con respecto al fundamental en disolventes polares.

- Este desplazamiento batocrómico que se observa al aumentar la polaridad del disolvente también se muestra en las bandas de emisión, aunque en menor grado, lo que causa una disminución de los desplazamientos de Stokes. Esto ha sido relacionado con el mayor carácter polimetínico del colorante al aumentar la polaridad del disolvente.

- En disolventes apróticos el aumento de la polaridad del disolvente causa un aumento del rendimiento cuántico de fluorescencia. Sin embargo, cuando los estudios se llevan a cabo en disolventes próticos, se observa una disminución de la intensidad de emisión como consecuencia de la interacción por enlace de hidrógeno del disolvente con el grupo carbonilo de la molécula.

- Al aumentar la fuerza electrón dadora del sustituyente en la posición 7 del anillo de fenoxazinona ($\text{NHCOCH}_3 < \text{NH}_2 < \text{N}(\text{CH}_3)_2 < \text{julolidino}$), también se observan desplazamientos batocrómicos (aquí de nuevo el efecto es más pronunciado en las bandas de absorción que en las de emisión), con un aumento en los rendimientos cuánticos de fluorescencia de hasta 250 veces al pasar de **FenxAmd** a **FenxJulo** en acetonitrilo.

- El estudio del derivado **FenxJulo** en el que se inhibe la rotación del grupo amino con respecto al grupo electrón aceptor de la molécula, así como la evaluación de la influencia de la viscosidad del disolvente en las propiedades espectroscópicas de **FenxDMA**, parecen indicar que no se producen cambios geométricos (TICT) en el estado excitado, que fueron propuestos en algunos de los trabajos previos publicados para el sistema de fenoxazinona.

♦ La elevada deslocalización del par electrónico solitario del N en la posición 7 al aumentar el carácter electrón dador del sustituyente genera una

elevada densidad electrónica localizada en el grupo carbonilo. Esta parece ser la razón de que este cromóforo pueda actuar como receptor ditópico en ciertas situaciones:

- Estudios con el compuesto modelo **FenxDMA** confirman que independientemente del ion metálico empleado, el grupo C=O es preferido para la coordinación de los cationes, de manera que la banda de absorción de **FenxDMA** se desplaza de manera nada selectiva hacia el rojo en todos los casos en los que hay coordinación.

- La introducción de un receptor a través de la posición electrón dadora de la fenoxazinona permite detectar mediante cambios espectroscópicos selectivos, la presencia de un determinado tipo de cationes. Por ejemplo, la introducción de átomos de azufre en el receptor (compuesto **FenxAT₂15C5**), hace que sea posible la coordinación de cationes tiofílicos como el Hg^{2+} . Se obtiene entonces un desplazamiento selectivo hacia el azul en los espectros de absorción para mercurio. **FenxAT₂15C5** es uno de los primeros sensores químicos descritos para la detección selectiva de Hg^{2+} en disolución acuosa mediante ambos, cambios en el color y en la fluorescencia de la sonda, con un límite de detección en el intervalo de concentración de ppb. En otro caso, la incorporación de los éteres corona **A15C5** y **A18C6** a través del N en la posición 7 se ha llevado a cabo con la intención de determinar selectivamente Ca^{2+} (en el caso del macrociclo **A15C5**) o Ba^{2+} (con el ligando de mayor tamaño **A18C6**). En el caso de **FenxA15C5**, la interacción con el receptor éter corona no es suficientemente fuerte y se observa el típico desplazamiento al rojo en los espectros debido a la coordinación de los cationes a través del grupo C=O. Parece que el receptor tetraoxa no ejerce un efecto adicional en el proceso de reconocimiento. Sin embargo, cuando los estudios se llevan a cabo con el ligando pentaoxa, **FenxA18C6**, la coordinación a través del macrociclo fue efectiva esta vez en el caso de Sr^{2+} y Ba^{2+} (con un cambio de color de rosa a amarillo) mientras que otro catión alcalinotérreo como el Mg^{2+} sigue prefiriendo la coordinación a través del C=O, induciendo un cambio de color diferente (a violeta).

♦ La inducción de cambios espectroscópicos favorables (desplazamiento batocrómico y un aumento en los rendimientos cuánticos de fluorescencia) al aumentar el carácter electrón dador de D se ha aplicado para el diseño y obtención de sensores moleculares para aniones. La funcionalización del cromóforo con receptores derivados de (tio)urea (grupos electrón dador débiles) capaces de

interaccionar con aniones mediante la formación de enlaces de hidrógeno, permite detectar especies aniónicas mediante cambios espectroscópicos analíticamente favorables. Por ejemplo, la coordinación de acetato con **FenxUr** en DMSO causa un aumento de la fluorescencia de 5 veces y un desplazamiento al rojo de 20 nm (cambio de color de naranja a rosa). Otra contribución importante en el campo de sensores químicos para aniones que responden mediante interacciones por enlace de hidrógeno ha sido el estudio del proceso de reconocimiento del anión fluoruro. Los estudios mediante espectroscopía de UV/Vis y RMN de los derivados de amida y (tio)urea han confirmado que en el caso del fluoruro en DMSO, en lugar de la coordinación a través de enlaces de hidrógeno, tiene lugar la desprotonación del sensor.

B) SÍNTESIS Y ESTUDIOS EN FASE HETEROGÉNEA

B.1.- OBJETIVOS

El objetivo principal de este apartado es la inmovilización en **UVM-7**, mediante enlaces covalentes, de algunos de los fluoróforos descritos en el apartado A de este capítulo y el estudio de la aplicabilidad de estos materiales híbridos como sensores ópticos. Asimismo, se evaluarán ciertas rutas de refuncionalización de los materiales mediante métodos de sililación con el objetivo de modular las propiedades superficiales de la sílice y mejorar así la aplicabilidad de los mismos.

♦ Por un lado, se incorporará un derivado análogo del compuesto solvatocrómico **FenxDMA** en la matriz mesoporosa con el objetivo de conseguir un dispositivo que responda de forma rápida y reversible a la presencia de ciertos vapores mediante cambios de color y fluorescencia.

♦ Por otro lado, se pretende mejorar la respuesta frente aniones del sensor **FenxUr** y aplicarlo para la detección selectiva de carboxilatos de cadena larga en medio acuoso.

B.2.- DETECCIÓN DE VAPORES.

B.2.1.- Introducción.

La incorporación del compuesto **FenxDMA** en un soporte sólido debería posibilitar la detección de vapores orgánicos, ya que, tal y como hemos visto en el apartado A) de este capítulo, se trata de un compuesto cuyas propiedades ópticas son altamente sensibles a la polaridad del entorno. De hecho, se han descrito diversos dispositivos que incorporan el rojo nilo para la detección de vapores

orgánicos. Por ejemplo, la inmovilización de este colorante en matrices poliméricas de diferente polaridad y porosidad¹ permite desarrollar un sensor capaz de diferenciar distintos pulsos de vapores. Mediante la construcción de un dispositivo con 19 fibras ópticas de diferentes características, obtienen distintos patrones de respuesta, con la ventaja de que es posible obtener información múltiple de manera simultánea (intensidad de fluorescencia, tiempo de vida de fluorescencia, longitud de onda y forma del espectro de emisión), frente a otros sensores similares de tipo electroquímico o polímeros conductores en los que sólo puede monitorizarse un parámetro (la intensidad). Otro ejemplo es la incorporación de este mismo fluoróforo en varios polímeros de diferente hidrofobicidad soportados en vidrios microestructurados para la obtención de sensores en serie a partir de los que obtienen una respuesta específica para cada analito por separado.² En otro trabajo la incorporación de este colorante solvatocrómico en polímeros de carácter ácido capaces de adsorber vapores orgánicos de carácter básico, permite la detección de vapores de derivados organofosforados.³ Las matrices ácidas dadoras de enlace de hidrógeno provocan la disminución de la fluorescencia del rojo nilo. La adsorción de los vapores básicos organofosforados, por los que la matriz polimérica posee una gran afinidad, induce la recuperación de la fluorescencia del cromóforo.

Por las características favorables de las fenoxazinonas, y siguiendo con el empleo de **UVM-7** para desarrollo de sensores híbridos nanoscópicos (nexo principal de esta tesis), se ha decidido incorporar un derivado análogo de **FenxDMA** en esta matriz para la detección de vapores. La ventaja de **UVM-7** es que además de ser transparente y permitir el anclaje covalente de la sonda fluorimétrica, se trata de una matriz altamente porosa con una elevada superficie, lo que asegura una rápida difusión de los vapores y por tanto, una respuesta óptica inmediata. Otra ventaja es que la matriz inorgánica puede refuncionalizarse, posibilitando así la modificación del entorno donde tiene lugar el proceso de reconocimiento. Lo que, en conexión con los trabajos descritos anteriormente, podría resultar en la obtención de diferentes patrones de respuesta en función de la polaridad o propiedades químicas (hidrofobicidad, interacciones por enlace de hidrógeno, etc.) del soporte. Por esta razón, además de la incorporación del cromóforo en una matriz silíceo sin modificar –altamente polar por el elevado número de grupos silanol– se decide preparar un material análogo en el que se lleva

¹ a) T. A. Dickinson, J. White, J. S. Kauer, D. R. Walt, *Nature*, **1996**, 382, 697 y b) J. White, J. S. Kauer, T. A. Dickinson, D. R. Walt, *Anal. Chem.*, **1996**, 68, 2191.

² D. Li, C. A. Mills, J. M. Cooper, *Sens. Actuators B*, **2003**, 92, 73.

³ I. Levitsky, S. G. Krivoslykov, J. W. Grate, *Anal. Chem.*, **2001**, 73, 3441.

a cabo una segunda etapa de funcionalización. Se trata de pasivar los silanoles superficiales que quedan sin reaccionar tras el anclaje del colorante, mediante una reacción de sililación con 1,1,1,3,3,3-hexametildisilazano, lo que da lugar a un material altamente hidrófobo.

La incorporación de rojo nilo en matrices síliceas porosas ha sido descrita en un trabajo de Meinershagen y Bein.⁴ Aquí describen la inclusión del colorante en una zeolita mediante la técnica de *ship in a bottle* (barco en una botella)⁵ para su empleo como sistema de detección de vapores, aprovechando la selectividad impuesta por tamaño por los microporos de la zeolita. Con el objetivo de minimizar la influencia de la matriz en el proceso de detección de los vapores, emplean una zeolita altamente sílicea (de baja polaridad) que consiguen obtener mediante intercambio de aluminio con vapores de SiCl₄. La hidrofobicidad de la zeolita y la inclusión del colorante en el interior de los microporos de la misma hace que la interacción con la humedad externa sea lenta. En un estudio comparativo con materiales análogos preparados mediante adsorción del colorante y los preparados por oclusión, observan que los primeros cambian de color rápidamente con la humedad ambiental tras la deshidratación del sólido, lo que parece indicar que éste queda adsorbido únicamente en la superficie externa. Sin embargo, los sólidos preparados mediante *ship in a bottle* cambian más lentamente con de color porque los vapores han de difundir al interior de los microporos.

La ventaja del soporte mesoporoso empleado en esta tesis es que al tratarse de poros de mayor tamaño que los microporos de zeolitas, la difusión de los vapores orgánicos es prácticamente instantánea y no necesitan un tiempo de equilibrado con los gases. Esto que se veía como un inconveniente por la interferencia de la humedad ambiental en el caso anterior, aquí no es un problema, ya que el agua es “repelida” en el material altamente hidrófobo aquí empleado (de hecho, el material flota literalmente en el agua) y el color rosa característico de la fenoxazinona en entornos no próticos se conserva en condiciones normales (es decir, incluso tras la exposición durante varios días a la humedad ambiental).

Además, como ya se ha comentado, en la segunda etapa de funcionalización es posible el empleo de grupos orgánicos de muy diversas propiedades. Así por

⁴ J. L. Meinershagen, T. Bein, *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, *121*, 448.

⁵ Técnica empleada para la oclusión de moléculas orgánicas en el interior de zeolitas mediante el ensamblaje de dos o más componentes en el interior de los poros. Tras la reacción de ensamblaje se impide que la molécula pueda escapar de los poros por el menor diámetro que poseen los canales que interconectan los microporos de las zeolitas.

ejemplo se pueden introducir desde grupos de muy baja polaridad como cadenas alifáticas, hasta grupos alcohol, amina, tiol, etc., o grupos aromáticos como el benceno, lo que permitiría jugar con la selectividad del sistema por un determinado grupo de vapores. Otra ventaja es que el colorante que se incorpora se sintetiza previamente en fase homogénea, por lo que se puede purificar y caracterizar mediante las técnicas habituales en disolución, algo que no es posible mediante la técnica de *ship in a bottle*.

B.2.2.- Estrategias de Síntesis y Caracterización de los Productos.

Para poder soportar **FenxDMA** en **UVM-7** se intenta preparar el trialcoxisilil derivado de éste para su cohidrólisis/*grafting* con la sílice. Para ello se sintetiza el derivado fenólico de **FenxDMA** que posee una posición susceptible de ser funcionalizada con otro grupo. Sin embargo, intentos de obtener el trimetoxisilil derivado a partir del 3-(yodopropil)trimetoxisilano (IPTMES) en DMF con K₂CO₃ tal y como describen Briggs y colaboradores⁶ para la preparación de un alcoxiderivado del rojo nilo, resultaron infructuosos ya que parece ser que el trimetoxisilano polimeriza en la mezcla de reacción. Por esta razón, se decide anclar en primer lugar el IPTMES en **UVM-7** mediante *grafting* en tolueno⁷ y posteriormente anclar el derivado fenólico de la fenoxazina mediante sustitución nucleofílica del yoduro (ver Esquema III.B.2).

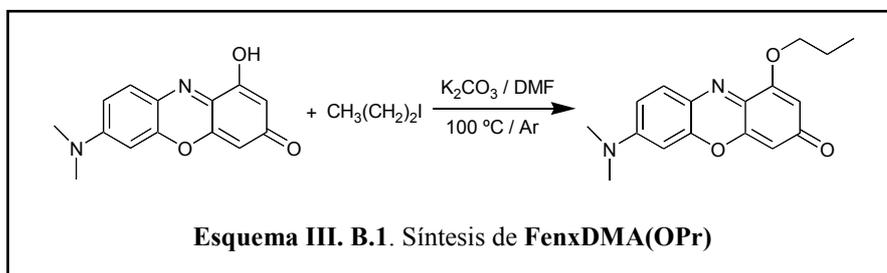
Aunque se ha observado que la introducción de un grupo éter en la posición 1 del anillo de fenoxazinona no afecta sustancialmente a las propiedades ópticas de **FenxDMA**,⁶ se sintetiza el sistema modelo correspondiente **FenxDMA(OPr)**, para desarrollar los estudios espectroscópicos con los distintos disolventes en paralelo a los del sólido, y comprobar así si el comportamiento del cromóforo es el mismo en disolución y soportado sobre la matriz silícea.

Síntesis de FenxDMA(OPr). Este compuesto, sintetizado como sistema modelo en disolución para los estudios solvatocrómicos del material híbrido **U-FenxDMA(OPr)** en fase sólida, fue obtenido siguiendo un procedimiento similar

⁶ M. S. J. Briggs, I. Bruce, J. Millar, C. J. Moody, A. C. Simmonds, E. Swann, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1997**, 1051.

⁷ N. Bellocq, S. Abramson, M. Lásperas, D. Brunel, P. Moreau, *Tetrahedron: Assym.*, **1999**, *10*, 3229.

al descrito en la referencia 6 a partir de la 7-(N,N-dimetilamino)-1-hidroxi-3H-fenoxazin-3-ona⁸ en dimetilformamida anhidra con K₂CO₃ como base tal y como se muestra en el Esquema III.B.1.



Los espectros de ¹H y ¹³C de RMN (Fig. III.B.1) muestran las señales típicas del grupo de fenoxazinona, con el protón 2 algo desplazado con respecto a los derivados **FenxA15C5**, **FenxA18C6** y **FenAT₂15C5** ya que en este caso se encuentra en posición *orto*- con respecto a un grupo alcóxido en lugar de un metilo como en los casos anteriores. La cadena alifática del sustituyente en la posición 1 del anillo de fenoxazinona da un triplete a 1.03 ppm que integra 3 H y que corresponde al metilo “a”, un multiplete a 1.9 ppm que integra 2 H, corresponde al metileno “b” y un triplete a 4.00 ppm que es el del del metileno “c” contiguo al oxígeno. Estas mismas señales aparecen en ¹³C a 10.3, 21.7 y 70.8 ppm, respectivamente. El singlete que aparece a 3.08 ppm que integra 6 H corresponde a los grupos metilo del N aromático que aparecen a 40.4 ppm en ¹³C.

⁸ M. Kotouček, M. Martinek, E. Ružička, *Monatsh. Chem.*, **1965**, 96, 1433.

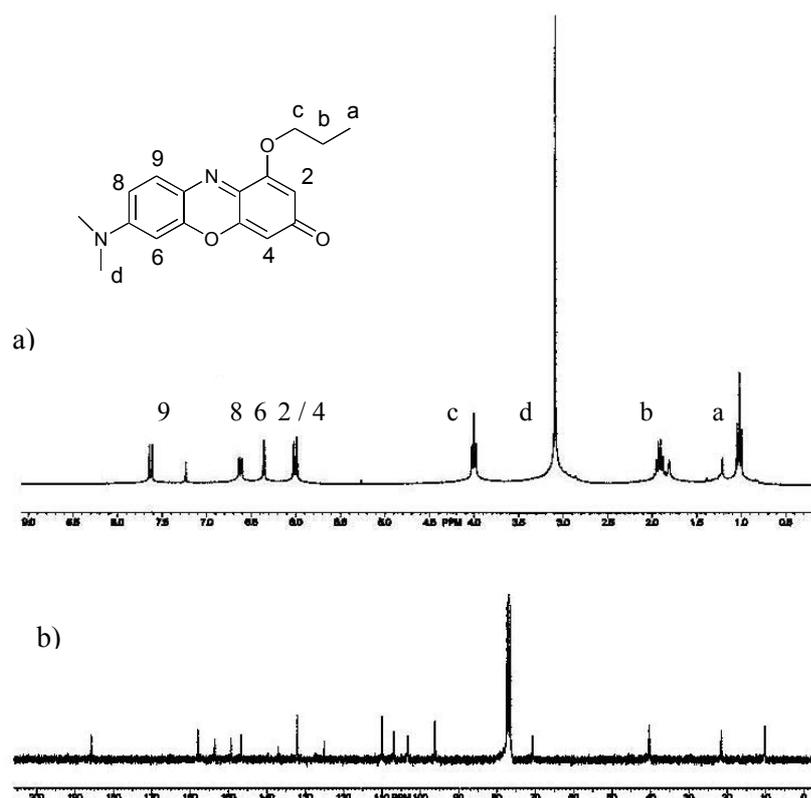
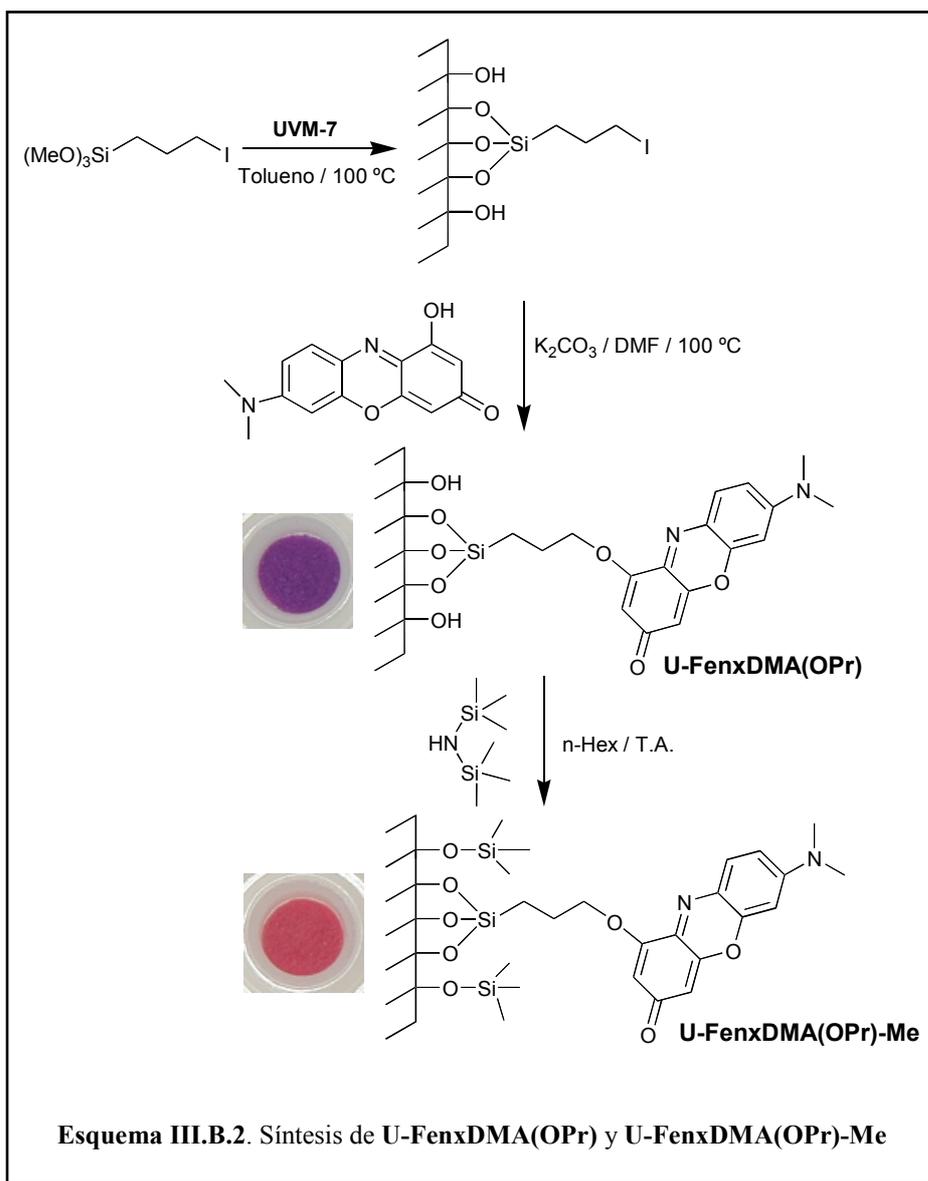


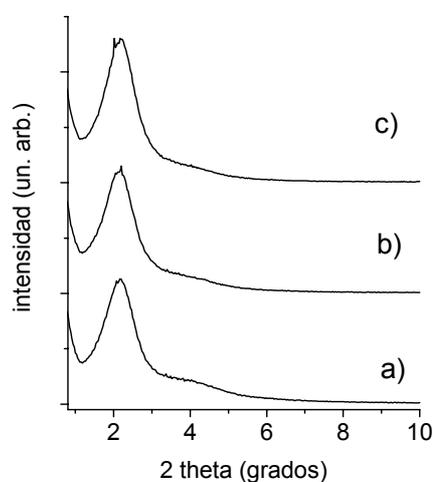
Figura III. X. Espectros de a) ¹H y b) ¹³C RMN para FenxDMA(OPr) en CDCl₃

Síntesis de U-FenxDMA(OPr) y U-FenxDMA(OPr)-Me. Debido a que la obtención del alcóxidosilil derivado correspondiente a partir de FenxDMA(OH) y el IPTES no fue posible mediante el mismo procedimiento que el empleado en fase homogénea como ya se ha comentado, el anclaje se llevó a cabo en dos pasos tal y como se muestra en el Esquema III.B.2. En primer lugar se procede al *grafting* en tolueno del IPTES y en segundo lugar, a la incorporación del colorante.



Para la obtención del material hidrófobo **U-FenxDMA(OPr)-Me** se procede a la pasivación de los grupos silanol que quedan sin reaccionar en el material U-

FenxDMA(OPr) con HMDS en *n*-hexano a temperatura ambiente.⁹ Este reactivo fue elegido debido a la sencillez del procedimiento de sililación, que además requiere condiciones muy suaves de reacción, lo que minimiza la posible degradación del cromóforo o la existencia de reacciones secundarias no deseadas. El cambio de polaridad en el entorno del cromóforo como consecuencia de la hidrofobación del soporte se pone de manifiesto por el cambio de color que se produce, tal y como se muestra en la fotografía del Esquema III.B.2 (de violeta a rosa, indicativo de la disminución de la polaridad y de la existencia de un menor número de grupos silanol en el sólido) y por las bandas características en el espectro de IR de las vibraciones del grupo Si(CH₃)₃, ver Fig. III.B.2.



Los espectros de difracción de rayos X de polvo muestran el patrón de difracción característico de MCM-41, con intensidades del pico de difracción a ángulos $2\theta = 2^\circ$ elevadas incluso tras varias etapas de funcionalización.

Fig. III.B.2. DRX de polvo para a) UVM-7 calcinada, b) U-FenxDMA(OPr) y c) U-FenxDMA(OPr)-Me.

⁹ R. Anwander, I. Nagl, M. Widenmeyer, G. Engelhardt, O. Groeger, C. Palm, T. Röser, *J. Phys. Chem., B*, **2000**, *104*, 3532.

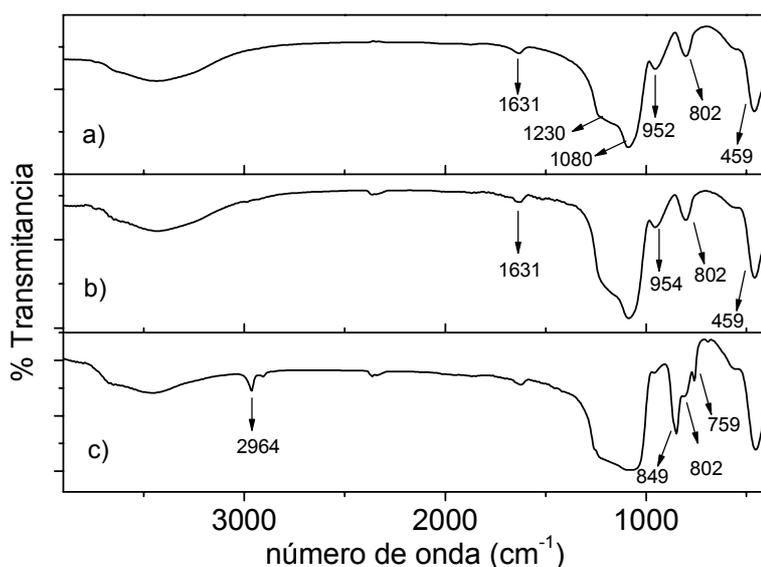
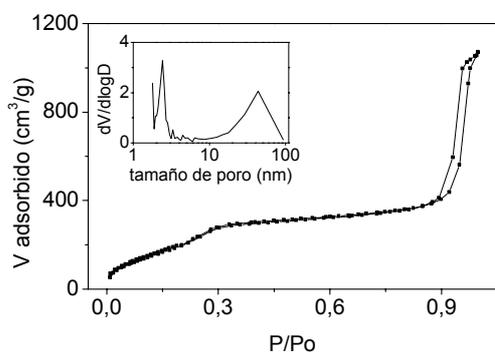


Fig. III.B.3. Espectros de IR para a) **UVM-7** calcinada, b) **U-FenxDMA(OPr)** y c) **U-FenxDMA(OPr)-Me** diluidos con KBr y después de mantener en estufa a 120 °C durante 6 horas.

En la Fig. III.B.3 se muestran los espectros de IR para una **UVM-7** calcinada y los materiales **U-FenxDMA(OPr)** y **U-FenxDMA(OPr)-Me** en KBr. Las bandas pertenecientes a la matriz de sílice aparecen en todos los espectros. Una banda ancha con dos hombros a 1230 y 1080 cm^{-1} perteneciente a la vibración de tensión Si-O y tres bandas más a 952, 802 y 459 cm^{-1} (esta última por la tensión Si-O-Si). La banda ancha en el intervalo 3650-3200 cm^{-1} corresponde a la tensión SiO-H y su intensidad disminuye en el caso del material hidrofobado. Las bandas correspondientes a la vibración del agua que pueda quedar adsorbida aparecen a 3420 y 1631 cm^{-1} . Debido a la baja funcionalización con el cromóforo en el espectro de **U-FenxDMA(OPr)** no aparecen bandas adicionales con respecto a las de **UVM-7**, sin embargo sí que se pueden apreciar claramente en el material hidrofobado las bandas características de $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ (tensión C-H a 2964 cm^{-1} y dos bandas más a 849 y 759 cm^{-1} correspondientes a la vibración esquelética de este grupo. La disminución de los grupos SiOH en el sólido también se aprecia claramente por la disminución de la intensidad de la banda a 952 cm^{-1} con respecto

a las demás (esta banda es la correspondiente a la vibración del grupo SiO-H, que desaparece como consecuencia de la hidrofobación del material).



La isoterma de adsorción-desorción de N_2 para **U-FenxDMA(OPr)-Me** muestra los dos saltos típicos de **UVM-7** a valores de P/P_0 intermedia y alta, que según el método BJH se corresponden con un diámetro de mesoporo de 2.27 nm y de poro textural de 34.8 nm. La aplicación del modelo BET resultó en un valor de superficie total específica de $815 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$.

Fig. III.B.4. Isotermas de adsorción-desorción de N_2 y distribución del tamaño de poro para **U-FenxDMA(OPr)-Me**.

Concentración del cromóforo en el sólido. Debido a la baja funcionalización con los grupos orgánicos y al los elevados errores que se cometen para la estimación en materia orgánica por análisis termogravimétrico en sólidos de tan elevada superficie, se ha preferido hacer una estimación de la carga de colorante en mediante medidas de absorbancia de las suspensiones. Es decir, conocido el coeficiente de absorción molar del compuesto modelo en disolución, **FenxDMA(OPr)**, en un disolvente determinado ($\epsilon_{593\text{nm}} = 3.43 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ en DMSO), se mide la absorbancia de una cantidad conocida (en gramos) del sólido en un volumen determinado del mismo disolvente (DMSO) a la misma longitud de onda (ver Capítulo V, apartado 2.2). A partir de estas medidas, se estima que la concentración del cromóforo en el sólido **U-FenxDMA(OPr)-Me** es de $5.04 \times 10^{-3} \text{ mmol g}^{-1}$.

B.2.3.- Respuesta Frente a Vapores Orgánicos de los Materiales U-FenxDMA(OPr) y U-FenxDMA(OPr)-Me.

El cambio de las propiedades ópticas de los cromóforos en presencia de vapores de disolventes orgánicos es fácilmente apreciable a simple vista. Por ejemplo, en el caso del material hidrofobado **U-FenxDMA(OPr)-Me**, se aprecia un cambio de color instantáneo de rosa a violeta al entrar en contacto con vapores de etanol. Este proceso es total e inmediatamente reversible, es decir, al suprimir el flujo de etanol, se recupera el color rosa inicial y la recuperación es total si el sólido se mantiene en una estufa a 50-60 °C durante un par de minutos. Esta ventaja como sensor, en realidad es un inconveniente a la hora de medir en una celda convencional de un espectrofotómetro de UV-visble, ya que se requiere una circulación continua de vapores a la vez que se registran los espectros de reflectancia difusa o de emisión. Para esto se han diseñado unas cubetas especiales que permiten pasar un flujo continuo de los vapores a través del sólido poroso, pero no ha sido posible su empleo antes de la finalización de esta tesis.

En conclusión se ha presentado una estrategia para la funcionalización de sólidos silíceos mesoporosos con un colorante altamente solvatocrómico. Este material híbrido puede emplearse para la detección óptica de vapores bien mediante cambio de color, bien de fluorescencia, siguiendo un procedimiento rápido y reversible. Además, la refuncionalización de la superficie con distintos grupos orgánicos en una segunda etapa de funcionalización deja la posibilidad abierta para la modulación de la selectividad/sensibilidad del dispositivo para un determinado grupo de vapores.

B.3.- DETECCIÓN DE ANIONES.

B.3.1.-Introducción.

El propósito de este apartado es el reconocimiento de carboxilatos de cadena larga en disolución acuosa basándonos en el sensor molecular **FenxUr** estudiado en el apartado A) de este capítulo. Mediante la combinación de las propiedades espectroscópicas óptimas que presenta el sensor molecular en disolución (cambio de color y aumento de la fluorescencia inducidos por la coordinación de los carboxilatos) y la mejora potencial de la aplicabilidad proporcionada por la inmovilización del sensor molecular en un soporte sólido que puede ser modificado con distintos grupos orgánicos, se pretende obtener la respuesta deseada para la determinación de estos carboxilatos.

Como ya hemos visto en el apartado A), la existencia en la bibliografía de sensores moleculares para carboxilatos de cadena corta (mono- o dicarboxilatos) y benzoatos es abundante. Sin embargo, no se han descrito hasta el momento ejemplos de sensores moleculares ópticos para carboxilatos de cadena larga, que son los aniones de los ácidos grasos. Esto es algo sorprendente, ya que los ácidos grasos libres (*Free Fatty Acids*, FFAs en adelante), en cualquiera de sus formas, neutra o aniónica, son compuestos químicos de una extendida presencia en distintos medios y juegan un papel importante en diferentes áreas. Por ejemplo, la presencia de FFAs en agua permite derivar información sobre la calidad del agua en aguas superficiales contaminadas. Se ha demostrado que los ácidos grasos de cadena larga inhiben la actividad de bacterias metanogénicas, lo que hace que el tratamiento anaeróbico de aguas residuales sea relativamente problemático, ya que estas bacterias juegan un papel crucial en el tratamiento aneróbico de aguas residuales.¹⁰ Estos compuestos además son capaces de afectar al transporte de agua en la atmósfera y a la transferencia de radiación, ya que pueden formar capas monomoleculares sobre la superficie del agua rebajando su tensión superficial, lo que afecta al tamaño de las partículas de aerosol.¹¹ En bioquímica los ácidos carboxílicos de cadena larga y los carboxilatos son algunos de los bioindicadores más prominentes y su papel en varios desórdenes metabólicos y enfermedades

¹⁰ M. Ali, T. R. Sreekrishnan, *Adv. Environ. Res.*, 5, **2001**, 175.

¹¹ W. Seidl, *Atmos. Environ.*, **2000**, 34, 4917.

diabéticas está bien establecido hoy en día.¹² Un aumento en la concentración de FFAs en sangre puede afectar órganos como el hígado o el páncreas. Por ejemplo, se ha demostrado que los FFAs de cadena larga amplifican la secreción de insulina las células pancreáticas¹³ y que su aumento interfiere con la secreción de insulina por el hígado^{12a} y se ha observado en pacientes con diabetes de tipo 2, que las características metabólicas típicas de la resistencia a insulina se caracterizan por el incremento en la concentración de FFA en plasma.¹⁴

Con el fin de obtener la selectividad deseada para los carboxilatos de cadena larga, las “únicas” características funcionales que pueden ser consideradas para estos analitos es su larga cadena alifática (una vez ya tenemos el centro que coordina el grupo carboxilato = urea). La creación de un sensor molecular en el sentido clásico habría supuesto un esfuerzo sintético importante para equipar una molécula como **FenxUr** con un centro coordinante hidrófobo. Una idea similar se describe en un trabajo de 2003, donde se estudia un conjunto de receptores sintéticos que poseen una porfirina de zinc como centro de reconocimiento.¹⁵ Esta porfirina está conectada a sustituyentes alquil/aril, encargados de crear un entorno hidrófobo para la coordinación de una serie de 4-alquil/arilpiridinas en disolución acuosa. Los receptores se enlazan con las piridinas via coordinación del nitrógeno pirimidínico con el centro de Zn^{2+} , encontrando que en disolución acuosa las constantes de enlace aumentan conforme aumenta la longitud de la cadena alifática. El mismo estudio llevado a cabo en un disolvente apolar como el diclorometano, donde no se observa ninguna variación en las constantes de enlace para las diferentes alquilpiridinas, refleja que el aumento de las constantes en la serie obtenida en agua puede ser atribuida únicamente al papel de este disolvente en el proceso de enlace, es decir, a la desolvatación de los grupos alquilo de ambos, el receptor y el sustrato, y al aumento de las interacciones de van der Waals entre los grupos alquilo en agua. Estos estudios parecen indicar que se puede conseguir un entorno hidrófobo ideal para el reconocimiento de grupos alquílicos en agua.

¹² a) J. Saleh, A. D. Sniderman, K. Cianflone, *Clin. Chim. Acta*, **1999**, 286, 163; b) K. Cravajal, R. Moreno-Sánchez, *Arch. Med. Res.*, **2003**, 34, 89.

¹³ I. Ytoh, Y. Kawamata, M. Harada, M. Konayashi, R. Fujil, S. Fukusumi, K. Ogi, M. Hosoya, Y. Tanaka, H. Huejima, H. Tanaka, M. Maruyama, R. Satoh, S. Okubo, H. Kizawa, H. Komatsu, F. Matsumura, Y. Noguchi, T. Shinohara, S. Hinuma, Y. Fujisawa, M. Fujino, *Nature*, **2003**, 422, 173.

¹⁴ G. Perseghin, *Acta Diabetol*, **2001**, 38, 7.

¹⁵ T. Mizutani, K. Kozake, K. Wada, S. Kitagawa, *Chem. Commun.*, **2003**, 2918.

Por otro lado, es interesante considerar cómo la naturaleza da solución a estos problemas. El éxito de muchas proteínas en enlazar fuertemente un sustrato determinado con receptores convencionales que coordinan a través de enlaces de hidrógeno en medio acuoso, se basa en el aislamiento del centro activo que ha de coordinarse al sustrato de las moléculas competidoras de agua. Las regiones activas de una proteína generalmente se embeben en una (super)estructura en la que la entrada del sustrato induce una reorientación de los centros de enlace (= induce el ajuste) y supone un bloqueo del *pocket* y la exclusión del agua, lo que aumenta la estabilidad convencional de los complejos formados a través de enlaces de hidrógeno. Por ejemplo, la resolución estructural mediante difracción de rayos X de una proteína del músculo en humanos, encargada del transporte y almacenamiento de ácidos grasos, revela que la cadena de grupos metileno del ácido carboxílico establece interacciones de van der Waals con átomos de 13 residuos de la proteína y tres moléculas de agua ordenadas, mientras que el grupo carboxilato está localizado en el interior de la proteína, junto con dos moléculas de agua, donde forma enlaces de hidrógeno con residuos de tirosina y arginina.¹⁶

Ciertas arquitecturas, que ya han sido descritas en la introducción de esta tesis (referencias 41, 42 y 45-47, Capítulo I), mimetizan características simples de las estructuras biológicas como las membranas o los canales transportadores de iones a través de la selección de sus propiedades específicas o de su actividad superficial mediante la modulación de las propiedades de ciertos materiales rígidos pero porosos, con funcionalidades orgánicas secundarias de la superficie interna o externa. Debido a su estrecha distribución de tamaño de poro de diámetro controlable en canales dispuestos en una ordenación hexagonal con tamaños de poro considerables, los materiales silíceos de la familia MCM-41 han ganado popularidad en este aspecto. La funcionalización sucesiva permite la incorporación de diferentes unidades orgánicas, produciendo materiales híbridos que pueden ser considerados como un primer paso hacia nanomateriales “biomiméticos”.

Con el fin de dirigir la selectividad del sensor de carboxilatos hacia el grupo de carboxilatos de cadena larga y conseguir la discriminación frente a los carboxilatos análogos de cadena corta y en la medida de lo posible, frente a los de cadena media, la estrategia a seguir es la siguiente. En un primer paso, anclamos la molécula sensora a bajas concentraciones¹⁷ sobre la superficie de la matriz

¹⁶ G. Zanotti, G. Scapin, P. Spadon, J. H. Veerkamp, J. C. Sacchettini, *J. Biol. Chem.*, **1992**, *267*, 18541.

¹⁷ El empleo de pequeñas cantidades de cromóforo evita las interacciones intercromofóricas

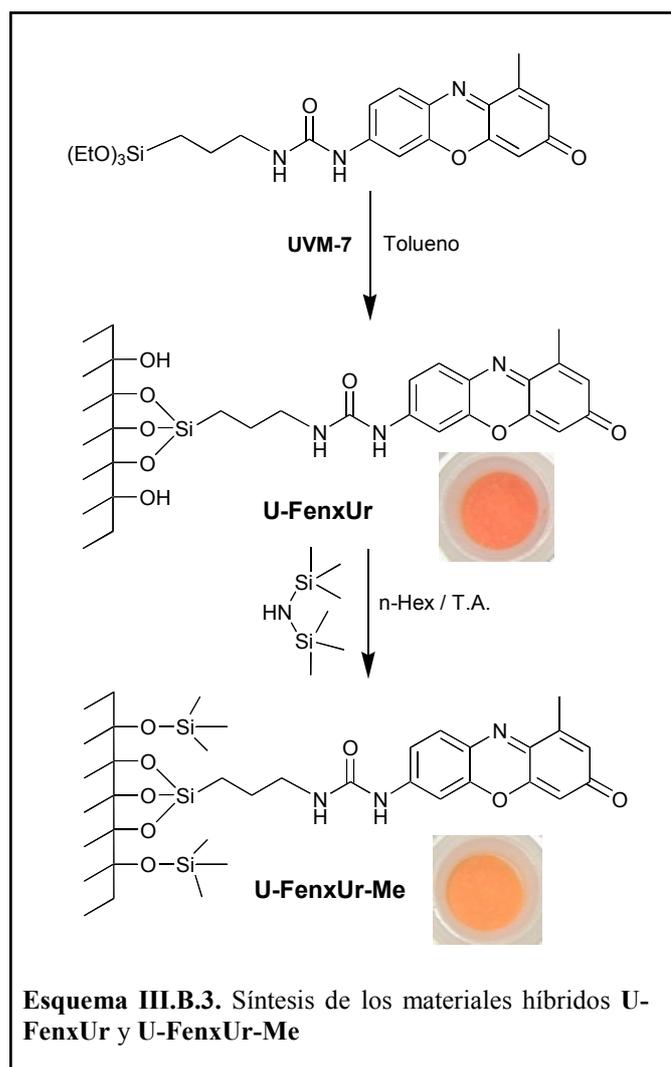
mesoporosa de **UVM-7** y en segundo lugar los grupos activos residuales (SiOH) del material de soporte se funcionalizan con un agente adecuado para crear un entorno particular —el “*pocket*” hidrófobo— en el interior de los poros.

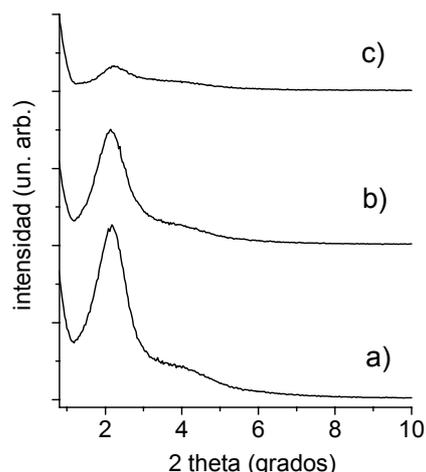
B.3.2.- Estrategias de Síntesis y Caracterización de los Productos.

En primer lugar, como ya hemos comentado, se procede a la inmovilización del sensor molecular en **UVM-7** a bajas concentraciones. Para ello, se requiere la síntesis previa del alcoxisilano apropiado para el anclaje covalente del colorante, **FenxUrTES**, que se obtiene de manera análoga a la descrita para **FenxUr**, a partir de **FenxNH₂** y un exceso del isocianato correspondiente (3-(isocianatopropil)trióxido de silano) en piridina anhidra. Este trialcoxisilano se condensa con los silanoles superficiales de **UVM-7** mediante *grafting* en tolueno anhidro (Esquema III.B.3), obteniéndose como producto un sólido de color naranja, color que permanece incluso tras someterlo a una extracción en Soxhlet con etanol, lo que es indicativo del anclaje covalente del cromóforo.

El segundo paso de la funcionalización se lleva a cabo de manera análoga al descrito para **U-FenxDMA(OPr)** a través de la pasivación de los silanoles remanentes con HMDS en *n*-hexano a temperatura ambiente. En este caso, el cambio en la polaridad del entorno en el sólido también se traduce en un cambio de color, de naranja a amarillo, que se puede apreciar a simple vista (ver Esquema III.B.3).

que podrían dar lugar a la auto-desactivación de la fluorescencia (M. Ganschow, M. Wark, D. Wörle, G. Schulz-Ekloff, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2000**, *39*, 160). Además permite un alto grado de hidrofobación con los grupos metilo.





En este caso, el segundo paso de funcionalización de la mesoestructura causa una disminución significativa en la intensidades de los picos de difracción de rayos X de polvo para **U-FenxUr-Me**. Esta disminución es debida a la nivelación del contraste entre la estructura de sílice y los grupos organosilano anclados.

Fig. III.B.5. DRX de polvo para a) UVM-7 calcinada, b) U-FenxUr y c) U-FenxUr-Me.

En el caso de un material del tipo MCM-41 el aumento o disminución de la intensidad del pico de difracción de rayos X no es necesariamente una indicación de un cambio en la regularidad de la ordenación de los canales. La generación de los picos de difracción de rayos X de polvo resulta de la diferencia en el poder de dispersión entre los dos componentes estructurales (la pared de sílice y los canales) de la estructura de MCM-41. La introducción de grupos orgánicos en los canales puede ocasionar la pérdida de contraste, lo que causa una disminución de la intensidad de los picos.¹⁸ La conservación de la estructura en canales mesoporosos del material hidrofobado se confirma a partir de las isoterma de adsorción-desorción de N₂ (ver Fig. III.B.7).

En los siguientes espectros de IR (Fig. III.B.6) se muestra también la comparación de los materiales híbridos **U-UrFenx** y **U-UrFenx-Me** con el sólido **UVM-7** calcinado. Al igual que en el caso de **U-FenxDMA(OPr)**, la baja funcionalización con el cromóforo no permite apreciar ninguna banda nueva en la segunda etapa de funcionalización, aparte de un pequeño pico en la región de tensión de C-H a 2985 cm⁻¹, y de nuevo se pueden apreciar claramente en el material hidrofobado las bandas características de Si(CH₃)₃ a 2964, 850 y 758 cm⁻¹.

¹⁸ a) B. Marler, U. Oberhagemann, S. Vortmann, H. Gies, *Microporous Mater.*, **1996**, 6, 375 ; b) L. Mercier, T. J. Pinnavaia, *Environ. Sci. Technol.*, **1998**, 32, 2749.

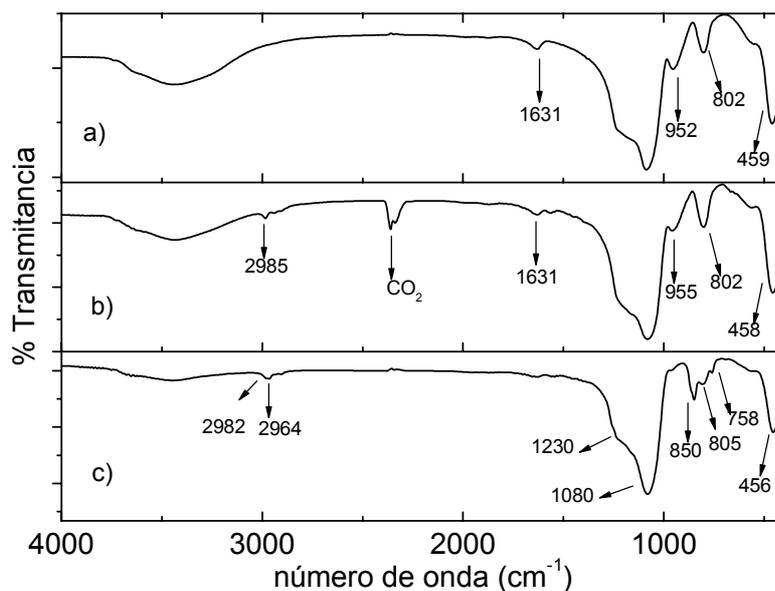


Fig. III.B.6. Espectros de IR para a) UVM-7 calcinada, b) U-FenxUr y c) U-FenxUr-Me.

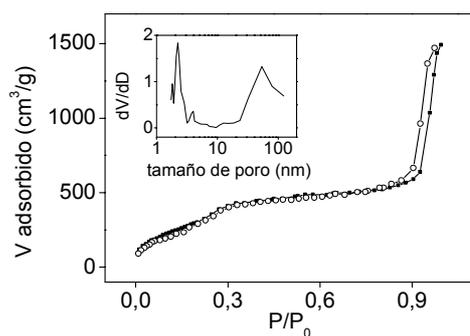


Fig. II.B.7. Isothermas de adsorción-desorción de N₂ y distribución del tamaño de poro para U-FenxUr-Me.

En la Fig. III.B.7 se muestra la isoterma de adsorción-desorción de N₂ para U-FenxUr-Me. De nuevo se aprecian los dos saltos característicos del sólido UVM-7. El de valores de P/P₀ intermedios da un tamaño de poro de 2.4 nm y la condensación del N₂ en los poros de mayor tamaño de 37.4 nm. La superficie específica BET se estima en 1190 m² g⁻¹.

Concentración del cromóforo en el sólido. En este caso también se ha determinado la concentración de cromóforo en el sólido mediante medidas de absorbancia (ver Capítulo V, apartado 2.2). El compuesto modelo utilizado para la determinación del coeficiente de absorción molar fue **FenxUr** ($\epsilon_{483\text{nm}} = 1.35 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Midiendo la absorbancia de una cantidad conocida (en gramos) del sólido en un volumen determinado del mismo disolvente (DMSO) a la misma longitud de onda, se estima que la concentración del cromóforo en el sólido **U-FenxUr-Me** es de $1.21 \times 10^{-2} \text{ mmol g}^{-1}$.

B.3.3.- Propiedades Espectroscópicas de U-FenxUr y U-FenxUr-Me.

En la Fig. III.B.8 se pueden observar los espectros de absorción y emisión para suspensiones de 0.1 mg mL^{-1} en DMSO de ambos materiales, donde se aprecia que la matriz de sílice es ópticamente transparente en la región de longitud de onda de absorción de interés y no dispersa la luz en el caso de los espectros de emisión, ya que ambas bandas son perfectamente superponibles con las del ligando libre en disolución. Es más, la comparación de estos espectros con el de **FenxUr** en el mismo disolvente sugiere que los poros están completamente llenos de DMSO y solvatan bien al cromóforo, que se puede mover libremente en la matriz. Aparentemente, este disolvente con una gran capacidad de solvatación nivela la influencia de las diferentes polaridades de la matriz mesoporosa. Esto se confirma además con los datos espectroscópicos de la Tabla III.B.1 en DMSO para las tres especies, en las que además se observa que el rendimiento cuántico de fluorescencia es el mismo para los dos materiales y el ligando en disolución.

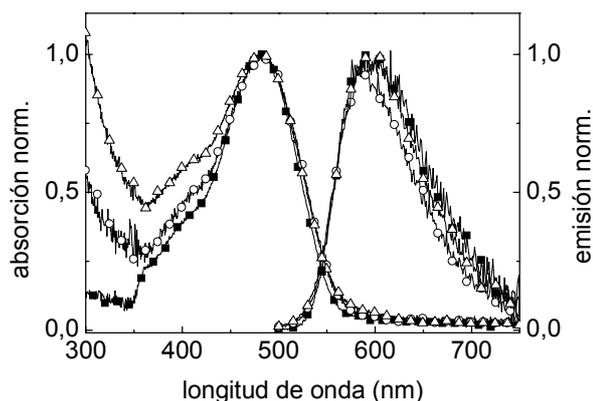


Fig. III.B.8. Espectros de absorción y emisión (intensidad normalizada a 1 con respecto al máximo) para (■) **FenxUr** (○) **U-FenxUr** y (Δ) **U-FenxUr-Me** en DMSO.

Como ya se ha comentado, la espectrofotometría de UV/Vis fue empleada para estimar la carga del colorante en el material final mediante comparación de la absorbancia molar de **FenxUr** y **U-FenxUr-Me** en DMSO. El análisis cuantitativo de los espectros de absorción medidos para suspensiones de **U-FenxUr-Me** permite estimar el contenido de colorante en 1.21×10^{-2} mmol por gramo de sólido. Teniendo en cuenta el valor del área específica estimada por BET, el recubrimiento de grupos activos se estima en una unidad de **FenxUr** por cada 165 nm^2 o una molécula cada 13 nm (los cálculos se realizan de manera análoga a los descritos para la Tabla III.B.1 en el Capítulo II). A pesar de que una mayor concentración de cromóforo en los materiales podría conducir a una mayor sensibilidad en el proceso de medida, no se consideró oportuno preparar materiales con cargas superiores de cromóforo ya que existe la posibilidad de que existan procesos de transferencia de energía en los sólidos que resultarían en la auto-desactivación de la fluorescencia.¹⁹

¹⁹ Esta observación se basa en las experiencias realizadas por Ganschow y colaboradores en la referencia 17, que indican que para 0.07 mmol de colorante (un derivado de rodamina) por 2.4 g de TEOS (ó 0.1 mmol de colorante por g de SiO_2) se observa una disminución en la intensidad de fluorescencia del 50 % en los sólidos (lo que traduciéndolo en distancias intercromofóricas se corresponde con una separación de 6-7 nm), y lo atribuyen a procesos de transferencia de energía.

Tabla III.B.1. Datos espectroscópicos para **FenxUr** y suspensiones de los materiales **U-FenxUr** y **U-FenxUr-Me** en DMSO.

| | $\lambda_{\text{abs}}(\text{máx}) / \text{nm}$ | $\lambda_{\text{em}}(\text{máx}) / \text{nm}$ | Φ_f |
|--------------------|--|---|----------|
| FenxUr | 482 | 595 | 0.024 |
| U-FenxUr | 483 | 589 | 0.024 |
| U-FenxUr-Me | 481 | 594 | 0.026 |

B.3.4.- Respuesta de los Materiales **U-FenxUr** y **U-FenxUr-Me** Frente a Varios Carboxilatos.

El comportamiento similar de los dos materiales y el ligando en disolución en un disolvente como el DMSO que “enmascara” el efecto de la distinta polaridad de las matrices silíceas se pone de manifiesto también el la respuesta similar de los sensores frente a diversos carboxilatos. Así, en la Tabla III.B.2 se puede ver que el aumento de la intensidad de fluorescencia para ambos sólidos y para **FenxUr** en DMSO es prácticamente el mismo para la adición de una misma cantidad de anión.

Tabla III.B.2. Aumento de la fluorescencia para **FenxUr** y suspensiones de **U-FenxUr** y **U-FenxUr-Me** tras la adición de acetato y glucuronato ($c_{\text{anión}} = 6 \text{ mM}$) en DMSO.

| | $I_{\text{LA}}/I_{\text{L}}^a$ (A=AcO ⁻) | $I_{\text{LA}}/I_{\text{L}}$ (A=GluO ⁻) |
|--------------------|--|---|
| FenxUr | 5.4 | 1.8 |
| U-FenxUr | 3.8 | 1.7 |
| U-FenxUr-Me | 4.3 | 1.6 |

^a Intensidad relativa de fluorescencia, donde I_{LA} hace referencia a la intensidad tras la adición del anión A e I_{L} a la intensidad del ligando o del material antes de añadir el anión.

Ensayos en Disolución Acuosa. Al realizar los ensayos en medio acuoso, la polaridad opuesta de ambos materiales se pone de manifiesto de manera obvia. Así por ejemplo, mientras el sólido hidrófilo **U-FenxUr** se dispersa fácilmente en agua, el material bifuncionalizado altamente lipofílico repele el agua y permanece

flotando sobre ésta (ver Fig. III.B.9, a). Los efectos más impresionantes se obtienen al añadir disoluciones de varios carboxilatos. Al igual que en el caso del ligando en disolución **FenxUr**, para el que la energía de solvatación del agua es demasiado elevada para competir por la coordinación de los aniones, el material hidrófilo en el que el agua difunde perfectamente al interior de los canales, permanece “en silencio” frente a la adición de los distintos carboxilatos (ver Fig. III.B.10 y Tabla III.B.3). Por el contrario, **U-FenxUr-Me** es capaz de responder a cierto tipo de carboxilatos. En un simple ensayo en una cubeta puede apreciarse fácilmente y a simple vista una reacción positiva. Si la coordinación con el anión tiene lugar, el sólido que permanecía flotando en el agua se hunde rápidamente, al mismo tiempo que se observa un cambio de color y un aumento de la fluorescencia.

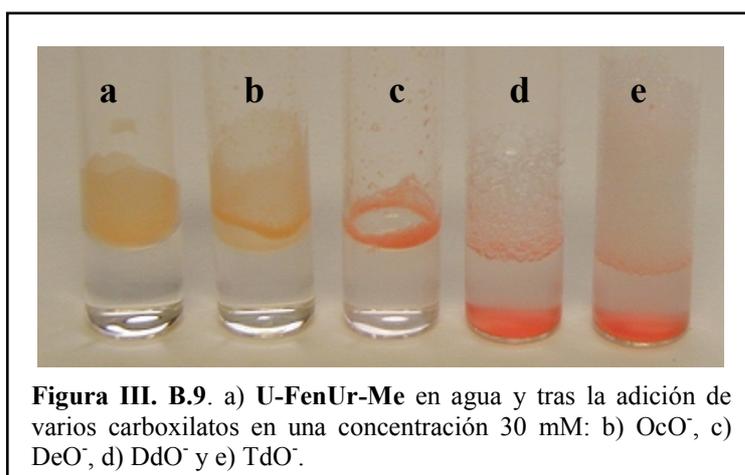


Figura III. B.9. a) **U-FenUr-Me** en agua y tras la adición de varios carboxilatos en una concentración 30 mM: b) OcO^- , c) DeO^- , d) DdO^- y e) TdO^- .

Es más, en la Fig. III.B.9 y la Tabla III.B.3 se observa cómo **U-FenxUr-Me** muestra la selectividad deseada frente a otros carboxilatos. Mientras que analitos tales como el dodecanoato (C12) o el estearato (C16) inducen un cambio de color analíticamente favorable de naranja a rosa acompañado de un aumento significativo de la fluorescencia (Fig. III.B.10), las sales sódicas de los carboxilatos de cadena corta y media (desde 2 átomos de carbono hasta 8), así como los ácidos aromáticos polihidroxílicos o policarboxílicos (citrate, glucuronate) no dan ninguna respuesta (ver Tablas III.B.10 y 11). El carboxilato con 10 átomos de

carbono parece el punto de transición de la serie, ya que sólo ofrece una respuesta parcial, cambia de color pero no llega a hundirse totalmente en el agua.²⁰

Tabla III.B.3. Resultados obtenidos para ensayos en agua con los materiales **U-FenxUr** y **U-FenxUr-Me** con sales de ácidos carboxílicos de diferente longitud de cadena.

| $X^+ RCOO^-$ ^a | U-FenxUr | | U-FenxUr-Me | |
|------------------------------|-----------------|-------------------|--------------------|-------------------|
| | respuesta | <i>c</i> (mM) | respuesta | <i>c</i> (mM) |
| $NBu_4^+ AcO^-$ ^b | – ^c | 7 | – | 30 |
| $Na^+ BuO^-$ | – | 7 | – | 30 |
| $Na^+ HeO^-$ | – | 7 | – | 30 |
| $Na^+ OcO^-$ | – | 7 | – | 30 |
| $Na^+ DeO^-$ | – | 7 | (+) ^c | 30 |
| $Na^+ DdO^-$ | – | 30 | + ^c | 30 |
| $Na^+ TdO^-$ | – | 7 | + | 30 |
| $Na^+ HdO^-$ | – | N.S. ^d | + | N.S. ^e |
| $Na^+ OdO^-$ | – | N.S. ^d | + | N.S. ^e |

^a AcO^- = acetato, BuO^- = butanoato, HeO^- = hexanoato, OcO^- = octanoato, DeO^- = decanoato, DdO^- = dodecanoato, TdO^- = tetradecanoato, HdO^- = hexadecanoato, OdO^- = octadecanoato.

^b No se observa ningún efecto del contraión para los acetatos de NBu_4^+ , NMe_4^+ , Rb^+ , K^+ , Na^+ or Li^+ .

^c Los símbolos – , (+) y + hacen referencia a una respuesta negativa, respuesta parcial (débil) y respuesta claramente positiva, respectivamente.

^d Sal no soluble en agua.

^e N.S.= no soluble. Al no ser soluble se añadió directamente un poco de la sal sólida la suspensión de **U-FenxUr-Me**, tras lo que se observa una respuesta + al irse extrayendo poco a poco el anión en el sólido.

Aparentemente, únicamente los aniones suficientemente hidrófobos son extraídos en el material debido a las fuertes interacciones no covalentes con el sólido. Es más, no se observa únicamente una modulación en la selectividad por el efecto de la inclusión del ligando en un entorno hidrófobo en un sistema de poros

²⁰ Para procedimientos de medida y cantidades de sólido empleadas, ver el Capítulo IV, apartado 2.2.

nanoscópicos, si no que el sistema completo muestra un aumento de la sensibilidad con respecto a **FenxUr** en DMSO (ver constantes para la interacción con distintos carboxilatos en la Tabla III.B.5).

En lo que respecta a los requerimientos para un sensor de carboxilatos de ácidos grasos, la suma de los parámetros de la concentración de aniones de FFAs revela información suficiente sobre el problema analítico en muchos casos. Sin embargo, y especialmente en el caso de problemas clínicos particulares relacionados con el uso dietético de ácidos grasos de longitud media de cadena, la discriminación entre carboxilatos de más o menos de 10 átomos de carbono en la cadena sería deseable. Por ejemplo, los triacilgliceroles de cadena de longitud media (*Medium Chain Triacylglycerols*, MCTs), que son lípidos que consisten principalmente en ácidos grasos de 8 y 10 carbonos, se propusieron como agentes para rebajar peso y para la reducción del riesgo de enfermedades cardiovasculares.²¹ Es más, parece ser que las dietas basadas parcialmente en MCTs son una herramienta importante en el tratamiento de varias enfermedades relacionadas con malfunciones del metabolismo de lípidos tales como la hipertrigliceridemia o la pancreatitis.²² En todos los casos las dietas especiales se basan en la sustitución de los ácidos grasos de cadena larga por los de cadena media, lo que genera nuevas cuestiones analíticas²³ como la discriminación entre ácidos grasos de cadena larga y media por un lado y de cadena larga por otro lado. Algo que, tal y como se puede apreciar en la Fig. III.B.9, es posible con el empleo de **U-FenxUr-Me**.

Hay que tener en cuenta que **U-FenxUr-Me** ha sido diseñado como un sensor para las sales de carboxilatos de cadena larga. La primera cuestión de aplicabilidad del sensor por tanto concierne al estado de disociación de los analitos. Es importante entonces recordar que éstos son ácidos débiles, con un pK_a de 4.75–5 y a pH fisiológico tan sólo un 0.4 % de los ácidos grasos del plasma existen en forma protonada.²⁴

²¹ a) M. Kern, N. D. Lagomarcino, L. M. Misell, V. Schuster, *J. Nutr. Biochem.*, **2000**, *11*, 288; b) M.-P. St-Onge, B. Lamarche, J.-F. Mauger, P. J. H. Jones, *J. Nutr.*, **2003**, *133*, 1815.

²² a) A. C. Bach, Y. Ingenbleek, A. Frey, *J. Lipid Res.* **1996**, *37*, 708. J. Kobayashi, I. Nagashima, K. Taira, M. Hikita, K. Tamura, H. Bujo, N. Morisaki, Y. Saito, *Clin. Chim. Acta*, **1999**, *285*, 173.

²³ G. Mingrone, A. V. Greco, E. Capristo, G. Benedetti M. Castagneto, G. Gasbarrini, *Clin. Chim. Acta*, **1995**, *240*, 195.

²⁴ W. Schmider, A. Fahr, R. Voges, W. Gerok, G. Kurz, *J. Lipid Res.*, **1996**, *37*, 739.

Por otro lado, es importante señalar que no se observan efectos del contraión en la selectividad del analito cuando se emplean cationes más lipofílicos como NEt_4^+ o NBu_4^+ . No se apreciaron cambios en las características de la señal del DdO^- , ni que la presencia de dichos cationes facilitase el reconocimiento de carboxilatos de cadena corta o media, como el acetato o el hexanoato. Estos resultados evidencian una vez más el hecho de que los carboxilatos de que cadenas alquílicas de mayor longitud son necesarias para inducir la reacción de enlace de los carboxilatos.

Además de a los carboxilatos saturados de cadena larga, el sensor ofrece una respuesta positiva a carboxilatos insaturados derivados del ácido oleico, C-18 (ver Tabla III.B.4). La posibilidad de reconocer estos sustratos en disolución acuosa puede resultar interesante ya que la presencia de ácidos grasos insaturados C-16 y C-18 como los ácidos linoleico y linolénico que provienen de la pulpa del papel son una fuente de toxicidad en aguas para peces.¹⁰

Tabla III.B.4. Resultados obtenidos para ensayos en agua con los materiales **U-FenxUr** y **U-FenxUr-Me** con diferentes carboxilatos.

| $\text{X}^+ \text{RCOO}^-$ ^a | U-FenxUr | | U-FenxUr-Me | |
|--|-----------------|---------------|--------------------|-------------------|
| | respuesta | <i>c</i> (mM) | respuesta | <i>c</i> (mM) |
| $\text{Na}^+ \text{BzO}^-$ | – | 7 | – | 30 |
| $\text{Na}^+ \text{SalO}^-$ | – | 7 | – | 30 |
| $\text{Na}^+ \text{GluO}^-$ | – | 7 | – | 30 |
| $3 \text{Na}^+ \text{CitrO}^{3-}$ | – | 7 | – | 30 |
| $\text{Na}^+ c\text{-OdO}^-$ | – | 7 | + | 30 |
| $\text{Na}^+ c,c\text{-OdO}^-$ | – | 7 | + | 30 |
| $\text{K}^+ t\text{-OdO}^-$ (pH 10.7) ^b | – | 7 | + | “30” ^c |

^a BzO^- = benzoato, SalO^- = salicilato, GluO^- = glucuronato, CitrO^{3-} = citrato, $c\text{-OdO}^-$ = oleato, $c,c\text{-OdO}^-$ = lioleato, $t\text{-OdO}^-$ = elaidato.

^b Como la sal sódica o potásica del ácido eláidico no es comercial, fue necesaria la previa neutralización del ácido con KOH 1 M.

^c La sal no es totalmente soluble, pero se añade un poco de la suspensión en una cantidad que equivaldría a una concentración 30 mM.

En la siguiente figura (III.B.10) se muestra la diferencia clara que existe en la respuesta que ofrecen los materiales **U-FenxUr** y **U-FenxUr-Me** en agua. Mientras que el sólido polar **U-FenxUr** tras la adición de dodeciloato sódico (fotografía C) permanece exactamente igual que el mismo sólido en ausencia del anión (fotografía B), el incremento en la fluorescencia del sólido hidrofobado **U-FenxUr-Me** tras la adición del dodeciloato es evidente (A).

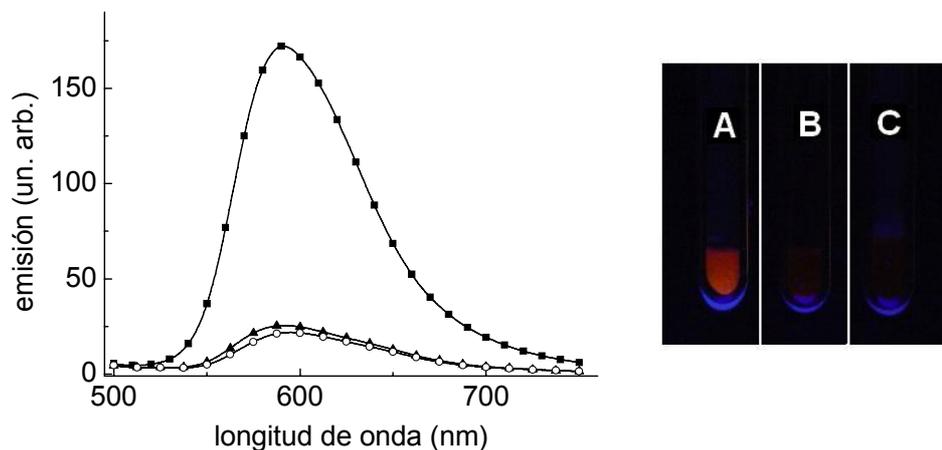
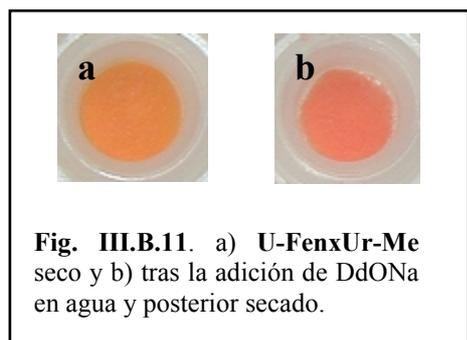


Fig. III.B.10. Espectros de emisión para (■) **U-FenxUr-Me** tras la adición de NaDdO (30 mM) en agua y (▲) **U-FenxUr** en agua y (○) tras la adición de NaDdO (30 mM) en agua ($\lambda_{exc} = 475$ nm). La foto muestra los correspondientes resultados (A) **U-FenxUr-Me** / NaDdO, (B) **U-FenxUr** y (C) **U-FenxUr** / NaDdO en las mismas cubetas empleadas para la medida de los espectros.

La respuesta similar de **U-FenxUr-Me** y **FenxUr** en DMSO frente a los diferentes carboxilatos y la distinta respuesta de los sólidos en agua, claramente sugiere que en el último caso la combinación de dos fuerzas activas i) por enlace de hidrógeno en el proceso de reconocimiento a través del grupo urea (induciendo el desplazamiento al rojo y el aumento de fluorescencia) y ii) las interacciones no covalentes (“interacciones hidrófobas”, posibilitando la discriminación de los distintos carboxilatos) son las responsables de la interacción efectiva en agua. Valoraciones llevadas a cabo con **U-FenxUr-Me** y varios carboxilatos en agua apoyan estos supuestos. Cuando se representa la integral de fluorescencia vs. la concentración del carboxilato añadido se obtiene una curva del tipo de la mostrada en la Fig. III.B.13.



El aumento de fluorescencia y cambio de color inducidos por la extracción y coordinación de los carboxilatos en el sólido se puede apreciar incluso en los materiales secos tras filtrar la disolución acuosa que contiene el anión.

Las constantes de adsorción para la interacción de **U-FenxUr-Me** con DdO^- , TdO^- , $c\text{-OdO}^-$ y $c,c\text{-OdO}^-$ en agua fueron determinadas llevando a cabo un análisis de los datos obtenidos de las valoraciones por fluorescencia a partir de una ecuación derivada de la isoterma de Langmuir (ecuación (1), ver Apéndice para la deducción), de forma similar al descrito en el Capítulo II para los sólidos funcionalizados con antraceno. La ecuación da un ajuste del tipo mostrado en la Fig. III.B.13 para a) **U-FenxUr-Me**- DdO^- y b) **U-FenxUr-Me**- $c\text{-OdO}^-$.

$$I = I_L \frac{Kc}{1 + Kc} \quad ; \quad c = \frac{-\left\{\frac{1}{K} + \frac{n_M}{V} - c_0\right\} + \sqrt{\left(\frac{1}{K} + \frac{n_M}{V} - c_0\right)^2 + \frac{4c_0}{K}}}{2} \quad (1)$$

Aquí K es la constante de adsorción (que tiene en cuenta la interacción entre el carboxilato y los centros de reconocimiento anclados en el sólido) e I e I_L son las intensidades de fluorescencia observadas para una cierta concentración de anión y en presencia de un exceso de anión (el valor límite), respectivamente. c_0 es la sal añadida en mol L^{-1} y n_M la cantidad máxima de anión que puede ser adsorbida en la monocapa en moles. V representa el volumen de la suspensión (en L).

Las constantes determinadas se muestran en la Tabla III.B.5, y el incremento en la K muestra los efectos sinérgicos de las interacciones hidrófobas y por enlace de hidrógeno. Es destacable el hecho de que estas constantes de enlace son significativamente mayores que la constante para **FenxUr**- AcO^- en DMSO ($\log K = 2.12$). Los tiempos de respuesta son cortos (la respuesta es prácticamente

instantánea, basta con agitar la cubeta manualmente un par de veces para la homogeneización de la suspensión tras la adición de cada paso de analito para obtener una señal estable) y el proceso de reconocimiento en sí mismo es reversible (si se deja decantar el sólido en el fondo de la cubeta y se lava un par de veces por enjuague con agua destilada se observa de nuevo una disminución en la fluorescencia como consecuencia de la eliminación del analito).

Tabla III.B.5. Constantes de adsorción ($\log K$) para **U-FenxUr-Me** y varios carboxilatos de cadena larga en agua a 298 K.

| Carboxilato | DdO ⁻ | TdO ⁻ | <i>c</i> -OdO ⁻ | <i>c,c</i> -OdO ⁻ |
|-------------|------------------|------------------|----------------------------|------------------------------|
| $\log K^a$ | 2.52 ± 0.12 | 3.32 ± 0.08 | 4.320 ± 0.014 | 4.36 ± 0.14 |

^a Las constantes fueron determinadas como una media de dos experimentos diferentes para cada carboxilato.

Los resultados obtenidos son comparables a los descritos para uno de los receptores sintéticos de la referencia 15 que se basa en una porfirina de Zn²⁺ conectada a varios sustituyentes alquílicos. La determinación espectrofotométrica de las constantes de la interacción del receptor con la serie de alquilpiridinas, en la que se varía la longitud de la cadena alifática, pone de manifiesto que la interacción es más favorable conforme aumenta la longitud de la cadena. Llegando incluso a obtener incrementos en unidades del logaritmo de K superiores a 1 para cada incremento de 2 grupos metileno en la cadena. Lo que confirma de nuevo la importancia de las interacciones por fuerzas de van der Waals en disolución acuosa.

A partir de los datos obtenidos mediante la espectroscopía de fluorescencia en el estado estacionario se estima el límite de detección en < 0.1 mM para DdO⁻ y en < 0.02 mM para *c*-OdO⁻.

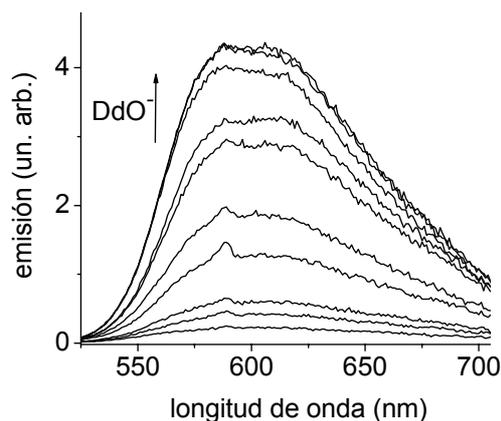


Fig. III.B.12. Espectros de emisión correspondientes a la valoración de la Fig. III.B.13 a) para **U-FenxUr-Me** con dodeciloato sódico en agua ($\lambda_{\text{exc}} = 475 \text{ nm}$).

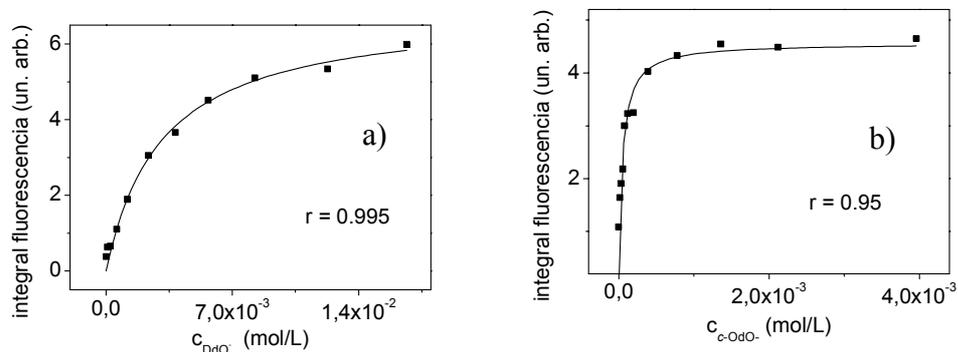


Figura III.B.13. Curva de calibrado para una valoración de **U-UrFenx-Me** con a) NaDdO y b) Nac-OdO en agua ($\lambda_{\text{exc}} = 475 \text{ nm}$). La línea continua muestra el ajuste obtenido con la ecuación (1).

Es también destacable el paralelismo que existe entre las características de reconocimiento de **U-FenxUr-Me** vs. **U-FenxUr** y la actividad biológica de ciertas alcohol deshidrogenasas (ADHs). Los carboxilatos de cadena larga, en concentraciones milimolares, aumentan la actividad de ADH de clase III hasta 30 veces. La importancia del efecto está positivamente relacionada con la longitud de la especie aniónica activadora.²⁵ Es más, sobre los distintos tipos de ADHs la actividad enzimática frente al etanol está directamente relacionada con la hidrofilia y el tamaño de la cavidad del *pocket* del sustrato de la enzima. Por tanto, para la

²⁵ J.-M. Moulis, B. Holmquist, B. L. Vallee, *Biochemistry*, **1991**, *30*, 5743.

clase III de ADH con el *pocket* de mayor tamaño y más hidrofílico, el agua compite más eficazmente con el etanol y es necesaria la ayuda de (co-)sustratos de cadena larga, más hidrófobos, para desplazar las moléculas de agua y facilitar la conversión de las moléculas de etanol. Este efecto sólo es encontrado para carboxilatos, no para su forma neutra de ácidos grasos.

Las características de respuesta de **U-FenxUr-Me** son similares en todos los casos de cadena larga, es decir, el mencionado cambio de color y la amplificación de la fluorescencia. Para elucidar si la fuerza determinante de las diferentes constantes de enlace —que varían en casi dos órdenes de magnitud entre los dos extremos, DdO^- y $c,c\text{-OdO}^-$ — es el efecto de extracción en **U-FenxUr-Me** como el *pocket* hidrófobo o una diferencia en la fuerza de la interacción por enlace de hidrógeno entre el carboxilato y el centro receptor de la urea, se llevaron a cabo experimentos de fluorescencia resuelta en el tiempo. Si el evento de reconocimiento por enlace de hidrógeno es el responsable de la diferencia, los tiempos de vida de fluorescencia de los complejos también deberían mostrar valores claramente distintos.

Antes de discutir los resultados que se muestran en la Tabla III.B.6, es importante señalar que los decaimientos de fluorescencia de **U-FenxUr**, así como de las distintas mezclas de **U-FenxUr-Me** y los carboxilatos en agua no muestran un comportamiento estrictamente monoexponencial cuando se aplican modelos discretos para la deconvolución de los datos. Cuando se intentan ajustar los decaimientos a tiempos de vida discretos, se han de emplear al menos dos especies para obtener ajustes satisfactorios. Esto no es sorprendente, ya que presumiblemente las moléculas sensoras individuales se encuentran localizadas en una amplia variedad de microambientes ligeramente diferentes. Por tanto, se puede emplear un análisis de la distribución de los tiempos de vida.²⁶ Este modelo se basa en la suposición de que en el ensamblaje el emisor molecular muestra una distribución casi continua de tiempos de vida u órdenes de reacción.²⁷ Ejemplos representativos de los ajustes se dan en la Fig. III.B.14. Dicha distribución de tiempos de vida normalmente muestra un pico que corresponde al tiempo de vida

²⁶ El análisis de los tiempos de vida de fluorescencia fue llevado a cabo por el Dr. Knut Rurack, siguiendo un procedimiento similar al descrito en K. Rurack, K. Hoffmann, W. Al-Soufi, U. Resch-Genger, *J. Phys. Chem. B*, **2002**, 106, 9744.

²⁷ Casi-continuo se refiere al número finito de tiempos de vida individuales con el que el software empleado permite ajustar a un conjunto de datos dado. En este caso se obtuvieron los mejores resultados incluyendo el número máximo de tiempos de vida que permitía el programa.

medio $\langle \tau \rangle$ (o centro de gravedad) de unas ciertas especies preferidas o situación del entorno. La anchura de la función es por tanto una medida de la microheterogeneidad alrededor de las especies emisivas.

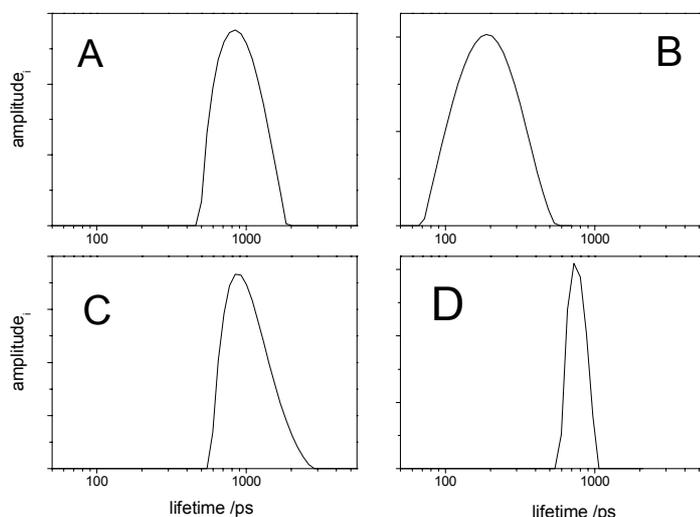


Fig. III.B.14. Análisis de la distribución de tiempos de vida de fluorescencia para (A) **U-FenxUr-Me-c,c-OdO⁻** en agua ($\langle \tau \rangle = 880 \pm 270$ ps), (B) **U-FenxUr** en agua ($\langle \tau \rangle = 200 \pm 80$ ps), (C) **U-FenxUr-Me-DdO⁻** en agua ($\langle \tau \rangle = 850 \pm 300$ ps), y (D) **FenxUr-AcO⁻** en DMSO ($\langle \tau \rangle = 700 \pm 90$ ps). Por comparación, un ajuste de **FenxUr** en agua da un $\langle \tau \rangle = 140 \pm 30$ ps. Para todos los ajustes se empleó el número máximo de tiempos de vida ($N = 100$) que permitía el programa. $\chi^2 < 1.2$ en todos los casos. Los datos en D dan un χ^2 igualmente bueno cuando se ajustan con un único exponencial.

Los datos de tiempo de vida recogidos en la Tabla III.B.6 revelan que la longitud de cadena del carboxilato únicamente presenta un efecto menor en este parámetro. De acuerdo con esto, las diferentes constantes de enlace parecen estar principalmente determinadas por las fuerzas que gobiernan la toma de los distintos carboxilatos por el material y de la fuerza de la interacción hidrófoba. En base a los resultados descritos hasta ahora, es razonable asumir que el proceso de reconocimiento de **U-FenxUr-Me** sigue el modelo que se muestra en la Fig. III.B.15. Siempre que los carboxilatos de cadena larga están presentes en disolución acuosa, pueden existir como monómeros o en forma micelar. Estas micelas se encuentran en un proceso dinámico de ensamblaje y desensamblaje y pueden extraerse en la región hidrófoba del sólido. Debido al tamaño de los poros

y, para la compensación de la carga, no se extraen únicamente los carboxilatos de cadena larga, sino que también pueden entrar en los poros los contraiones y moléculas de disolvente. El último paso de la figura puede racionalizarse como la interacción de la cola alifática con las paredes hidrófobas del material. En esta región microscópica de (presumiblemente) bajo contenido en agua, la reacción mediada por el enlace de hidrógeno entre el grupo receptor de la sonda fluorescente y el grupo carboxilato se ve entonces facilitada, conduciendo a la generación de la señal. Esta hipótesis se ve confirmada por una de las entradas en la Tabla III.B.3 que requiere de una atención especial, **U-FenxUr-Me-DeO⁻**. A pesar de que para este analito, el hundimiento del material en la disolución apenas es apreciable, y la debilidad de la reacción no permite obtener una constante de enlace a partir de los datos de fluorescencia, los datos obtenidos a partir de los experimentos de fluorescencia resuelta en el tiempo permitieron detectar dos picos en la distribución de tiempo de vida para elevadas concentraciones del analito, uno correspondiente al colorante libre (*ca.* 200 ps, similar al obtenido para **U-FenxUr** en agua) y un segundo pico menor con las características mostradas en la Tabla III.B.6, correspondiente al complejo con el anión. El tiempo de vida medio de 770 ps en este caso sugiere que, a pesar de que tan solo una pequeña fracción de DeO⁻ es tomada por el sólido, la coordinación y la emisión de señal tienen lugar en un modo similar. Aparentemente, el parámetro decisivo aquí es la fuerza de la adsorción de la cola alifática sobre la pared hidrófoba.

Tabla III.B.6. Tiempos de vida de fluorescencia para **U-FenxUr** y los complejos de **U-FenxUr-Me** con carboxilatos de cadena larga en agua a 298 K.

| | $\langle \tau \rangle$ /ps |
|---|----------------------------|
| U-FenxUr | 200 ± 80 |
| U-FenxUr-Me-DeO⁻ | 770 ± 320 |
| U-FenxUr-Me-DdO⁻ | 850 ± 300 |
| U-FenxUr-Me-TdO⁻ | 830 ± 310 |
| U-FenxUr-Me-HdO⁻ | 760 ± 350 |
| U-FenxUr-Me-OdO⁻ | 720 ± 370 |
| U-FenxUr-Me-<i>c</i>-OdO⁻ | 860 ± 310 |
| U-FenxUr-Me-<i>t</i>-OdO⁻ | 610 ± 380 |
| U-FenxUr-Me-<i>c,c</i>-OdO⁻ | 880 ± 270 |

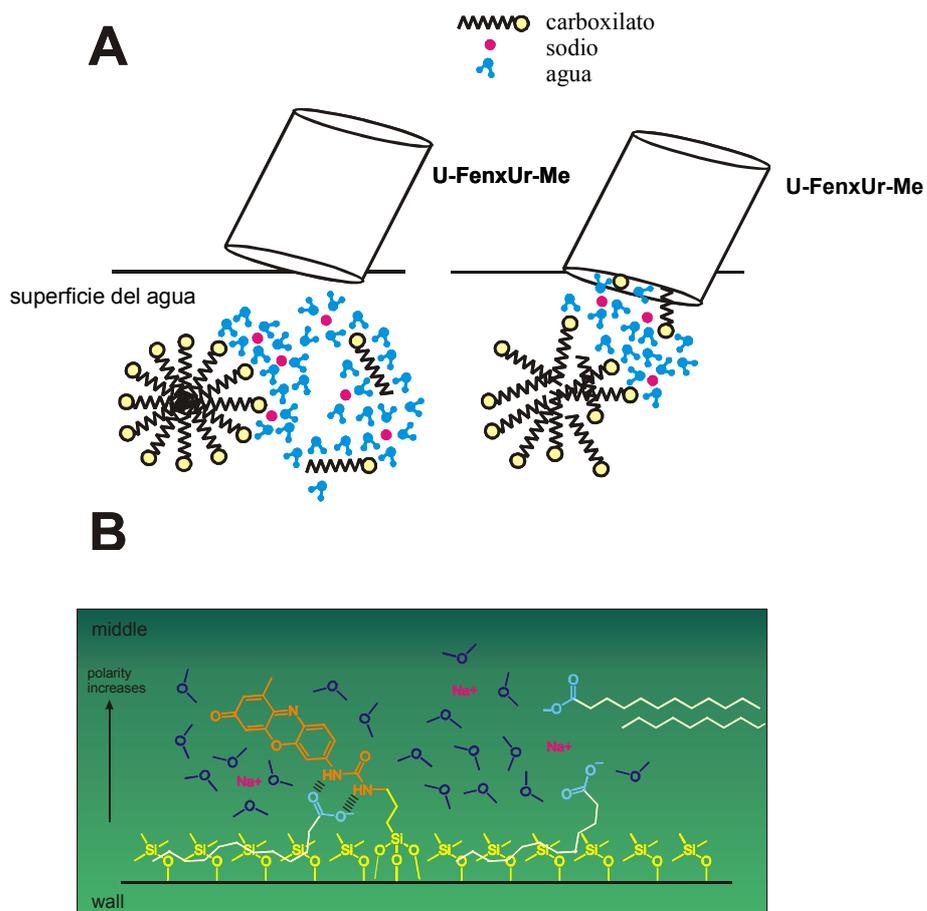


Fig. III.B.15. Modelo representativo del posible modo de interacción de los carboxilatos de cadena larga con el material sensor en disolución acuosa. En **A** se representa el desensamblaje de las micelas y su extracción en los canales hidrófobo de **U-FenxUr-Me** y en **B** el interior de uno de los canales donde tiene lugar la interacción mediante enlaces de hidrógeno entre el grupo polar del carboxilato y la urea del cromóforo, mientras que la cadena alifática permanecería interaccionando con la superficie de la pared, recubierta de grupos metilo, mediante interacciones de van der Waals.

B.3.5.- Estudio de la Respuesta de U-FenxUr y U-FenxUr-Me frente a Varios Interferentes.

Como ya se ha visto, únicamente los carboxilatos de cadena alifática de una cierta longitud (más hidrófobos) son extraídos de la fase acuosa en el sólido refuncionalizado y son capaces de dar una respuesta positiva al coordinar con la urea. Para confirmar que otras especies que pueden existir en los entornos donde normalmente se pueda requerir la determinación de ácidos grasos, como pueden ser muestras biológicas o alimentos, se ha realizado un estudio de interferentes potenciales que podrían existir en estos entornos. En las Tablas III.B.7 y III.B.8 se incluyen los resultados obtenidos para suspensiones de **U-FenxUr** y **UFenxUr-Me** en medio acuoso.

Tabla III.B.7. Resultados obtenidos para ensayos en agua con los materiales **U-FenxUr** y **U-FenxUr-Me** con diferentes iones inorgánicos de importancia biológica.

| Especie | U-FenUr | | U-FenUr-Me | |
|--|----------------|---------------|----------------|---------------|
| | respuesta | <i>c</i> (mM) | respuesta | <i>c</i> (mM) |
| 2 K ⁺ HPO ₄ ²⁻ (pH 8.4) | – | 20 | – | 30 |
| 3 K ⁺ PO ₄ ³⁻ (pH 13.0) | – ^a | 100 | – ^a | 100 |
| 2 K ⁺ HPO ₄ ²⁻ / K ⁺ H ₂ PO ₄ (pH 7.0) | – | 100 | – | 100 |
| K ⁺ HCO ₃ ⁻ (pH 8.7) | – | 20 | – | 30 |
| 2 K ⁺ CO ₃ ²⁻ (pH 11.3) | – ^b | 20 | – | 30 |
| Na ⁺ Cl ⁻ | – | 100 | – | 100 |
| 2Na ⁺ SO ₄ ²⁻ | – | 20 | – | 30 |
| Fe ³⁺ 3ClO ₄ ⁻ | – | 1 | – | 1 |

^a El sólido se disuelve rápidamente a pH 13.

^b Se observa un pequeño aumento en la fluorescencia, lo más probable es que sea debido a una disolución parcial de la sílice a este pH.

En lo que se refiere a aniones inorgánicos de pequeño tamaño de relevancia biológica y medioambiental (ver Tabla III.B.7), dichas especies no son reconocidas

por **U-FenxUr-Me** ni por el sólido análogo polar **U-FenxUr**. De acuerdo con los resultados encontrados para el ligando libre en disolución, **FenxUr**, y el anión fluoruro (desprotonación del grupo urea en disolventes orgánicos), se ha incluido el F^- en esta lista, no observándose ningún efecto producido por la adición de este anión. Es más, con respecto al sensor catiónico del apartado A) del capítulo **FenxAT₂15C5**, tampoco se observa ninguna interferencia debida a la posible coordinación de un catión a través del grupo carbonilo (ver por ejemplo los resultados para Fe^{3+}).

Aparte de los diferentes iones inorgánicos de pequeño tamaño que se muestran en la Tabla III.B.7, los componentes más prominentes y potencialmente interferentes serían los triglicéridos neutros, el colesterol, los ácidos o sales de la bilis, y las diferentes clases de fosfatos orgánicos. Por todo esto se decide llevar a cabo estudios de la respuesta del material sensor frente a los compuestos que se muestran en la Tabla III.B.8. Entre todas estas especies, sólo el fosfato de cadena larga monodesprotonado, el mono-*n*-dodecilhidrogenofosfato ($DdOPO_3H^-$) dio una señal positiva, de manera similar a la presentada por los carboxilatos de cadena larga. Ni los glicerosfolípidos como el 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfato [$Gly(TdO)_2Fos^-$] o la 1,2-didodecanoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina [$Gli(DdO)_2FosCo$], que son componentes esenciales de las membranas biológicas,²⁸ ni las sales de los componentes de la bilis como el colato y deoxicolato, que son importantes en el metabolismo de las grasas en el hígado,²⁹ inducen un cambio de color o un aumento significativo en la fluorescencia. Además, fosfatos de cadena larga disustituidos, como el dihexadecilfosfato ($HdO)_2PO_2^-$ tampoco generan ninguna respuesta espectroscópica, presumiblemente porque el grupo polar (la cabeza hidrofílica) carece de suficiente libertad de movimiento y poseen una organización menos óptima para el grupo formador de enlace de hidrógeno POO^- . Es más, los resultados obtenidos a partir de los experimentos llevados a cabo con $Gli(DdO)_2FosCo$ (ver nota g al pie de la Tabla III.B.8) son una prueba indirecta más de que la extracción en el material hidrófobo del compuesto activo por sí solo no es suficiente para inducir una señal analítica y que la coordinación con la subunidad de urea del colorante anclado es necesaria para generar la respuesta espectroscópica. Esta especie solvata **U-FenxUr-Me**, pero sin embargo, no hay un cambio de color ni del tiempo de vida de fluorescencia apreciables.

²⁸ J. F. Tocanne, J. Teissie, *Biochim. Biophys. Acta* **1990**, 1031, 111.

²⁹ a) H. Igimi, M. C. Carey, *J. Lipid Res.*, **1980**, 21, 72; D. J. Cabral, J. A. Hamilton, D. M. Small, *J. Lipid Res.*, **1986**, 27, 334.

Tabla III.B.8. Resultados obtenidos para ensayos en agua con los materiales **U-FenxUr** y **U-FenxUr-Me** con fosfatos orgánicos, lípidos, fosfolípidos y derivados del colesterol.

| Especie | U-FenxUr | | U-FenxUr-Me | |
|--|-----------|---------------|----------------|-------------------|
| | respuesta | <i>c</i> (mM) | respuesta | <i>c</i> (mM) |
| K ⁺ AMP ⁻ (pH 6.9) ^a | – | 10 | – | 30 |
| 2 Na ⁺ ATP ²⁻ | – | 10 | – | 30 |
| K ⁺ DdOPO ₃ H ⁻ (pH 4.5) | <i>b</i> | <i>b</i> | + | “30” ^c |
| 2 K ⁺ DdOPO ₃ ²⁻ (pH 9.0) | – | 10 | – | 30 |
| (HdO) ₂ PO ₂ H ^d | <i>e</i> | <i>e</i> | – ^f | N.S. ^f |
| Na ⁺ Gli(TdO) ₂ Fos ⁻ | <i>e</i> | <i>e</i> | – ^f | N.S. ^f |
| Gli(DdO) ₂ FosCo | <i>e</i> | <i>e</i> | – ^g | “20” |
| Gli(DdO) ₃ | <i>e</i> | <i>e</i> | – ^f | N.S. ^f |
| Colesterol | <i>e</i> | <i>e</i> | – ^f | N.S. ^f |
| Na ⁺ Col ⁻ | – | 7 | – | 30 |
| Na ⁺ DCol ⁻ | – | 7 | – | 30 |

^a La sal sódica no es comercial. Para desprotonar al AMP se añade KOH 0.1 M hasta pH neutro, en el que el AMP está totalmente disuelto.

^b Este anión precipita a pH < 6-7, no se puede medir la fluorescencia por la dispersión de la luz.

^c La sal no es totalmente soluble, pero se añade un poco de la suspensión en una cantidad que equivaldría a una concentración 30 mM.

^d A pH 7 con tampón fosfato 0.1 M.

^e No son solubles en agua y por tanto no se pudieron realizar los ensayos de fluorescencia con suspensiones de **U-FenxUr**.

^f Al no ser soluble la sal, se añadió directamente un poco del sólido a la suspensión de **U-FenxUr-Me**. A pesar de calentar la suspensión a 50 °C y someterla a ultrasonidos para facilitar la difusión del anión, no se observa ninguna respuesta.

^g El sólido se hunde en el agua como consecuencia del “efecto surfactante” de la fosfatidilcolina, pero no se observa el cambio de color característico que se produce tras la adición de los carboxilatos de cadena larga por la coordinación del anión a la urea de la fenoxazinona.

Teniendo en cuenta que, los únicos sustratos no carboxílicos que dan una señal positiva, los hidrogenofosfatos de cadena larga como el dodecilhidrogenofosfato, únicamente se generan localmente como intermediarios en los ciclos sintéticos de glicero(fosfo)lípidos o en situaciones del transporte de membrana intracelular en concentraciones considerablemente bajas,³⁰ no cabe esperar interferencias importantes en las posibles aplicaciones de **U-FenxUr-Me**.

Volviendo a las áreas de la química analítica donde el reconocimiento de carboxilatos es más importante, las aguas contaminadas, el plasma sanguíneo y los productos alimenticios son los más obvios. Mientras que la concentración de FFAs en los alimentos puede ascender a un 0.1 % en peso o más,³¹ los niveles en el plasma sanguíneo pueden variar entre 0.2 y 10.0 mM,³² dependiendo en el estado de salud del organismo. Por otro lado, la concentración de ácidos grasos presente en aguas superficiales ha de mantenerse por debajo de un nivel máximo para que no causen una inhibición significativa de las bacterias aneróbicas. Por ejemplo, se ha observado que una concentración de 7.5 mM de laureato sódico, NaDdO –el ácido láurico es el inhibidor de la metanogénesis más potente de entre todos los ácidos que pueden estar presentes en aguas residuales– causa una inhibición de la metanogénesis del 94%.¹⁰ Todos estos datos ajustan bien con el rango de aplicación de **U-FenxUr-Me**.

B.4.- CONCLUSIONES.

En resumen, mediante la incorporación de los derivados de fenoxazinona correspondientes en una matriz silícea mesoporosa (**UVM-7**) se ha posibilitado, por un lado, la detección de vapores (incorporación del derivado solvatocrómico **FenxDMA(OPr)**) y por otro, la determinación selectiva de carboxilatos de cadena larga en disolución acuosa (incorporación de **FenxUr**).

³⁰ a) D. N. Brindley, R. G. Sturton, *Phospholipids*; Ed. J. N. Hawthorne, G. B. Ansell; Elsevier: Amsterdam, 1982; pág. 179; b) E. E. Kooijman, V. Chupin, B. de Kruijff, K. N. J. Burger, *Traffic* **2003**, *4*, 162.

³¹ B. Innawong, P. Mallikarjunan, J. E. Marcy, *Lebensm.-Wiss. Technol.*, **2004**, *37*, 35.

³² a) H. A. Krebs, *Annu. Rev. Biochem.*, **1950**, *19*, 409; b) M. Roden, T. B. Price, G. Perseghin, K. Falk Petersen, D. L. Rothman, G. W. Cline, G. I. Shulman, *J. Clin. Invest.*, **1996**, *97*, 2859; c) J. E. Mellish, S. J. Iverson, *Can. J. Zool.*, **2001**, *79*, 303; d) H. Minda, E. Larque, B. Koletzko, T. Decsi, *Eur. J. Nutr.*, **2002**, *41*, 125.

En el caso del sistema solvatocrómico **U-FenxDMA(OPr)** sólo se ha podido describir la síntesis y algunos estudios preliminares, que confirman que en principio, el sensor es capaz de responder a vapores de diferente polaridad mediante cambios en sus propiedades ópticas de forma rápida y reversible.

En el caso del sistema **U-FenxUr**, además de la síntesis, se ha presentado una serie de estudios espectroscópicos del material, así como de su respuesta frente a las especies de interés. Las conclusiones más interesantes para este sistema se incluyen a continuación:

◆ Se ha presentado una estrategia racional para el desarrollo de nuevos materiales capaces de actuar como sensores ópticos. La combinación del diseño con conceptos del estado sólido y de química supramolecular en un sentido “biomimético” han permitido la obtención de un nuevo material sensor con una mejora significativa con respecto al sensor molecular en disolución (posibilidad de reconocimiento en agua) y una selectividad dirigida hacia el reconocimiento de carboxilatos de cadena larga frente a los de cadena corta.

◆ Los estudios competitivos demuestran que únicamente las fuerzas combinadas del enlace de hidrógeno en el proceso de reconocimiento (induciendo el desplazamiento al rojo) y las interacciones no covalentes, posibilitando la discriminación y el reconocimiento en disolución acuosa, conducen a una respuesta activa.

◆ Con respecto a los analitos de interés en este apartado, los aniones de ácidos grasos libres, se considera que **U-FenxUr-Me** es un candidato prometedor para futuras aplicaciones analíticas *in-situ*. **U-FenxUr-Me** puede ser empleado potencialmente con instrumentación convencional operando con fuentes de luz visible. El material sensor funciona en agua, el proceso de reconocimiento es reversible, y el material no es muy propenso a sufrir efectos de contracción o de electrolitos. Es más, para muchas aplicaciones en el análisis de FFA, el límite de detección y el rango dinámico de trabajo son adecuados.

CAPÍTULO IV.

Determinación Espectrofotométrica de Fluoruro
Mediante Reacción con Sólidos Silíceos.

1.- INTRODUCCIÓN

En este capítulo se ha seguido una estrategia diferente para la determinación de fluoruro mediante métodos espectrofotométricos en muestras acuosas. Tal y como se ha mostrado en el capítulo III A, en la literatura se han descrito varios sensores colorimétricos y fluorimétricos capaces de indicar la presencia de este anión mediante coordinación/desprotonación de moléculas sensoras conteniendo grupos tipo pirrol, amido, urea o tiourea. Sin embargo, en la mayoría de los casos la señal óptica es solamente observable en disolventes no acuosos como por ejemplo cloroformo, acetonitrilo o dimetilsulfóxido. En general, son escasos los ejemplos de sensores químicos para aniones que sean capaces de funcionar en medio acuoso. Un enfoque alternativo es la utilización de reacciones específicas producidas por los aniones que se desea detectar, convenientemente acopladas con un proceso simultáneo que dé lugar a una señal macroscópicamente medible. En el caso de determinaciones mediante métodos espectrofotométricos esta reacción química está acoplada a una variación de color y/o a un cambio de la fluorescencia. Si la reacción química es irreversible, el uso del término sensor químico no puede ser estrictamente empleado, por lo que generalmente se hace referencia a este tipo de sistemas como **dosímetros químicos**.¹ El uso de reacciones inducidas por un anión tiene ventajas por la gran selectividad alcanzada y porque pueden tener un efecto acumulativo que está directamente relacionado con la concentración del anión.

Los métodos más frecuentes para la determinación de fluoruro en disoluciones acuosas implican el empleo del electrodo selectivo de fluoruro² y métodos colorimétricos por reacciones de desplazamiento.³ Los métodos colorimétricos generalmente se basan en la formación de complejos del fluoruro con cationes metálicos multivalentes como el Al^{3+} , Fe^{3+} , Ce^{3+} , Zr^{4+} y Th^{4+} para dar complejos $(\text{MF}_6)^{3-}$ o $(\text{MF}_6)^{2-}$. La formación de estos complejos suele inducir la

¹ R. Martínez-Máñez, F. Sancenón, *Chem. Rev.*, **2003**, *103*, 4419.

² Ver por ejemplo la aplicación de un método aprobado por la EPA (*Environmental Protection Agency*) para la determinación de fluoruro en aguas de consumo en G. Rum, W.-Y. Lee, J. Gardea-Torresdey, *J. Chem. Ed.*, **2000**, *77*, 1604.

³ a) H. H. Willard, C. A. Horton, *Anal. Chem.*, **1950**, *22*, 1190; b) D. Revinson, J. H. Harley, *Anal. Chem.*, **1953**, *25*, 794; c) J. L. Lambert, *Anal. Chem.*, **1954**, *26*, 558; d) M. L. Nichols, A. C. Condo, *Anal. Chem.*, **1954**, *26*, 703; e) S. Megregian, *Anal. Chem.*, **1954**, *26*, 1161; f) S. S. Yamamura, M. A. Wade, J. H. Sikes, *Anal. Chem.*, **1962**, *34*, 1308; g) T. L. Daines, K. W. Morse, *J. Chem. Ed.*, **1974**, *51*, 680; h) J. Ramasamy, J. L. Lambert, *Anal. Chem.*, **1979**, *51*, 2044.

decoloración de una laca (un complejo coloreado de estos cationes con ciertos ligandos orgánicos) debido al desplazamiento del catión metálico del complejo que forma con la molécula orgánica. El método más empleado utiliza como reactivo una laca de Zr-colorante (la eriocromo cianina R) y es conocido como el método SPANDS.^{3e,g} En este método el anión fluoruro se hace reaccionar con el colorante de zirconio para formar el complejo $[\text{ZrF}_6]^{2-}$ que es incoloro. De esta forma, la presencia de fluoruro en el medio se detecta por una disminución de la coloración de la disolución. El principal inconveniente de estos métodos es que pueden interferir una gran cantidad no sólo de cationes sino también de aniones, ya que muchos aniones compiten con el fluoruro por la coordinación con el catión y por otro lado, muchos cationes compiten por la coordinación del fluoruro. También hay que tener en cuenta que una disminución de color siempre es más difícil de detectar que un aumento del mismo y por lo tanto una detección basada en aparición de color siempre será más conveniente. En un trabajo más reciente⁴ se emplea también una reacción de desplazamiento de un ligando orgánico en un complejo metálico por el fluoruro. En este caso el reactivo empleado es un complejo de Zr^{4+} coordinado a un compuesto fluorescente (el flavonol) cuya intensidad de emisión disminuye cuando se libera del complejo con el catión metálico. La adición de F^- por tanto induce una disminución de la fluorescencia.

La sílice es un material altamente inerte a la acción de la mayoría de reactivos químicos. En concreto, cuando la sílice es de elevada pureza, sólo es atacable por álcalis concentrados y por el anión fluoruro en medio ácido. Por lo tanto, el ataque de la sílice en medio ácido es una reacción específica de este anión que podría ser utilizada para su detección. En este sentido, Curry y colaboradores⁵ plantean el análisis de fluoruros partiendo de esta reacción específica del fluoruro con la sílice en medio ácido sulfúrico concentrado para más tarde determinar la concentración del anión por destilación del SiF_4 formado. El tetrafluoruro de silicio es recogido en una disolución tampón de borato/ácido bórico de pH 8.5 dando lugar por hidrólisis al anión silicato que es el que finalmente se determina colorimétricamente mediante reacción con molibdato amónico. Evidentemente, aunque este análisis, al estar basado en una reacción específica, elimina gran parte de los interferentes, el procedimiento es tan engorroso que no puede rivalizar con los métodos colorimétricos habituales.

⁴ Y. Takahashi, D. A. Pacheco, H. Matsunaga, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **2002**, 759.

⁵ R. P. Curry, M. G. Mellon, *Anal. Chem.*, **1956**, 28, 1567.

Siguiendo una estrategia similar, en este capítulo se describe un método óptico para la determinación de fluoruro en muestras acuosas en el que se aprovecha el ataque específico de fluoruro a la sílice a pH ácido. La sílice se emplea como soporte para el anclaje covalente de cromóforos o fluoróforos. La presencia de fluoruro implica la destrucción del soporte silíceo y la liberación de la molécula orgánica en la disolución, lo que conduce a un aumento en el color de la disolución problema (o un aumento de fluorescencia, según la molécula indicadora empleada). En principio, tan sólo se debería observar la interferencia negativa producida por la presencia de cationes multivalentes capaces de coordinar fuertemente al fluoruro (como Al^{3+} y Fe^{3+}), y no falsos positivos ya que el fluoruro debería ser el único anión capaz de inducir el aumento del color o la fluorescencia a pH ácido.

Basándonos en las propiedades de la sílice **UVM-7** como son su elevada superficie, el sistema de poros bimodal y la facilidad que posee para su funcionalización con diversos cromóforos orgánicos, parece prometedor su empleo como soporte en la estrategia descrita para la determinación de fluoruro.

2.- OBJETIVOS

♦ Funcionalización de la matriz de sílice con las moléculas indicadoras encargadas de emitir la señal macroscópica en presencia de fluoruro. Un punto importante es asegurar la proporcionalidad de la respuesta del sólido a la concentración del anión. Para ello, el método descrito emplea el anclaje de las moléculas orgánicas a la matriz inorgánica mediante enlace covalente. La simple adsorción de las moléculas indicadoras en **UVM-7** generaría una descarga del colorante en la disolución por lavado y no por ataque del anión fluoruro sobre la sílice. En este sentido, ha de tenerse especial cuidado en el posterior lavado de los materiales para eliminar totalmente restos de cromóforo adsorbidos.

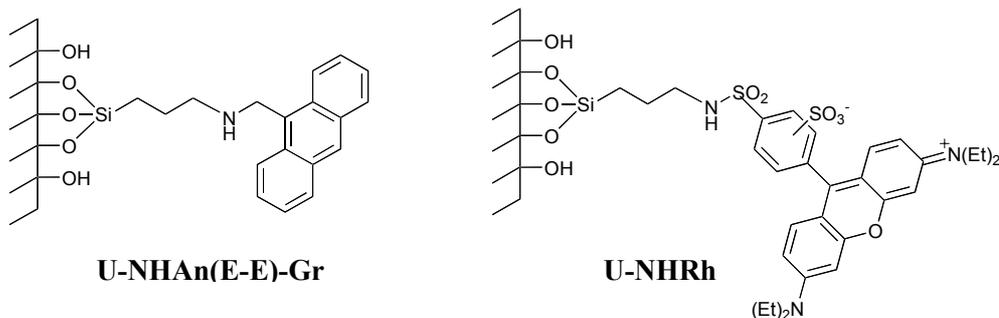
♦ Obtención de curvas de calibrado en las condiciones lo más suaves y reproducibles posible. Un peligro sería la degradación de la molécula indicadora en presencia de fluoruro a pH ácido. La elevada superficie de **UVM-7** debería facilitar el ataque por fluoruro de la sílice, por tanto se requerirán condiciones más suaves de reacción.

3.- SÍNTESIS

Los materiales han sido obtenidos mediante métodos post-sintéticos que comprenden dos etapas diferenciadas: en primer lugar, obtención del material híbrido conteniendo grupos amino como punto de enlace con las moléculas indicadoras y, en segundo lugar, incorporación de los cromóforos a través de este grupo.

El sólido funcionalizado con los grupos amino es el mismo que el empleado en el Capítulo II, **U-NH₂(E)-Gr**, obtenido por reacción de la matriz silícea con un exceso de 3-(aminopropil)triatoxisilano en tolueno anhidro. La reacción se lleva a cabo con calefacción y agitación bajo argón. Una vez anclado el alcoxisilano, éste se hace reaccionar con la molécula activa.

El sólido funcionalizado con antraceno, **U-NHAn(E-E)-Gr**, es el mismo que se ha empleado para los estudios con ATP en el Capítulo II. En el caso del sólido funcionalizado con el derivado de rodamina, **U-NHRh**, se emplea como reactivo el cloruro de ácido sulfónico de la lisamina rodamina B, capaz de dar una reacción de sustitución nucleofílica con el grupo amina del sólido **U-NH₂(E)-Gr**.

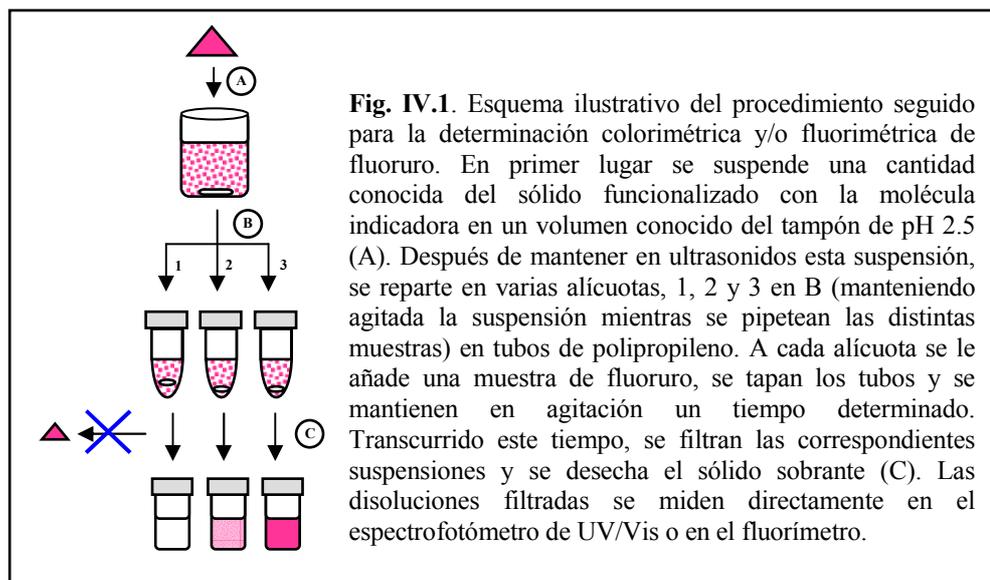


Una etapa fundamental de la síntesis es la eliminación completa de las moléculas indicadoras que no hayan reaccionado pero que sin embargo permanecen adsorbidas en el sólido. Esto se hace con el fin de evitar falsos positivos en los ensayos posteriores (la aparición del color/fluorescencia podría ser debida a la desorción del cromóforo y no a la disolución de la sílice inducida por el ataque del fluoruro). Por tanto, además de mantener los sólidos en extracción con Soxhlet durante el tiempo suficiente (entre 1 y 2 días, hasta que se observa que el etanol de lavado sale limpio), los sólidos se lavan con la misma disolución tamponadora en la que se van a realizar los ensayos.

4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1- Obtención de las Curvas de Calibrado y Procedimientos de Medida.

La determinación de fluoruro con los sólidos **U-NHAn(E-E)-Gr** y **U-NHRh** se lleva a cabo en disoluciones acetonitrilo:agua 7:3 (v/v) tamponadas a pH 2.5 con hidrogenofalato potásico 0.1 M y HCl. El pH ligeramente ácido es necesario ya que a pH > 4 no se observa (al menos, en un tiempo razonable) la aparición del color. El pH se determina con un electrodo de acetonitrilo:agua previamente calibrado. El acetonitrilo se emplea como codisolvente con el fin de facilitar la disolución de la molécula orgánica emisora de la señal ya que generalmente éstas son poco solubles en agua. Para llevar a cabo la determinación se sigue el esquema descrito en la Fig. IV.1. Se prepara una suspensión del sólido funcionalizado correspondiente en el tampón de pH 2.5 de forma que la suspensión contenga 1 mg de sólido por mL de tampón. Esta mezcla se mantiene en ultrasonidos durante 10 minutos para dispersar las partículas del sólido y así tener la máxima homogeneidad posible de la suspensión. Se pipetea alícuotas de esta suspensión para preparar los distintos puntos del calibrado y las muestras. Las muestras de fluoruro se añaden a estas suspensiones en viales de polipropileno, para evitar posibles interferencias causadas por el empleo de material de vidrio. Estos viales se tapan herméticamente con el fin de evitar la evaporación del disolvente y minimizar así las desviaciones en la concentración. Las alícuotas y las muestras se mantienen termostalizadas en un baño de agua a 25 °C con agitación magnética y se dejan agitando durante el tiempo suficiente para obtener una respuesta constante. Las suspensiones se filtran a través de un filtro de nylon para eliminar los restos de sólido y las disoluciones así obtenidas se introducen directamente en la celda de medida. La señal se registra por el método correspondiente (fluorimétrico o colorimétrico), produciendo un aumento de la intensidad a medida que la concentración de fluoruro aumenta. Se obtiene una respuesta lineal para el logaritmo de la absorbancia o la fluorescencia vs. el logaritmo de la concentración de fluoruro.



En la Fig. IV.2 se muestra la variación de fluorescencia con la concentración de fluoruro cuando se emplea el sólido **U-NHAn(E-E)-Gr** como reactivo fluorogénico.

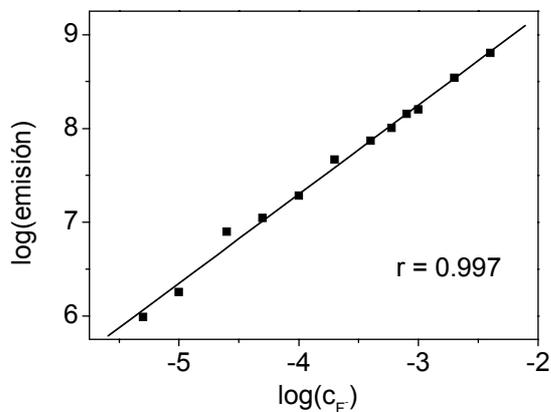


Fig. IV.2. Puntos de calibrado y ajuste lineal (línea continua) para un experimento con el sólido **U-NHAn(E-E)-Gr** tras la adición de cantidades crecientes del anión fluoruro a pH 2.5. Las suspensiones han sido filtradas al cabo de 4 horas y la intensidad de fluorescencia de la disolución resultante ha sido leída a 420 nm.

Sin embargo, en la figura anterior (IV.2) no se aprecia el límite de detección o si el tiempo de reacción es suficiente para que las medidas sean reproducibles. Por esto se decide ampliar el rango de medida y comparar a dos tiempos diferentes de reacción, 4 y 24 horas. En la Fig. IV.3 se muestra el resultado obtenido para el mismo sólido reactivo **U-NHAn(E-E)-Gr**. De esta figura se puede deducir un límite de detección para una concentración de fluoruro del orden de micromoles L^{-1} (aproximadamente $5 \times 10^{-6} M$, lo que equivale a unas 0.1 ppm), que es suficiente para su uso en determinadas aplicaciones. Por ejemplo, el contenido en fluoruro en aguas naturales de los Estados Unidos puede oscilar entre 0.1 y 12 ppm, o el intervalo óptimo de concentración de este anión en aguas fluoradas (la fluoración de aguas de consumo fue recomendada por la Asociación Dental Americana en 1950 para la prevención de la caries dental) es de 0.7 a 1.2 ppm.²

En la Fig. IV.3 además se aprecia que las dos curvas obtenidas tras filtrar las suspensiones del sólido indicador a tiempos diferentes son perfectamente superponibles, lo que parece indicar que el método es bastante reproducible y no afecta en gran medida el tiempo de reacción (a partir de un tiempo mínimo que permita la completa reacción del fluoruro con la sílice). Medidas posteriores confirman que es suficiente con mantener agitando las suspensiones 1 hora.

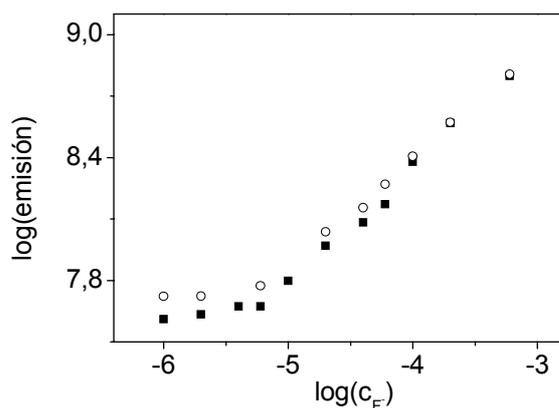
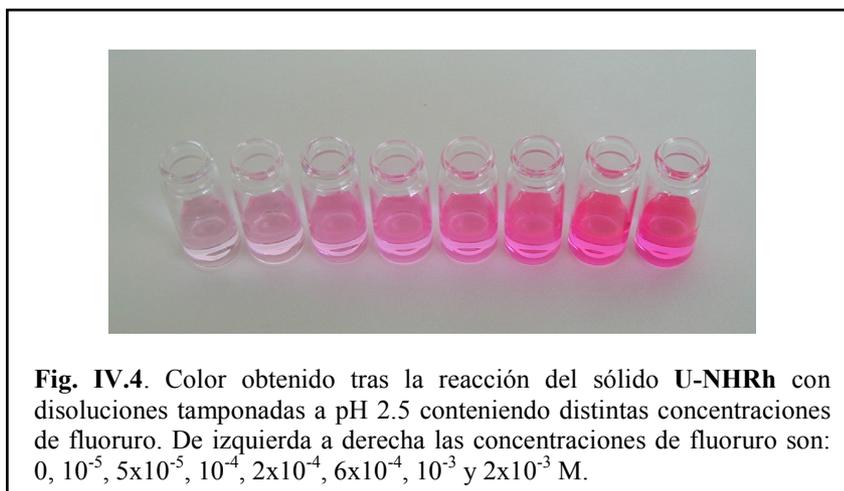


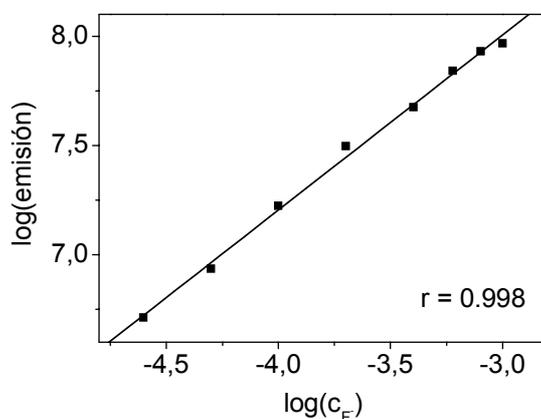
Fig. IV.3. Puntos de calibrado para un experimento con el sólido **U-NHAn(E-E)-Gr** tras la adición de cantidades crecientes del anión fluoruro a pH 2.5. Las suspensiones han sido filtradas al cabo de 4 horas (■) y al cabo de 24 horas (○). La intensidad de fluorescencia de la disolución resultante ha sido leída a 420 nm.

Los sólidos funcionalizados también pueden obtenerse en forma monolítica. Esto posibilita un método sencillo para cuantificar visualmente y de forma rápida (en menos de media hora la aparición de color es apreciable) la presencia de fluoruro en muestras acuosas.

La Fig. IV.4 muestra el color de las disoluciones obtenidas tras la reacción con distintas cantidades de F^- para el sólido **U-NHRh**.



En el caso de **U-NHRh**, el proceso de disolución de la sílice también puede ser seguido por medidas de emisión de la fluorescencia (ver Fig. IV.5).



Con el fin de comprobar el efecto de interferencia debido a la presencia de cationes multivalentes como Al^{3+} y Fe^{3+} , tal y como ocurre con otros métodos colorimétricos, se realizan ensayos en presencia de estos cationes. Se observa un error importante en la determinación del fluoruro, producida incluso por la adición de 1 equivalente de catión metálico con respecto a la cantidad de fluoruro ($c_{\text{F}^-} = 5 \times 10^{-4} \text{ M}$). Causan un error negativo (de un 80-90 % en el caso del Al^{3+} y de un 50-60 % en el caso del Fe^{3+} , ensayos realizados por duplicado) presumiblemente por la formación de complejos con el anión fluoruro.

En el caso de interferencias aniónicas, se hicieron algunas pruebas con el anión fosfato en relación con la aplicación descrita en el siguiente apartado.

4.2.- Medidas en Muestras Reales.

Con el objetivo de comprobar la aplicación potencial de esta reacción se aplicó el método para la determinación cuantitativa de fluoruro en una pasta de dientes comercial, encontrándose una muy buena relación entre los resultados obtenidos mediante el procedimiento aquí descrito y la concentración indicada por el fabricante (ver Tabla IV.1). Las muestras de pasta de dientes se prepararon suspendiendo una cantidad conocida de pasta en un volumen conocido de agua bidestilada. Esta mezcla se mantuvo en agitación durante 2 horas en un vaso de polipropileno a 60 °C. Tras esto se filtra para eliminar los sólidos que permanecen en suspensión (ver apartado 2.2 del Capítulo IV para una explicación más detallada) y esta disolución es la que se empleó para los ensayos. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla IV.1, donde se observa la coincidencia de los mismos con respecto al valor de contenido en fluoruro especificado por el fabricante.

Tabla IV.1. Resultados del análisis de una pasta de dientes comercial basado en la reacción de la sílice con los sólido funcionalizados **U-NHAn(E-E)-Gr** y **U-NHRh**.

| | U-NHAn(E-E)-Gr | U-NHRh | teórico |
|----------------------------------|-----------------------|---------------|----------------|
| % F⁻ (en peso) | 0.25 | 0.25 | 0.24 |

Cabe resaltar que otros métodos colorimétricos empleados en la determinación de fluoruros en pastas dentales como el SPADNS presentan serias desviaciones debido a la interferencia (positiva) producida por la existencia de

fosfatos.^{3e,g} Por ejemplo, en el caso del pirofosfato el error puede ser incluso del 67% en disoluciones deliberadamente contaminadas con un 0.37 % en peso de pirofosfato, un anión que frecuentemente está presente en las pastas dentales. En el caso de otros métodos colorimétricos también se observa la interferencia del fosfato.^{3c,h} Sin embargo, siguiendo la estrategia descrita aquí, la determinación de fluoruro en muestras conteniendo un exceso molar de 10 veces de fosfato con respecto a la concentración del fluoruro ($C_{F^-} = 5 \times 10^{-4}$ M) dio errores inferiores al 8% (ensayos realizados por duplicado), tanto por el método colorimétrico como fluorimétrico.

5.- CONCLUSIONES

◆ El método aquí empleado es versátil (permite elegir el cromóforo o fluoróforo con el que se desea realizar la determinación siempre que sea posible su anclaje en **UVM-7**) y funciona en agua. La elevada superficie y el sistema de poros bimodal de **UVM-7** aseguran una respuesta relativamente rápida y hacen que las condiciones de reacción sean muy suaves (temperatura ambiente y $\text{pH} > 2$). Además, esta gran reactividad del soporte silíceo permite que tan sólo se requieran concentraciones de fluoruro del orden de micromolar para apreciar la reacción cromo/fluorogénica, lo que hace que el límite de detección del método sea considerablemente bajo.

◆ Otros métodos colorimétricos o fluorimétricos reportados en la literatura para la determinación de fluoruro en agua se basan en la desaparición de color o fluorescencia que es consecuencia de una reacción de desplazamiento inducida por la presencia del anión. En el método aquí propuesto sin embargo se basa en un proceso que da como resultado la aparición de color/fluorescencia, que es siempre más ventajosa y aporta mayor fiabilidad en las medidas (la desaparición de color puede ser debida a la descomposición de los cromóforos, etc).

◆ Aunque parece que la interferencia debida a la presencia de cationes multivalentes como el Fe^{3+} y Al^{3+} sigue siendo importante por la fuerte tendencia de estos metales a formar complejos con el fluoruro, en principio no parece que haya una influencia de los aniones. Por tanto, la observación de una respuesta positiva implica la existencia de fluoruro y es poco probable que sea debido a la presencia de otros aniones.

CAPÍTULO V.

Procedimiento Experimental.

1.- SÍNTESIS.

1.1- Técnicas de Caracterización.

1.1.a) *Fase homogénea.*

▪ **Resonancia Magnética Nuclear (RMN).**

Los espectros de ^1H RMN y ^{13}C RMN fueron obtenidos en un equipo Varian Gemini de 300 MHz, empleando como señal de referencia la de los correspondientes disolventes deuterados ($\delta = 7.24$ y 77.0 ppm para ^1H y ^{13}C , respectivamente en CDCl_3 y 2.49 ppm para ^1H en DMSO-d_6) y TMS como patrón interno en los casos en los que se consideró necesario.

▪ **Espectrometría de Masas de Alta Resolución (HRMS).**

Los espectros de masas de todos los compuestos se obtuvieron en un equipo VG Autospec del Servicio Central de Soporte a la Investigación Experimental (SCSIE) de la Universidad de Valencia, bien por impacto electrónico (EI) o por bombardeo con átomos rápidos (FAB).

1.1.b) *Fase heterogénea.*

▪ **Análisis Termogravimétrico (ATG).**

Los termogramas para las distintas muestras sólidas se obtuvieron en un equipo TGA/SDTA 851e Metler Toledo. Las muestras se sometieron a una rampa de calentamiento de 10 °C por minuto, desde 25 °C hasta 1000 °C en atmósfera de aire y en crisoles de alúmina.

▪ **Difracción de Rayos X de Polvo (DRX).**

Las medidas de rayos X se llevaron a cabo con un difractómetro Seifert 3000TT, del Instituto de Ciencia de los Materiales de la Universidad de Valencia

(ICMUV), utilizando radiación $\text{CuK}\alpha$ con un programa con un intervalo de barrido $0.73^\circ < 2\theta < 10^\circ$.

En contraste a otros materiales mesoporosos que generalmente poseen poros irregularmente distribuidos, MCM-41 posee canales unidireccionales dispuestos en una ordenación hexagonal (aunque la estructura de sílice no posee orden de largo alcance en el sentido de un material cristalino y puede ser considerada como amorfa). El diagrama de difracción de rayos X de polvo de MCM-41 puede llegar a mostrar hasta 5 picos dependiendo de la regularidad del material (el pico más intenso para MCM-41 aparece siempre sobre ángulos $2\theta = 2^\circ$), reflexiones que resultan de la ordenación hexagonal periódica de los canales del material.

▪ Isotermas de Adsorción-Desorción de Nitrógeno.

Las isotermas de adsorción-desorción de N_2 se midieron en un Micromeritics ASAP2010 del ICMUV. Antes de su uso, las muestras fueron desgasificadas a 120°C a vacío durante una noche. Las áreas superficiales se calculan a partir de los datos de la isoterma utilizando la ecuación de BET (Brunauer-Emmet-Teller)¹ en el intervalo de bajas presiones relativas (< 0.3). El tamaño de poro se determina mediante el método de BJH (Barrett-Joyner-Halenda).²

Las isotermas de adsorción-desorción de nitrógeno a la temperatura del N_2 líquido se emplean para determinar el área específica, el volumen y la distribución de tamaño de poro de los materiales porosos. En las gráficas obtenidas generalmente se representa el volumen de gas adsorbido en cm^3 por gramo de adsorbato frente a la presión relativa (P/P_0 , donde P_0 es la presión de saturación).

Existen varios tipos de isotermas (ver Apéndice, AP.1.1) y los sólidos mesoporosos suelen seguir una isoterma tipo IV. El fragmento inicial de la curva, a bajas presiones, es el que se utiliza para el cálculo del área superficial del sólido según el modelo BET. Este modelo describe la fisisorción en multicapa, y asume que una monocapa de gas adsorbido posee una entalpía de adsorción fija (ΔH_{ADS}) y que las capas sucesivas poseen entalpías de adsorción equivalentes al calor latente de evaporación (ΔH_V),

¹ S. Brunauer, P. H. Emmet, E. Teller, *J. Am. Chem. Soc.*, **1938**, 60, 309.

² E. P. Barret, L. G. Joyner, P. P. Halenda, *J. Am. Chem. Soc.*, **1951**, 73, 373.

$$\frac{P}{V(P_0 - P)} = \frac{1}{V_m K} + \frac{K-1}{V_m K} \left(\frac{P}{P_0} \right) \quad (1)$$

donde V es el volumen de gas adsorbido a una presión de gas determinada P . P_0 es la presión de vapor de saturación del gas adsorbido, V_m es el volumen de la monocapa y K es la constante de la monocapa (ver ecuación 2), que refleja la diferencia entre los calores de adsorción entre la primera monocapa y el resto (es decir, el calor de adsorción),

$$K = e^{-(\Delta H_{ADS} - \Delta H_V) / RT} \quad (2)$$

Los parámetros de la ecuación 1 pueden determinarse a partir de la representación gráfica de $P/V(P_0-P)$ vs. P/P_0 , ya que la pendiente es $(K-1)/V_m K$ y la ordenada en el origen $1/V_m K$. Como frecuentemente la ordenada en el origen es muy pequeña y se determina mal, es preferible obtener V_m como

$$\frac{1}{V_m} = \text{ordenada en el origen} + \text{pendiente} \quad (3)$$

Una vez conocido V_m , el área superficial de la muestra S (en $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$) puede calcularse mediante la ecuación 4,

$$S = \frac{V_m}{0.0224} \times N_A \times A \quad (4)$$

donde N_A es el número de Avogadro (6.023×10^{23} moléc mol⁻¹) y A es la superficie que ocupa la molécula de N_2 (16.2 \AA^2 a 77 K).

Sin embargo, la isoterma BET presenta limitaciones y sólo es aplicable en la región de bajas presiones, a $0.05 < P/P_0 < 0.35$, ya que es en esta región donde los poros se comportan igual que la superficie externa. A partir de estas presiones tiene lugar la condensación capilar del gas en los mesoporos como consecuencia de la

adsorción en multicapa. Si seguimos adsorbiendo gas llega un momento en que los poros se llenan dando una saturación. En este punto la isoterma empieza a desviarse de la de BET. Es en esta región, en el paso de la condensación capilar, de donde se derivan las distribuciones de tamaño de poro, utilizando el método el método BJH. Este método se basa en la ecuación de Kelvin (5),

$$\ln \frac{P_0}{P} = \frac{2\gamma\bar{V}}{rRT} \quad (5)$$

donde r , \bar{V} y γ hacen referencia al radio de curvatura del líquido condensado, el volumen molar y la tensión superficial, respectivamente. Esta ecuación es la que se emplea para calcular el radio del poro, la distribución del tamaño de poro y el volumen de poro, a partir de los datos experimentales. Cuando la isoterma alcanza la rama horizontal, se han llenado todos los poros y se puede calcular el volumen total de éstos.

▪ **Espectroscopía de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR).**

Los espectros de IR se midieron en un espectrofotómetro Jasco FT/IR-460 Plus, utilizando KBr para la preparación de las muestras y manteniendo las pastillas a 120 °C durante unas horas previas a la medida para eliminar el agua que pueda quedar adsorbida en la superficie de UVM-7.

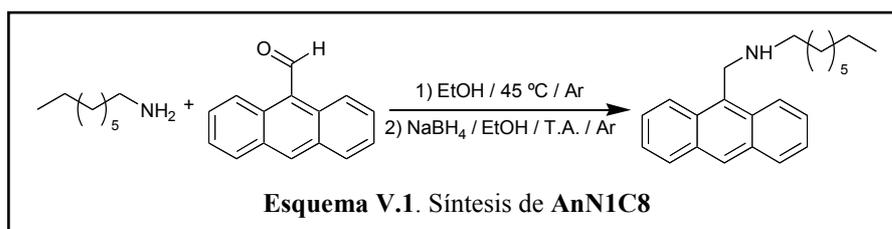
1.2- Procedimiento Experimental y Caracterización de los Compuestos.

Reactivos y Disolventes. La mayoría de reactivos empleados fueron proporcionados por Aldrich y en su defecto por Fluka o Acros y se utilizaron tal cual. Los disolventes deuterados para RMN provinieron de Merk o Aldrich y los empleados para síntesis generalmente de Scharlab, o de Aldrich en los casos en los que se requirieron anhidros como el tolueno o la dimetilformamida. En el caso del acetonitrilo y diclorometano secos, se tomaron los de grado sintético de Scharlab, se destilaron bajo argón sobre CaH₂ y se guardaron con tamiz molecular de 4 Å. La sílice y alúmina empleadas para cromatografía en columna y de capa fina se

obtuvieron de Merk. El carbonato potásico que se requería seco se mantuvo en la estufa a 100-110 °C durante al menos un día previo a su uso.

1.2.a) Fase homogénea.

***N*-octil-*N*-(9-antrilmetil)amina (AnNIC8).** En un matraz de fondo redondo de una boca de 50 mL secado previamente en estufa se pesan 0.30 g (1.45 mmol) de 9-antracenoaldehído y se disuelven en 15 mL de etanol absoluto. A esta disolución se añaden 252 μ L (1.52 mmol) de octilamina y la mezcla se mantiene con agitación magnética bajo atmósfera de argón a 45 °C durante 6 horas. Transcurrido este tiempo, se procede a la reducción de la imina formada mediante la adición de 0.082 g (2.17 mmol) de NaBH₄ a temperatura ambiente. La disolución se deja agitando durante una noche bajo argón tras lo cual se añade un poco de agua para destruir el exceso de NaBH₄ y se concentra el etanol en el rotavapor. Tras esto, se procede a una extracción con diclorometano:agua (50:20) y la fase orgánica amarilla se seca con MgSO₄ anhidro. Tras concentrar el diclorometano se obtiene el producto como un aceite de color amarillo con un rendimiento de 94.8 % (0.44 g).

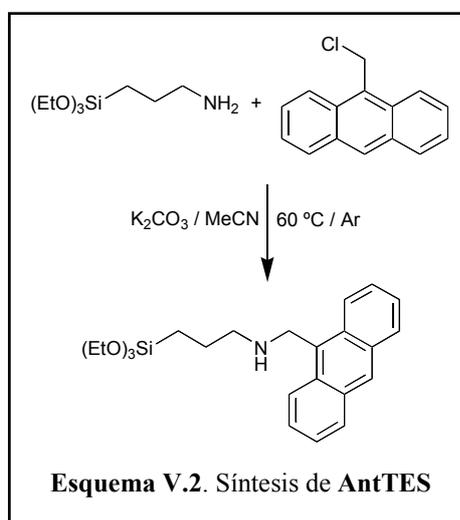


¹H RMN (CDCl₃): δ (ppm) = 0.90 (t, 3H, CH₂CH₃, J = 7.1 Hz), 1.29 (s ancho, 10H, CH₂CH₂ CH₂), 1.60 (qt, 2H, CH₂CH₂CH₂, J = 7.1 Hz), 2.89 (t, 2H, CH₂CH₂N, J = 7.4 Hz), 4.73 (s, 2H, NCH₂Ar), 7.47 (t, 2H, ArH, J = 7.4 Hz), 7.55 (t, 2H, ArH, J = 6.9 Hz), 8.01 (d, 2H, ArH, J = 8.2 Hz), 8.35 (d, 2H, ArH, J = 8.8 Hz), 8.40 (s, 1H, ArH).

¹³C RMN (CDCl₃): δ (ppm) = 14.1, 22.6, 27.4, 29.3, 29.5, 30.1, 31.8, 45.8, 50.6, 124.1, 124.8, 126.0, 127.0, 129.1, 130.2, 131.5, 131.9.

Masa Exacta EI (m/z = M) calculada para C₂₃H₂₉N: 319.2300, encontrada: 319.2293.

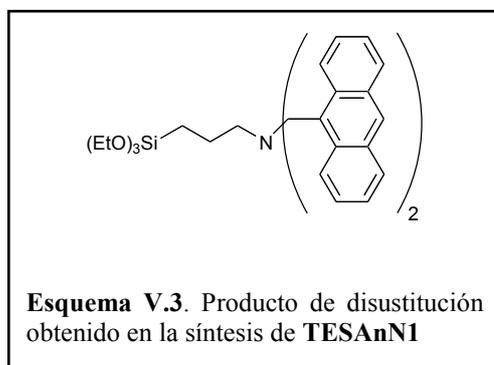
***N*-[3-(trietoxisilil)propil]-*N*-(9-antrilmetil)amina (TESAnN1).** 1.70 mL (7.28 mmol) de APTES fueron disueltos en 50 mL de acetonitrilo seco, tras lo que se añadieron 1.38 g (9.93 mmol) de K₂CO₃ previamente secado en estufa a 100 °C. Se calienta a 60 °C bajo argón y se añaden desde un embudo de adición, durante un tiempo aproximado de 2 horas, 1.50 g de 9-clorometilantraceno (6.62 mmol) disueltos en 50 mL de acetonitrilo (más aproximadamente 5 mL de CH₂Cl₂ que fueron necesarios para la disolución total del 9-clorometilantraceno). Una vez finalizada la adición, la reacción se siguió por cromatografía en capa fina (CCF) de sílice, manteniéndose a 60 °C bajo argón durante 4 horas, tras lo cual el exceso de K₂CO₃ se filtra por gravedad y el acetonitrilo se evapora 50-60 °C a vacío. El crudo amarillo obtenido se purifica por cromatografía de sílice con diclorometano:etanol. Se obtiene mayoritariamente (1.27 g, 32.0 %) el producto de disustitución (ver Esquema V.3) de masa exacta 601.3012, que eluye en primer lugar con una mezcla de disolventes (100:1 v/v). Para obtener el producto monosustituido es necesario aumentar la polaridad del eluyente hasta (30:1 v/v), obteniéndose 0.25 g, un 9.2 % de rendimiento.



¹H RMN (CDCl₃): δ (ppm) = 0.64 (t, 2H, CH₂CH₂Si, *J* = 8.2 Hz), 1.17 (t, 9H, CH₂CH₃, *J* = 7.0 Hz), 1.71 (qt, 2H, CH₂CH₂CH₂, *J* = 8.1 Hz), 2.87 (t, 2H, CH₂CH₂N, *J* = 7.2 Hz), 3.76 (q, 6H, CH₃CH₂O, *J* = 7.0 Hz), 4.74 (s, 2H, NCH₂Ar), 7.44 (t, 2H, ArH, *J* = 7.0 Hz), 7.53 (t, 2H, ArH, *J* = 7.0 Hz), 7.99 (d, 2H, ArH, *J* = 8.4 Hz), 8.33 (d, 2H, ArH, *J* = 8.7 Hz), 8.39 (s, 1H, ArH).

^{13}C RMN (CDCl_3): δ (ppm) = 8.0, 18.3, 23.3, 45.6, 53.3, 58.3, 124.1, 124.8, 126.0, 127.0, 129.1, 130.2, 131.5, 131.8.

Masa Exacta EI ($m/z = M$) calculada para $\text{C}_{24}\text{H}_{33}\text{NO}_3\text{Si}$: 411.2230, encontrada: 411.2215.



^1H RMN (CDCl_3): δ (ppm) = 0.22 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}$, $J = 8.2$ Hz), 1.09 (t, 9H, CH_2CH_3 , $J = 7.1$ Hz), 1.79 (qt, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$, $J = 8.2$ Hz), 2.66 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$, $J = 6.9$ Hz), 3.59 (q, 6H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$, $J = 7.0$ Hz), 4.59 (s, 4H, NCH_2Ar), 7.26 (t, 4H, ArH , $J = 7.7$ Hz), 7.39 (t, 4H, ArH , $J = 7.3$ Hz), 7.95 (d, 4H, ArH , $J = 8.2$ Hz), 8.33 (d, 4H, ArH , $J = 8.8$ Hz), 8.37 (s, 2H, ArH).

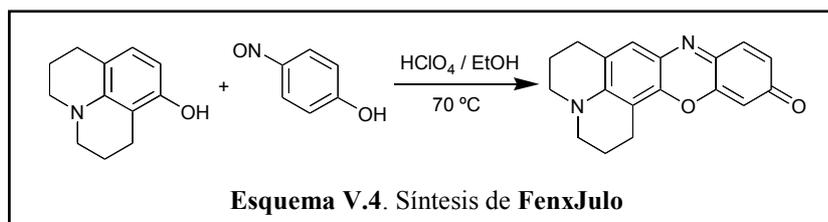
^{13}C RMN (CDCl_3): δ (ppm) = 8.0, 18.2, 20.4, 50.7, 57.6, 58.1, 124.7, 125.2, 125.3, 127.4, 128.8, 130.4, 131.3, 131.5.

Masa Exacta EI ($m/z = M$) calculada para $\text{C}_{39}\text{H}_{43}\text{NO}_3\text{Si}$: 601.3012, encontrada: 601.3012.

7-julolidin-3H-fenoxazin-3-ona (FenxJulo). Este compuesto se sintetiza a partir de 8-hidroxijulolidino y *p*-nitrosfenol³ en etanol con ácido perclórico. Sin embargo la reacción no resulta cuantitativa ya que se obtiene una mezcla de diversos productos coloreados. El procedimiento seguido fue el siguiente: 0.25 g (1.34 mmol) de 8-hidroxijulolidino se disolvieron en 15 mL de etanol con 0.17 mL de HClO_4 concentrado (2.01 mmol). La mezcla se calentó a 70 °C tras lo cual, se añadieron 150 mg (1.22 mmol) de *p*-nitrosfenol disueltos en 10 mL de etanol. La

³ Para la nitrosación del fenol se siguió un procedimiento descrito en *Vogel's. Textbook of Practical Organic Chemistry*, 4th ed., Ed. Longman, pág. 746.

disolución se agita durante 1 hora a esta temperatura y después se deja enfriar a temperatura ambiente antes de neutralizarla con 20 mL de una disolución de KOH 0.1 M en etanol (20 mL, 2.01 mmol). La cromatografía en capa fina de sílice con diclorometano:etanol (20:1 v/v) da varios productos coloreados. Tras concentrar el etanol queda un residuo sólido negro, pero tan solo la fracción rosa fluorescente (indicando la presencia del producto deseado) soluble en diclorometano se toma. El diclorometano se concentra y el producto se cromatografía en gel de sílice con diclorometano:etanol (30:1 v/v). El rendimiento de la reacción es muy bajo y tan sólo se obtienen 3 mg de producto.



^1H RMN (CDCl_3): δ (ppm) = 1.95-2.04 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 2.80 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Ar}$, $J = 6.0$ Hz), 2.85 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Ar}$, $J = 6.0$ Hz), 3.34-3.39 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 6.29 (d, 1H, ArH , $J = 2.1$ Hz), 6.74 (dd, 1H, ArH , $J = 9.6, 2.1$ Hz), 7.15 (s, 1H, ArH), 7.36 (d, 1H, ArH , $J = 9.6$ Hz).

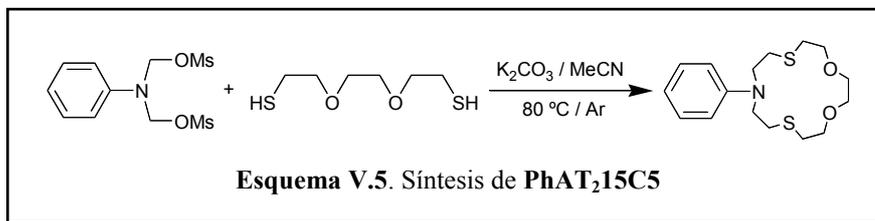
^{13}C RMN (CDCl_3): δ (ppm) = 19.3, 19.8, 20.8, 27.2, 50.3, 105.0, 128.0, 131.0, 133.8 (sólo se incluyen los C secundarios y terciarios, ya que los cuaternarios no se pudieron llegar a apreciar al disponer de poco producto).

Masa Exacta EI ($m/z = M$) calculada para $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2$: 292.1212, encontrada: 292.1283.

10-fenil-1,4-dioxa-7,13-ditio-10-azaciclopentadecano (PhAT₂15C5). 4.00 g de 3,6-dioxa-1,8-octanoditiol (21.94 mmol) se disuelven en 300 mL de acetonitrilo seco a los que se añaden 10.0 g de K_2CO_3 previamente secado en estufa a 100 °C (72.35 mmol). Esta suspensión se agita bajo atmósfera de argón a 80 °C tras lo cual se añade lentamente (durante unas 5 horas) desde un embudo de adición una disolución de N-fenildietanolamina dimesilada⁴ (8.14 g, 24.13 mmol) en

⁴ Tesis Doctoral de Félix Sancenón Galarza, Universidad Politécnica de Valencia, 2003, pág. 318.

acetonitrilo seco (100 mL). Tras 24 horas a reflujo, el exceso de K_2CO_3 se filtra a gravedad y el acetonitrilo se evapora en el rotavapor. El crudo se purifica por cromatografía en columna de sílice con diclorometano, obteniéndose 2.13 g de producto como un sólido blanco (36 % de rendimiento).

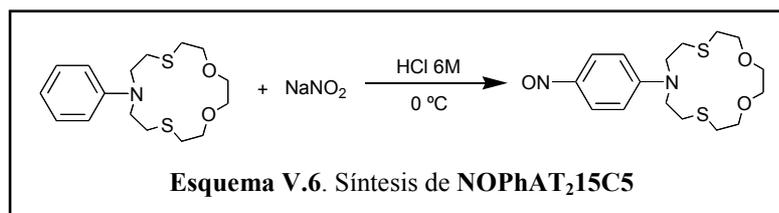


1H RMN ($CDCl_3$): δ (ppm) = 2.70 (t, 4H, CH_2CH_2S , $J = 5.1$ Hz), 2.83 (t, 4H, CH_2CH_2S , $J = 8.0$ Hz), 3.53-3.59 (m, 8H, CH_2CH_2N , CH_2CH_2O), 3.78-3.82 (t, 4H, CH_2CH_2O), 6.56-6.62 (m, 3H, ArH), 7.15 (t, 2H, ArH, $J = 7.8$ Hz).

^{13}C RMN ($CDCl_3$): δ (ppm) = 29.4, 31.1, 51.8, 70.7, 74.2, 111.7, 116.1, 129.4, 146.8.

Masa Exacta El ($m/z = M$) calculada para $C_{16}H_{25}NO_2S_2$: 327.1327, encontrada: 327.1325.

10-(4-nitrosfenil)-1,4-dioxa-7,13-ditio-10-azaciclopentadecano (NOPhAT₂15C₅). 1.00 g de PhAT₂15C₅ (3.05 mmol) se disuelven en 10 mL de HCl 6 M. Esta disolución se enfría en un baño de hielo por debajo de 5 °C, tras lo cual se añade gota a gota una disolución de $NaNO_2$ (0.25 g, 3.62 mmol en 2 mL de agua), volviéndose la disolución, inicialmente incolora, de color naranja intenso. Una vez finaliza la adición, se deja agitando durante 1 hora. A continuación se añade una disolución acuosa de NaOH concentrada hasta que la mezcla de reacción de color naranja se vuelve verde oscuro y aparece un precipitado (pH 10-11). Tras la extracción del producto en un embudo de decantación con diclorometano (2 x 150 mL) y secado de la fase orgánica con $MgSO_4$ anhidro, el diclorometano se concentra en el rotavapor. El sólido verde obtenido se purifica por cromatografía de columna de alúmina con diclorometano, obteniéndose finalmente un sólido verde oscuro brillante que se puede recrystalizar en metanol (0.71 g, 65 %).

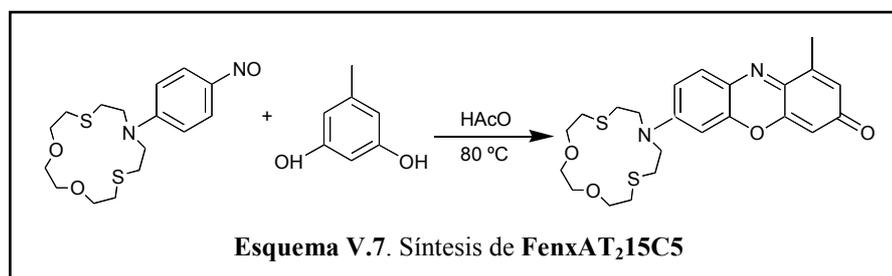


¹H RMN (CDCl₃): δ = 2.74 (t, 4H, CH₂CH₂S, *J* = 4.8 Hz), 2.90 (t, 4H, CH₂CH₂S, *J* = 8.0 Hz), 3.62 (s, 4H, CH₂CH₂O) 3.74-3.79 (m, 8H, CH₂CH₂N, CH₂CH₂O), 6.51 (d, 2H, ArH, *J* = 9.6 Hz), 8.03 (d, 2H, ArH, *J* = 9.6 Hz).

¹³C RMN (CDCl₃): δ = 29.4, 31.6, 52.3, 70.6, 74.3, 110.3, 153.0, 162.9.

Masa Exacta EI (*m/z* = *M*) calculada para C₁₆H₂₄N₂O₃S₂: 356.1228, encontrada: 356.1232.

7-(10-aza-1,4-dioxa-7,13-ditio-ciclopentadec-10-il)-1-metil-3H-fenoxazin-3-ona (AT₂15C₅-Fenx). 0.71 g de NOPhAT₂15C₅ (2.00 mmol) y 0.26 g de orcinol (2.10 mmol) se disuelven en 10 mL de ácido acético glacial. Esta disolución se mantiene a 80 °C durante 30 minutos y tras la evaporación del ácido acético el residuo de color violeta obtenido se purifica por cromatografía en columna de sílice con diclorometano:etanol (50:1 v/v) como eluyente. Se obtienen finalmente 0.19 g (rendimiento del 21 %) de un sólido violeta-rojizo intenso.

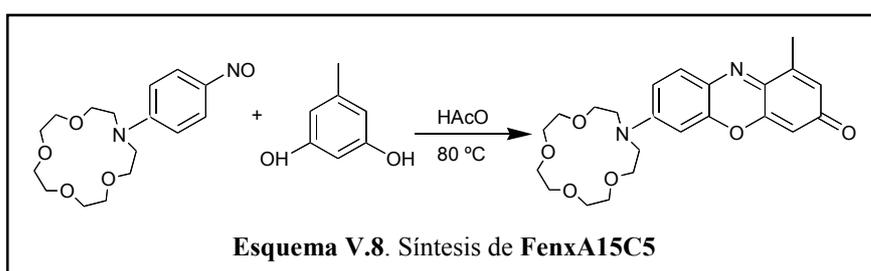


¹H RMN (CDCl₃): δ (ppm) = 2.37 (s, 3H, ArCH₃), 2.74 (t, 4H, CH₂CH₂S, *J* = 4.8 Hz), 2.90 (t, 4H, CH₂CH₂S, *J* = 7.5 Hz), 3.62 (s, 4H, CH₂CH₂O), 3.72 (t, 4H, CH₂CH₂N, *J* = 8.0 Hz), 3.78 (t, 4H, CH₂CH₂O, *J* = 4.8 Hz), 6.17 (d, 1H, ArH, *J* = 2.1 Hz), 6.38 (d, 1H, ArH, *J* = 2.5 Hz), 6.58 (s ancho, 1H, ArH), 6.62 (dd, 1H, ArH, *J* = 9.2, 2.6 Hz), 7.55 (d, 1H, ArH, *J* = 9.1 Hz).

^{13}C RMN (CDCl_3): δ (ppm) = 16.8, 29.5, 31.6, 52.4, 70.7, 74.4, 96.6, 105.2, 110.3, 125.9, 130.8, 132.0, 142.4, 142.9, 146.8, 150.7, 151.0, 186.0.

Masa Exacta EI ($m/z = M$) calculada para $\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}_2$: 460.1490, encontrada: 460.1500.

7-(13-aza-1,4,7,10-tetraoxa-ciclopentadec-13-il)-1-metil-3H-fenoxazin-3-ona (FenxA15C5). 0.50 g del derivado *p*-nitroso del **PhA15C5**⁵ (1.54 mmol) y 0.21 g de orcinol (1.70 mmol) se disuelven en 10 mL de ácido acético glacial. Esta disolución se mantiene a 80 °C durante 30 minutos y tras la evaporación del ácido acético el residuo de color violeta obtenido se purifica por cromatografía en columna de sílice con diclorometano:etanol (50:1 v/v) como eluyente. Se obtienen finalmente 0.12 g (rendimiento del 18 %) de un sólido de color rosa-rojizo.



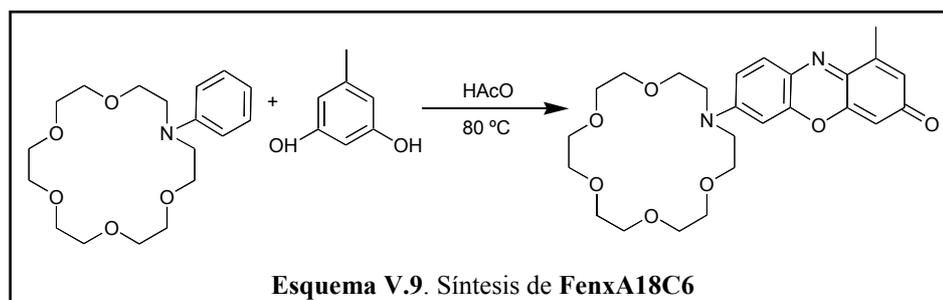
^1H RMN (CDCl_3): δ (ppm) = 2.39 (s, 3H, ArCH_3), 3.61 (s, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.66-3.71 (m, 8H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.80 (t, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$, $J = 5.9$ Hz), 6.18 (d, 1H, ArH , $J = 2.2$ Hz), 6.45 (d, 1H, ArH , $J = 2.7$ Hz), 6.60 (s ancho, 1H, ArH), 6.70 (dd, 1H, ArH , $J = 9.3, 2.7$ Hz), 7.56 (d, 1H, ArH , $J = 9.1$ Hz).

^{13}C RMN (CDCl_3): δ (ppm) = 16.7, 53.3, 68.0, 69.8, 70.3, 71.2, 96.5, 105.0, 110.4, 125.7, 130.6, 131.6, 142.3, 142.8, 146.6, 150.6, 151.8, 185.9.

Masa Exacta FAB ($m/z = M+1$) calculada para $\text{C}_{23}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}_6$: 429.2026, encontrada: 429.2054.

⁵ J. P. Dix, F. Vögtle *Chem. Ber.* **1980**, *113*, 457.

7-(16-aza-1,4,7,10,13-pentaoxa-ciclopentadec-16-il)-1-metil-3H-fenoxazin-3-ona (A18C6-Fenx). 0.60 g del derivado *p*-nitroso del PhA18C6⁶ (1.62 mmol) y 0.22 g de orcinol (1.77 mmol) se disuelven en 10 mL de ácido acético glacial. Esta disolución se mantiene a 80 °C durante 30 minutos y tras la evaporación del ácido acético el residuo de color violeta obtenido se purifica por cromatografía en columna de sílice con diclorometano:etanol (50:1 v/v) como eluyente. Se obtienen finalmente 0.11 g (rendimiento del 15 %) de un sólido de color violeta-rojizo intenso.



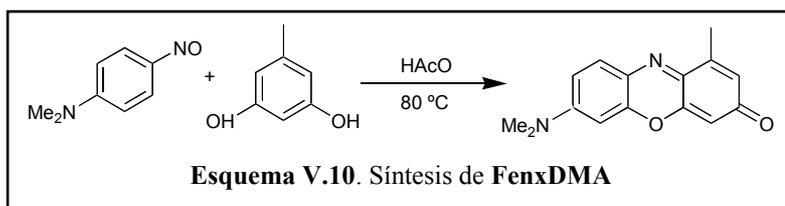
¹H RMN (CDCl₃): δ (ppm) = 2.39 (s, 3H, ArCH₃), 3.64 (s ancho, 16H, CH₂CH₂N, CH₂CH₂O), 3.74 (s, 8H, CH₂CH₂O), 6.17 (d, 1H, ArH, *J* = 2.2 Hz), 6.49 (d, 1H, ArH, *J* = 2.5 Hz), 6.59 (s ancho, 1H, ArH), 6.73 (dd, 1H, ArH, *J* = 9.1, 2.5 Hz), 7.55 (d, 1H, ArH, *J* = 9.1 Hz).

¹³C RMN (CDCl₃): δ (ppm) = 16.8, 51.8, 68.4, 70.7, 70.8, 70.8, 70.9, 96.6, 105.2, 110.5, 125.8, 130.7, 131.7, 142.3, 142.8, 146.7, 150.8, 152.2, 186.0.

Masa Exacta FAB (*m/z* = *M*+1) calculada para C₂₅H₃₃N₂O₇: 473.2288, encontrada: 473.2290.

7-(*N,N*-dimetilamino)-1-metil-3H-fenoxazin-3-ona (FenxDMA). Este compuesto utilizado como modelo para los estudios espectroscópicos se sintetizó de manera análoga a los derivados macrocíclicos, a partir de *N,N*-dimetil-4-nitrosoanilina y orcinol, a partir de 0.50 g de *N,N*-dimetil-4-nitrosoanilina (3.33 mmol) y 0.45 g de orcinol (3.66 mmol), con un rendimiento del 16 % (0.135 g).

⁶ S. M. S. Al-Amir, D. C. Ashworth, R. Narayanaswamy, R. E. Moss, *Talanta* **1989**, *36*, 645.



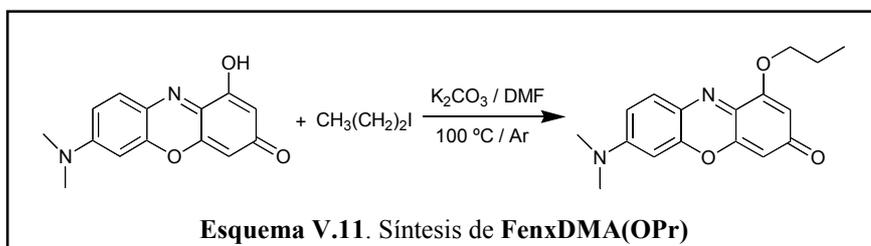
^1H NMR (CDCl_3): δ (ppm) = 2.37 (s, 3H, ArCH_3), 3.10 (s, 6H, ArNCH_3), 6.16 (d, 1H, ArH , $J = 2.1$ Hz), 6.39 (d, 1H, ArH , $J = 2.7$ Hz), 6.59 (s ancho, 1H, ArH), 6.65 (dd, 1H, ArH , $J = 9.1, 2.7$ Hz), 7.55 (d, 1H, ArH , $J = 9.1$ Hz).

^{13}C NMR: δ (ppm) = 16.8, 40.4, 96.3, 105.1, 110.3, 125.7, 130.6, 131.6, 142.3, 142.9, 146.5, 150.8, 153.5, 186.0.

Masa Exacta EI ($m/z = M$) calculada para $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$: 254.1055, encontrada: 254.1055.

7-(*N,N*-dimetilamino)-1-propoxi-3H-fenoxazin-3-ona (FenxDMA(OPr)).

Este compuesto se sintetiza a partir de 7-dimetilamino-1-hidroxi-3H-fenoxazin-3-ona⁷ (0.080 g, 0.31 mmol) y yoduro de propilo (0.080 g, 0.47 mmol), disueltos en 2 mL de dimetilformamida anhidra. A esta disolución se le añaden 0.086 g (0.62 mmol) de K_2CO_3 seco y la suspensión se agita durante 2 horas a 100 °C bajo atmósfera de argón, tras lo cual se elimina el exceso de K_2CO_3 mediante filtrado y la dimetilformamida se evapora en el rotavapor. Tras la purificación mediante cromatografía en columna de sílice con diclorometano:etanol (50:1 v/v), se obtienen 0.022 g (rendimiento del 24 %) de un sólido violeta.



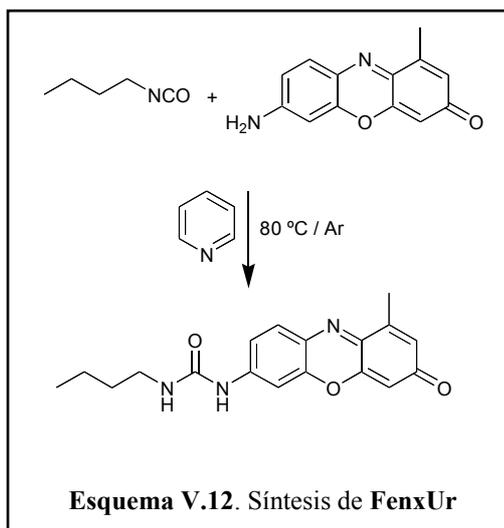
⁷ M. Kotouček, M. Martinek, E. Ružička, *Monatsh. Chemie*, **1965**, *96*, 1433.

^1H RMN (CDCl_3): δ (ppm) = 1.03 (t, 3H, CH_2CH_3 , $J = 7.3$ Hz), 1.86-1.97 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 3.08 (s, 6H, ArNCH_3), 4.00 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OAr}$, $J = 7.0$ Hz), 5.99 (d, 1H, ArH , $J = 1.8$ Hz), 6.03 (d, 1H, ArH , $J = 2.4$ Hz), 6.36 (d, 1H, ArH , $J = 2.7$ Hz), 6.62 (dd, 1H, ArH , $J = 9.3, 2.7$ Hz), 7.63 (d, 1H, ArH , $J = 9.3$ Hz).

^{13}C RMN (CDCl_3): δ (ppm) = 10.3, 21.7, 40.4, 70.8, 96.3, 103.4, 107.0, 110.1, 125.1, 132.2, 137.1, 146.8, 149.5, 153.7, 158.1, 185.9.

Masa Exacta EI ($m/z = M$) calculada para $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_3$: 298.1317, encontrada: 298.1232.

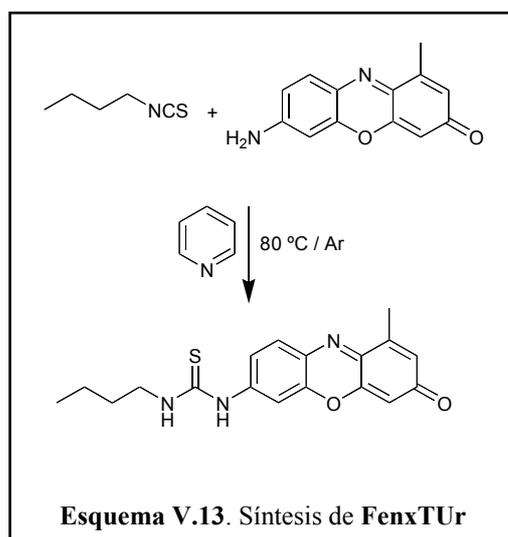
7-(*N'*-butilureido)-1-metil-3*H*-fenoxazin-3-ona (FenxUr). 0.014 g de **FenxNH₂** (0.062 mmol) y un exceso de 30 equivalentes, 0.184 g (1.86 mmol) de butil isocianato se disuelven en 2 mL de piridina anhidra y la mezcla se calienta a 80 °C bajo atmósfera de argón durante 6 horas. La piridina se concentra en el rotavapor y el crudo de reacción se cromatografía en columna de sílice con diclorometano:etanol (30:1 v/v). De esta manera se obtienen 0.011 g de un sólido naranja-rojizo brillante (rendimiento de 55 %).



^1H RMN (DMSO): δ (ppm) = 0.90 (t, 3H, CH_2CH_3 , $J = 7.3$ Hz), 1.25–1.38 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.39–1.48 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 2.35 (s, 3H, ArCH_3), 3.08–3.15 (q, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$, $J = 5.8$ Hz), 6.18 (s, 1H, ArH), 6.46 (t, 1H, CH_2NHCO , $J = 5.5$ Hz), 6.63 (s, 1H, ArH), 7.27 (d, 1H, ArH , $J = 8.8$ Hz), 7.70 (d, 1H, ArH , $J = 8.8$ Hz), 7.73 (s, 1H, ArH), 9.22 (s, 1H, CONHAr).

Masa Exacta EI ($m/z = M$) calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_3$: 325.1426, encontrado: 325.1437.

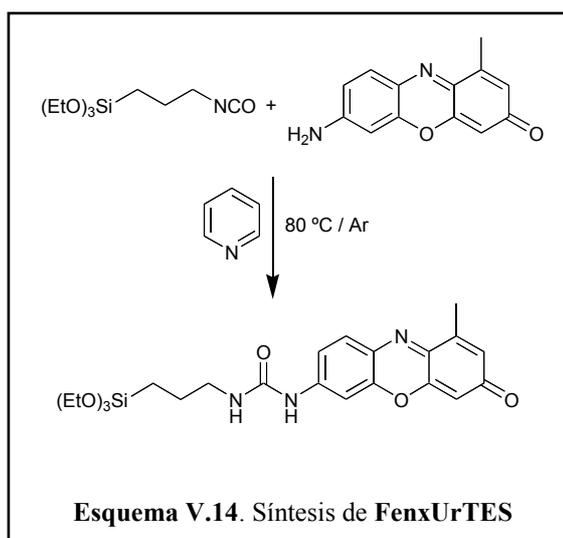
7-(*N'*-butiltioureido)-1-metil-3H-fenoxazin-3-ona (FenxTUR). 0.020 g de **FenxNH₂** (0.088 mmol) y un exceso de 30 equivalentes, 0.3 g (2.60 mmol) de butil isotiocianato se disuelven en 2 mL de piridina anhidra y la mezcla se calienta a 80 °C bajo atmósfera de argón durante 6 horas. La piridina se concentra en el rotavapor y el crudo de reacción se cromatografía en gel de sílice con diclorometano:etanol (30:1 v/v). De esta manera se obtienen 0.018 g de un sólido rojo oscuro (rendimiento de 60 %).



^1H RMN (DMSO): δ (ppm) = 0.90 (t, 3H, CH_2CH_3 , $J = 6.9$ Hz), 1.29–1.39 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.49–1.59 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 2.34 (s, 3H, CH_3Ar), 3.40–3.50 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 6.20 (s, 1H, ArH), 6.66 (s, 1H, ArH), 7.38 (d, 1H, ArH , $J = 9.7$ Hz), 7.75 (d, 1H, ArH , $J = 8.7$ Hz), 8.08 (s, 1H, ArH), 8.28 (s ancho, 1H, CH_2NHCS) 10.10 (s, 1H, CSNHAr).

Masa Exacta EI ($m/z = M$) calculada para $C_{18}H_{19}N_3O_2S$: 341.1198, encontrada: 341.1108.

1-metil-7-[N'-(trietoxisilil)propilureido]-3H-fenoxazin-3-ona (FenxUrTES). 0.030 g de FenxNH₂ (0.13 mmol) y un exceso de 30 equivalentes, 0.96 g (3.90 mmol) de 3-(trietoxisilil)propil isocianato se disuelven en 3 mL de piridina anhidra y la mezcla se calienta a 80 °C bajo atmósfera de argón durante 6 horas. La piridina se concentra en el rotavapor y el crudo de reacción se cromatografía en gel de sílice con diclorometano:etanol (30:1 v/v). De esta manera se obtienen 0.039 g de un sólido naranja-rojizo brillante (rendimiento de 62 %).



¹H NMR (DMSO): δ (ppm) = 0.58 (t, 2H, CH_2CH_2Si , $J = 7.8$ Hz), 1.15 (t, 9H, CH_2CH_3 , $J = 7.2$ Hz), 1.46–1.55 (m, 2H, $CH_2CH_2CH_2$), 2.35 (s, 3H, CH_3Ar), 3.08 (q, 2H, CH_2CH_2NH , $J = 6.5$ Hz), 3.73 (q, 6H, CH_3CH_2O , $J = 7.2$ Hz), 6.16 (s, 1H, ArH), 6.55 (t, 1H, CH_2NHCO , $J = 5.8$ Hz), 6.63 (s, 1H, ArH), 7.27 (d, 1H, ArH , $J = 8.4$ Hz), 7.70 (d, 1H, ArH , $J = 8.8$ Hz), 7.73 (s, 1H, ArH), 9.29 (s, 1H, $CONHAr$).

Masa Exacta FAB ($m/z = M+1$) calculada para $C_{23}H_{32}N_3O_6Si$: 474.2060, encontrada: 474.2126.

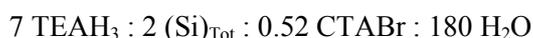
1.2.b) Fase heterogénea.

General. Para la síntesis de **UVM-7** o materiales híbridos derivados de ésta, se han empleado siempre las siguientes proporciones en número de moles de reactivos:⁸

- Para la **UVM-7** blanca:



- Para los materiales híbridos orgánico-inorgánico obtenidos por cohidrólisis:

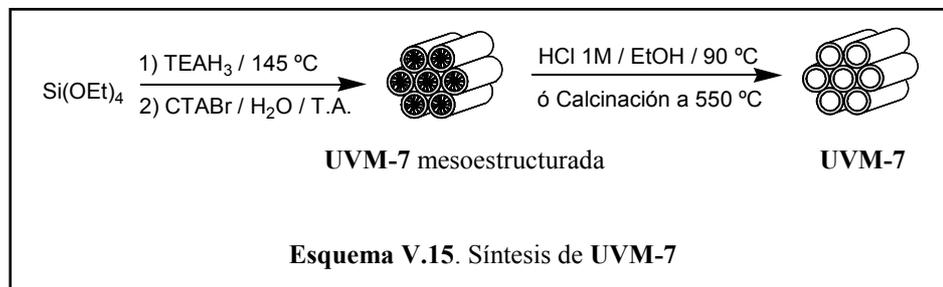


Donde $(\text{Si})_{\text{Tot}}$ representa la cantidad total de alcoxisilano empleado como fuente de sílice referida al número de moles de silicio.

UVM-7. En un vaso seco de 500 mL se pesan 51.52 g de trietanolamina (345 mmol) y se añaden (22.0) mL de tetraetoxisilano (98.6 mmol). La mezcla se agita y se calienta a 145 °C durante el tiempo necesario (unos 20 minutos) hasta que se deje de observar el desprendimiento de etanol que se libera como consecuencia de la formación del atrano entre la trietanolamina y el tetraetoxisilano. Se deja enfriar sobre la misma placa calefactora hasta unos 120 °C y se añaden 9.35 g de bromuro de cetiltrimetilamonio (25.6 mmol) con una espátula poco a poco evitando la formación de grumos. Una vez se ha disuelto todo el surfactante, se deja enfriando la mezcla hasta unos 75 °C (no conviene que se enfríe mucho más porque si no el CTABr comienza a precipitar) y se añaden 160 mL de agua destilada (8.89 mol). La mezcla se deja agitando a temperatura ambiente durante 24 horas, tras lo cual, la pasta blanca de aspecto gelatinoso obtenida se filtra a vacío en un Buchner y se

⁸ J. E. Haskouri, D. Ortiz de Zárate, C. Guillem, J. Latorre, M. Caldés, A. Beltrán, D. Beltrán, A. B. Descalzo, G. Rodríguez-López, R. Martínez-Mañez, M. D. Marcos, P. Amorós, *Chem. Commun.* **2002**, 330–331.

lava con agua:etanol (75:25 v/v) hasta que el ensayo con AgNO_3 da negativo (eliminación cuantitativa de los bromuros), para lo que son necesarios aproximadamente 400 mL de disolución de lavado. Tras esto, la **UVM-7** mesoestructurada obtenida, se deja secando en la estufa a $110\text{ }^\circ\text{C}$ hasta peso constante. Se obtienen 10.5 g de **UVM-7** mesoestructurada.



Para la eliminación del surfactante, se han seguido dos procedimientos distintos.

1) Mediante calcinación a $550\text{ }^\circ\text{C}$, en una mufla con un programa de temperatura de una rampa de $110\text{ }^\circ\text{C h}^{-1}$ hasta alcanzar los $550\text{ }^\circ\text{C}$ y manteniéndolo a esta temperatura durante 3 horas. 5 g de sólido mesoestructurado dieron 2.6 g de **UVM-7**.

2) Mediante extracción con HCl 1 M en etanol. Al ser un surfactante catiónico, permite el intercambio con protones de manera que el surfactante se extrae en el etanol acuoso en forma de cloruro de cetiltrimetilamonio. Se preparan 500 mL de una disolución de HCl 1 M en etanol (41.7 mL HCl concentrado + 458.3 mL de etanol del 96 %) y se suspenden 5.0 g de **UVM-7** mesoestructurada, que previamente ha sido molturada para optimizar la eficacia de la extracción. Se mantiene a reflujo durante 24 horas tras lo cual se filtra a vacío en un Buchner y el sólido obtenido se lava con agua destilada hasta que las aguas de lavado dan pH 6. Se lava finalmente con etanol para facilitar la eliminación del agua y se deja secando en la estufa a $110\text{ }^\circ\text{C}$ durante 24 horas. Peso del sólido obtenido: 2.5 g.

En la Fig. V.1 se muestran los termogramas para una **UVM-7** calcinada y otra **UVM-7** obtenida mediante extracción con HCl.

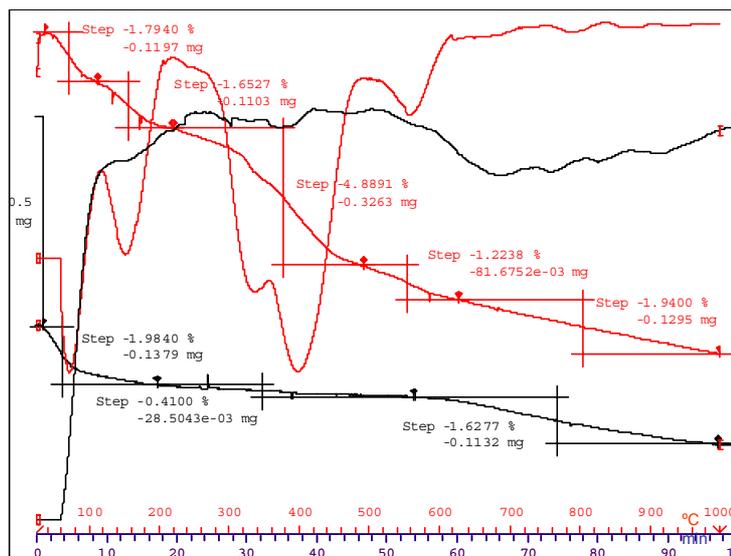


Fig. V.1. Diagramas de ATG con la curva de pérdida de peso en función de la temperatura y la primera derivada de la curva para **UVM-7** calcinada a 550 °C (en negro) y **UVM-7** en la que el surfactante ha sido eliminado mediante extracción con HCl 1 M en etanol (en rojo).

En la mayoría de los termogramas de este capítulo se pueden diferenciar básicamente tres tipos de región, en los que tienen lugar diferentes procesos en función de la temperatura.

- En la región I, comprendida entre 25 °C y 200 °C se suele observar la pérdida del disolvente que permanece adsorbido en el sólido por evaporación (se trata de un proceso endotérmico que se puede apreciar en las curvas de análisis termogravimétrico diferencial que no se muestran aquí).

- La región II, comprendida entre 200 °C y 600 °C, es la que más nos interesa, ya que es en la que se observa la pérdida en peso por la combustión de la materia orgánica (proceso exotérmico).

- Finalmente, en la región III que va desde 600 °C hasta 1000 °C se observa una pérdida en peso atribuida a la pérdida de agua como consecuencia de la condensación de los grupos silanol, que suele representar un 1-2 % del peso total de la muestra (ver el termograma de **UVM-7** calcinada en la Fig. V.1).

Generalmente a partir de la primera derivada de la curva del termograma se pueden delimitar las distintas regiones.

Porcentajes de pérdida en peso por ATG en intervalos de temperatura.

UVM-7 calcinada. 25-200 °C: 1.98%, 200-550 °C: **0.41%**, 550-1000 °C: 1.63%.

UVM-7 extrac. HCl. 25-200 °C: 5.24%, 200-600 °C: **6.11%**, 600-1000 °C: 1.94%.

Así, una **UVM-7** calcinada no experimenta pérdida de peso en las región II, ya que toda la materia orgánica que contenía el sólido mesoestructurado ha sido previamente calcinada. Sin embargo, sí que se observa una pérdida en peso de un 1.63 % a $T > 500$ °C atribuido a la condensación de los grupos silanol. En el caso de la **UVM-7** en la que el surfactante ha sido eliminado por extracción con disolvente en medio HCl, y a pesar de que el proceso se ha realizado por duplicado para maximizar la cantidad de CTABr extraída, se observa en la región II una pérdida de hasta un 6.11%, lo que induce a pensar que la extracción no es total, o que algunos de los grupos silanol de la superficie han condensado con el etanol empleado como disolvente para dar lugar a un etóxido de silicio.

U-NH₂(X)-Co. En un matraz de fondo redondo de una boca de 500 mL se pesan 38.7 g de trietanolamina (259 mmol) y en función de X –que representa el porcentaje en moles de 3-(aminopropil)triétoxosilano con respecto a la cantidad de Si total– se añaden las cantidades correspondientes de tetraétoxosilano y 3-(aminopropil)triétoxosilano (Tabla V.1).

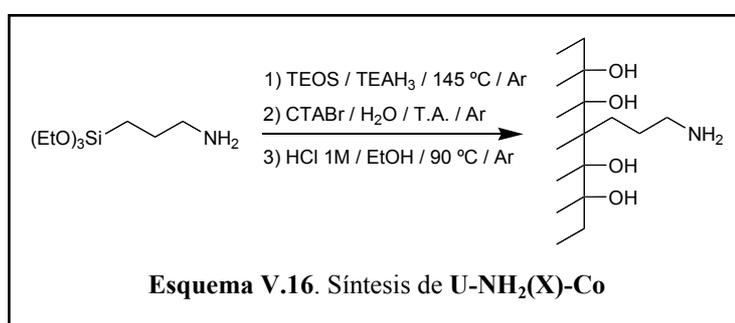
Tabla V.1. Cantidad de reactivos empleados para la síntesis de **U-NH₂(X)-Co** en función de X.

| X (% mol) | TEOS | | APTES | |
|-----------|------|------|-------|------|
| | mL | mmol | mL | mmol |
| 2 | 16.2 | 72.6 | 0.35 | 1.48 |
| 10 | 14.9 | 66.7 | 1.73 | 7.41 |

La mezcla se agita y se mantiene bajo argón para evitar la posible oxidación de la amina a las elevadas temperaturas que son necesarias para la formación del atrano. Para esto, el matraz se acopla a un refrigerante conectado a un Dean-Stark

donde se recoge el etanol que se desprende. Se calienta a 145 °C hasta que se recogen unos 11 mL de etanol. Se deja enfriar hasta 120 °C, se desmonta el Dean-Stark y se añaden 7.02 g de bromuro de cetiltrimetilamonio (19.3 mmol) con una espátula poco a poco evitando la formación de grumos. Una vez se ha disuelto todo el surfactante, se deja enfriando la mezcla hasta 75 °C y se añaden 120 mL de agua destilada (6.67 mol). La mezcla se deja agitando a temperatura ambiente durante 24 horas, tras lo cual, la pasta blanca de aspecto gelatinoso obtenida, se filtra a vacío en un Buchner y se lava con 300 mL de agua:etanol (75:25 v/v). Tras esto, la **UVM-7** mesoestructurada obtenida, se deja secando en la estufa a 110 °C hasta peso constante.

En ambos casos se obtienen unos 8 g del material mesoestructurado, de los que 7.5 g fueron extraídos en 750 mL de HCl 1 M a reflujo bajo argón durante 24 horas. Peso final de **U-NH₂(2)-Co**, 4.5 g y de **U-NH₂(10)-Co**, 4.4 g.



U-NHAn(X-E)-Co. Se pesan 0.50 g de **U-NH₂(X)-Co** en un matraz de fondo redondo de 50 mL y se suspenden en 20 mL de etanol absoluto. Se añade un exceso (de aproximadamente un 50 % en moles con respecto a los moles que puedan haber de amina en los 0.50 g del sólido) de 9-antracenoaldehído (ver Tabla V.2). Se dejan agitando a 45 °C bajo atmósfera de argón y el sólido obtenido se filtra y se lava un par de veces con etanol absoluto para eliminar el exceso de antraceno que no ha reaccionado.

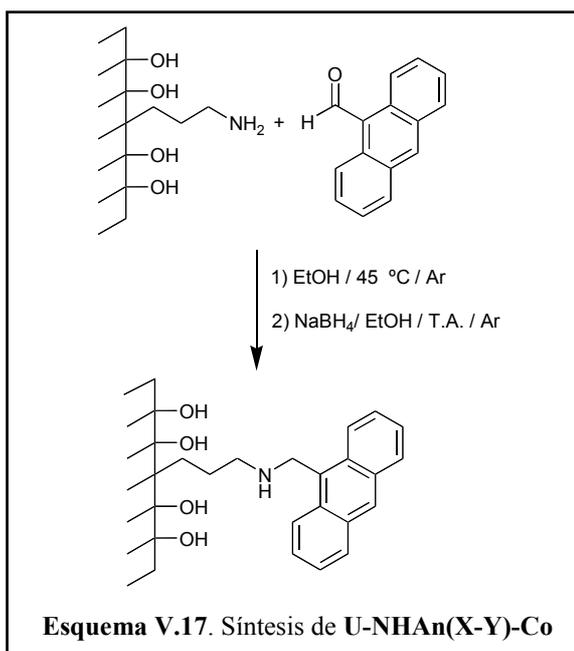
Inmediatamente a continuación se procede a la reducción de la imina formada con borohidruro sódico (Esquema V.17). El sólido se vuelve a suspender en otros 20 mL de etanol absoluto con agitación y bajo atmósfera de argón. A temperatura ambiente se le añade el borohidruro sódico (Tabla V.2) y se deja agitando 24 horas más. A continuación, el sólido **U-NHAn(X-E)-Co** se filtra y se lava varias veces con etanol absoluto, después con HCl 0.1 M para destruir el

exceso de borohidruro sódico, agua destilada hasta pH 6-7 y finalmente etanol. Por último, y para asegurar la completa eliminación del 9-antracenoaldehído que haya quedado adsorbido, se mantiene extrayendo en un Soxhlet con etanol absoluto durante al menos 6 horas.

Tabla V.2. Cantidad de reactivos empleados para la síntesis de **U-NHAn(X-E)-Co** en función de **X**, a partir de 0.5 g de **U-NH₂(X)-Co**.

| X (% mol) | 9-antracenoaldehído | | NaBH₄ | |
|------------------|----------------------------|------|-------------------------|------|
| | g | mmol | g | mmol |
| 2 | 0.051 | 0.25 | 0.012 | 0.30 |
| 10 | 0.26 | 1.26 | 0.057 | 1.51 |

U-NHAn(10-1)-Co. Se sigue el mismo procedimiento que para **U-NHAn(10-E)-Co**, solo que ahora el antraceno no se pone en exceso, si no que se controla que sea aproximadamente un 1 % en moles con respecto a la amina, es decir, se añaden 0.017 g de 9-antracenoaldehído (0.082 mmol) a 0.50 g de **U-NH₂(10)-Co**.



En la Fig. V.2 se muestran los correspondientes diagramas de ATG para U-NH₂(2)-Co, U-NHAn(2-E)-Co, U-NH₂(10)-Co y U-NHAn(10-E)-Co.

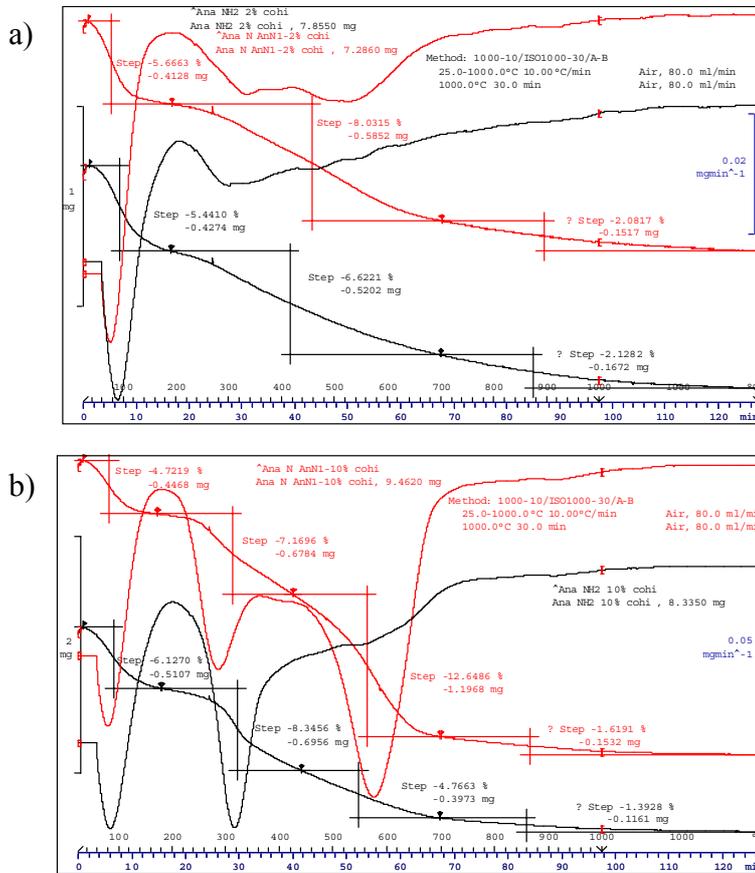


Fig. V.2. Diagramas de ATG con la curva de pérdida de peso en función de la temperatura y la primera derivada de la curva para a) U-NH₂(2)-Co (en negro) y U-NHAn(2-E)-Co (en rojo); b) U-NH₂(10)-Co (en negro) y U-NHAn(10-E)-Co (en rojo).

Porcentajes de pérdida en peso por ATG en intervalos de temperatura.

U-NH₂(2)-Co. 25-200 °C: 5.44%, 200-700 °C: **6.62%**, 700-1000 °C: 2.13%.

U-NHAn(2-E)-Co. 25-200 °C: 5.67 %, 200-700 °C: **8.03%**, 700-1000 °C: 2.08%

U-NH₂(10)-Co. 25-200 °C: 6.13%, 200-700 °C: **13.11%**, 700-1000 °C: 1.39%.

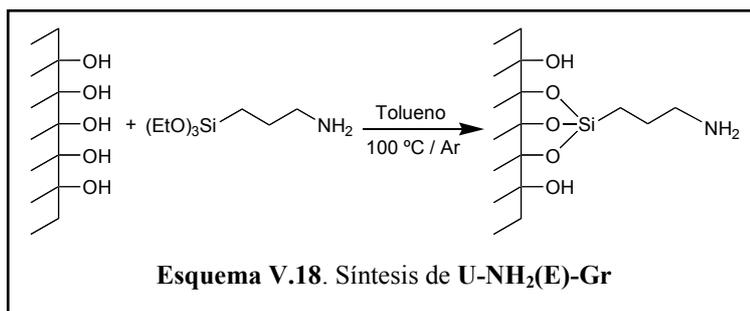
U-NHAn(10-1)-Co. 25-200 °C: 5.22 %, 200-700 °C: **14.38%**, 700-1000 °C: 2.06%

U-NHAn(10-E)-Co. 25-200 °C: 4.72%, 200-700 °C: **19.82%**, 700-1000 °C: 1.62%.

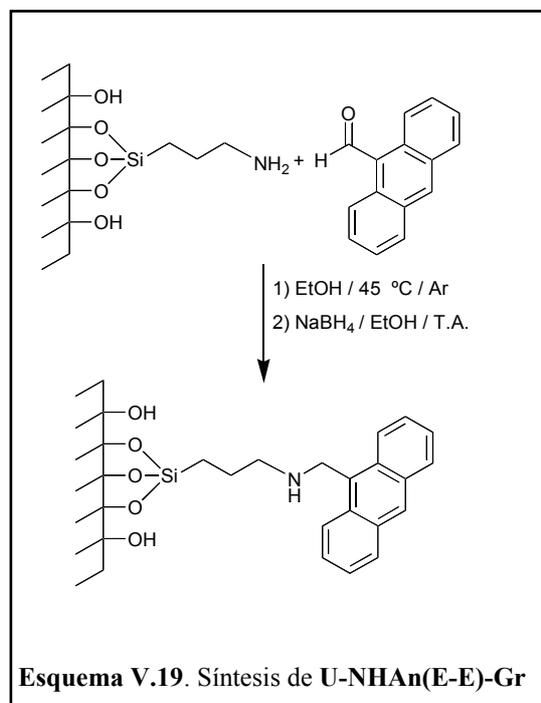
En todos los casos se observa cómo a medida que aumenta el grado de funcionalización, aumenta el porcentaje de pérdida en peso de la región II (porcentajes en negrita). Sin embargo, de estos datos no se pueden calcular contenidos en materia orgánica fiable como ya se ha comentado anteriormente, ya que siempre se observan porcentajes de pérdida mayores a los que cabría esperar. Así por ejemplo, en el caso de **U-NH₂(2)-Co** la pérdida en peso de la región II debería ser de un 2 % (el peso molecular de la sílice es similar al fragmento - (CH₂)₃NH₂), sin embargo lo que se observa es una pérdida de un 6.62%, algo que cabía esperar, ya que incluso en el caso de una **UVM-7** blanca en la que el surfactante ha sido extraído con HCl/EtOH ya se observan pérdidas de peso comprendidas entre un 4% y un 6%. Se puede observar además cómo el perfil de la curva de la derivada va cambiando con el grado de funcionalización.

U-NH₂(E)-Gr. En un matraz de fondo redondo de 100 mL conectado a un Dean-Stark bajo atmósfera de argón se suspenden 1.00 g de **UVM-7** en 80 mL de tolueno anhidro. Este sólido **UVM-7** –en el que surfactante ha sido extraído con HCl 1 M en etanol– se ha mantenido en la estufa a 100 °C durante 1 día previo a su uso. Tras esto la mezcla se calienta a 140 °C para eliminar los posibles restos de agua adsorbida en el sólido, mediante una destilación azeotrópica tolueno:agua (composición del azeótropo 79.8:20.2, punto de ebullición: 85 °C),⁹ para evitar la presencia de agua que podría inducir la policondensación de los grupos alcoxisilano, y favorecer así la formación de una monocapa de ligando en la superficie del sólido. Tras recoger unos 20 mL de tolueno, la mezcla se deja enfriar a 90 °C, se desmonta el Dean-Stark y se añade un gran exceso de 3-(aminopropil)trióxosilano (2.81 mL, 12 mmol). Ver Esquema V.18. Al cabo de una noche (unas 18 horas) la suspensión se filtra y el sólido blanco obtenido se lava con tolueno, diclorometano y finalmente etanol.

⁹ *CRC Handbook of Chemistry and Physics*; Ed. R. C Weast; CRC Press: Boca Raton, 1980, 60th edn.



U-NHAn(E-E)-Gr. 0.40 g de U-NH₂(E)-Gr se suspenden en 20 mL de etanol absoluto en un matraz de fondo redondo de 50 mL y se añaden 0.27 g (1.33 mmol) de 9-antracenoaldehído. La mezcla se deja agitando a 45 °C bajo atmósfera de argón durante 1 día y el sólido obtenido se filtra y se lava un par de veces con etanol absoluto para eliminar el exceso de antraceno que no ha reaccionado. Inmediatamente a continuación se procede a la reducción de la imina formada (Esquema V. 19).



El sólido se suspende de nuevo en etanol absoluto (20 mL) y se añaden 0.05 g (1.35 mmol) de borohidruro sódico, manteniendo la suspensión en agitación a temperatura ambiente durante 24 horas, tras lo cual se filtra y se lava varias veces con etanol absoluto, después con HCl 0.1 M para destruir el exceso de borohidruro sódico, agua destilada hasta pH 6-7 y finalmente etanol. Por último, y para asegurar la completa eliminación del 9-antracenoaldehído que haya quedado adsorbido, se mantiene extrayendo en un Soxhlet con etanol absoluto durante al menos 6 horas.

Aquí de nuevo se observa un aumento en el porcentaje en pérdida de materia orgánica por ATG en la región II a medida que aumenta la funcionalización.

U-NH₂(E)-Gr. 25-200 °C: 2.93%, 200-700 °C: **17.08%**, 700-1000 °C: 1.23%.

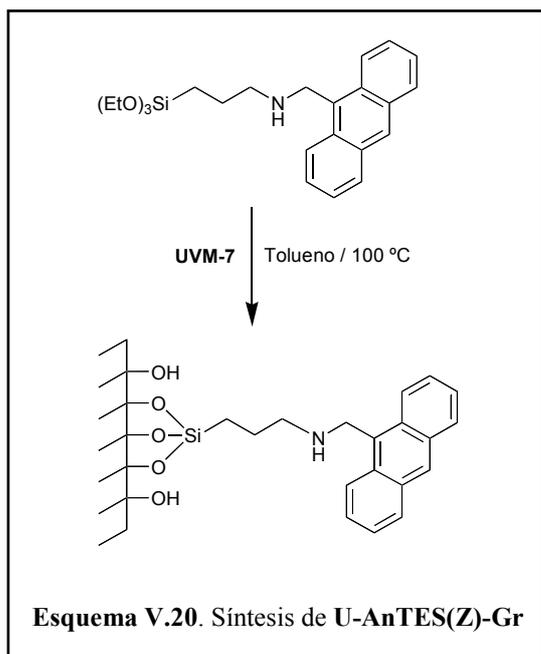
U-NHAn(E-E)-Gr. 25-200 °C: 3.50%, 200-700 °C: **32.13%**, 700-1000 °C: 1.28%.

U-AnTES(Z)-Gr. En un matraz de fondo redondo de 100 mL conectado a un Dean-Stark bajo atmósfera de argón, se suspenden 0.20 g de **UVM-7** en 40 mL de tolueno anhidro. Este sólido **UVM-7** –en el que surfactante ha sido extraído con HCl 1 M en etanol– se ha mantenido en la estufa a 100 °C durante 1 día previo a su uso. La mezcla se calienta a 140 °C para eliminar los posibles restos de agua adsorbida en el sólido, mediante una destilación azeotrópica tolueno:agua. Tras recoger unos 15-20 mL de tolueno, la mezcla se deja enfriar a 90 °C, se desmonta el Dean-Stark y se añade el trietoxisilil derivado del aminoantraceno (Esquema V.20) disuelto en 5 mL de tolueno anhidro en las proporciones en las que se indican en la Tabla V.3.

Tabla V.3. Cantidad de **AnTES** empleada para la síntesis de **U-AnTES(Z)-Gr** en función de **X**, a partir de 0.2 g de **UVM-7**.

| Z (% mol) | AnTES | |
|------------------|--------------|-------|
| | mg | mmol |
| 0.3 | 4.1 | 0.010 |
| 1 | 13.7 | 0.033 |
| 2 | 27.4 | 0.067 |
| 4 | 54.9 | 0.133 |

Donde **Z** representa el porcentaje en número de moles de **AnTES** con respecto al número de moles de sílice, calculando el número de moles de sílice como los gramos de **UVM-7** divididos por el peso molecular del SiO₂.



La suspensión se mantiene agitando a 90 °C durante 1 noche (unas 18 horas) y al cabo de este tiempo, se deja enfriar, se filtra y se lava con tolueno y diclorometano. Finalmente y para asegurar la eliminación del reactivo que haya podido quedar adsorbido, se extrae en un Soxhlet con etanol durante 6 horas.

Porcentajes de pérdida en peso por ATG en intervalos de temperatura obtenidos a partir de los termogramas de la Fig. V.3.

U-AnTES(0.3)-Gr. 25-200 °C: 2.02%, 200-650 °C: **8.75%**, 650-1000 °C: 1.53%.

U-AnTES(1)-Gr. 25-200 °C: 3.59%, 200-650 °C: **12.64%**, 650-1000 °C: 1.79%.

U-AnTES(2)-Gr. 25-150 °C: 1.86%, 150-700 °C: **13.10%**, 700-1000 °C: 1.00%.

U-AnTES(4)-Gr. 25-200 °C: 2.26%, 200-700 °C: **19.58%**, 700-1000 °C: 1.50%.

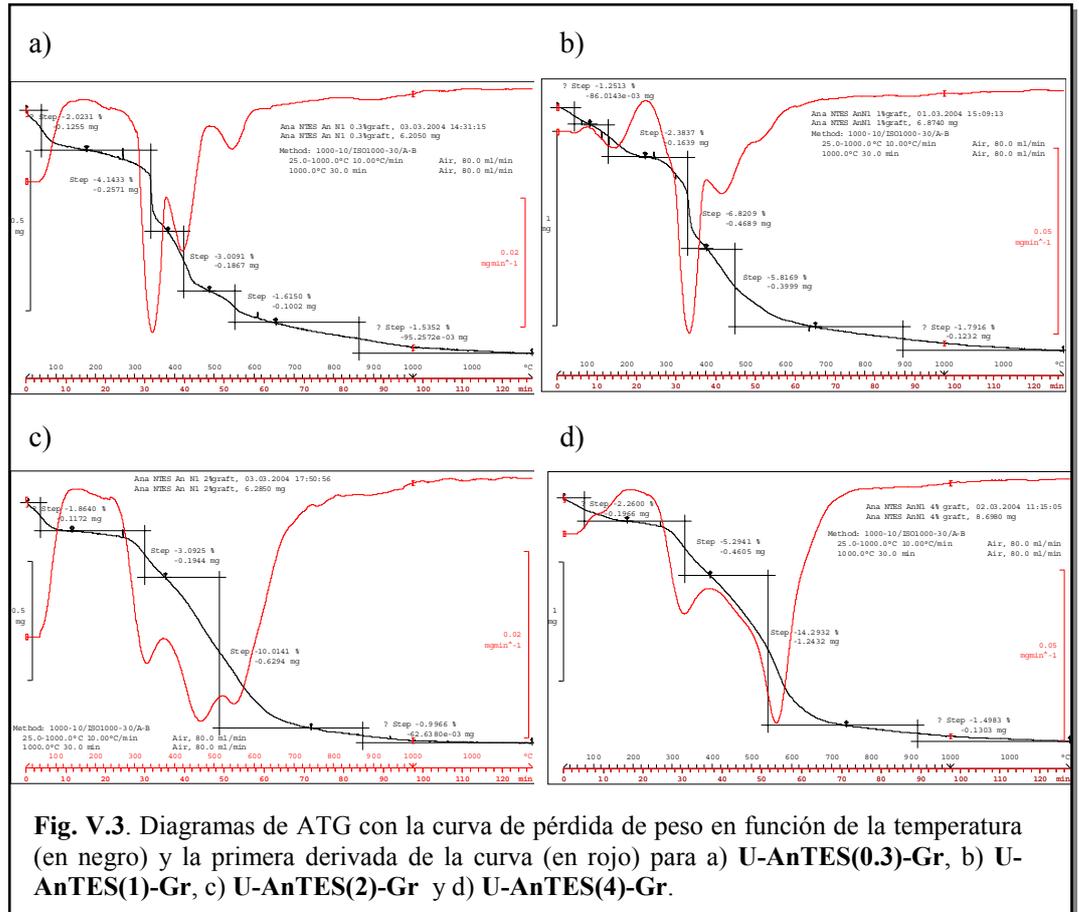
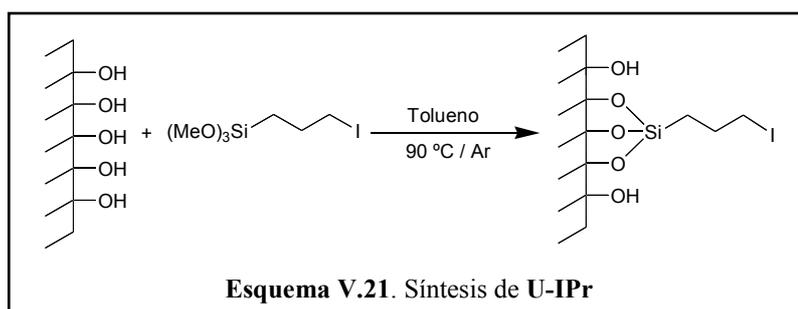
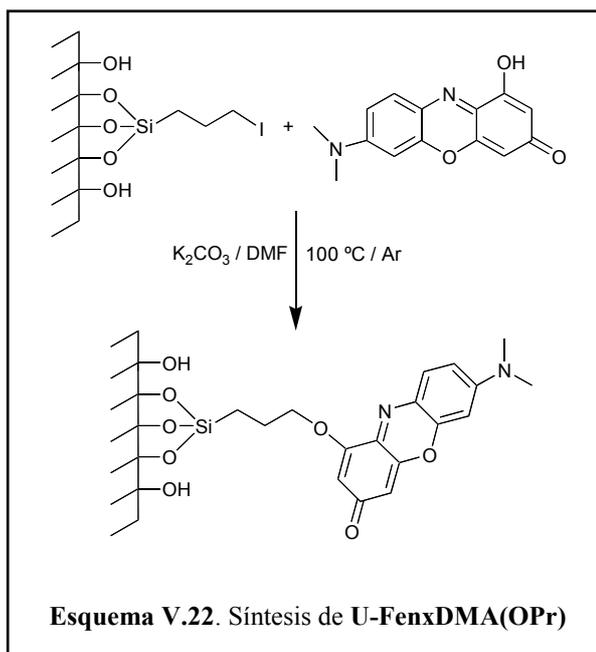


Fig. V.3. Diagramas de ATG con la curva de pérdida de peso en función de la temperatura (en negro) y la primera derivada de la curva (en rojo) para a) U-AnTES(0.3)-Gr, b) U-AnTES(1)-Gr, c) U-AnTES(2)-Gr y d) U-AnTES(4)-Gr.

U-IPr. Una suspensión de 1.00 g de UVM-7 calcinada, en 40 mL de tolueno anhidro, se introduce en un matraz de fondo redondo conectado a un Dean-Stark. La mezcla se calienta a 140 °C bajo argón y se destilan 20 mL de tolueno para eliminar trazas de agua. Después de esto, la mezcla se deja enfriar a 90 °C y entonces se añaden 0.097 g (0.33 mmol) de 3-(yodopropil)trimetoxisilano. La suspensión se deja agitando durante 6 h a esta temperatura y a continuación se filtra a vacío y el sólido blanco se lava varias veces con tolueno y diclorometano, tras lo cual se mantiene en la estufa a 70 °C durante 2 h.

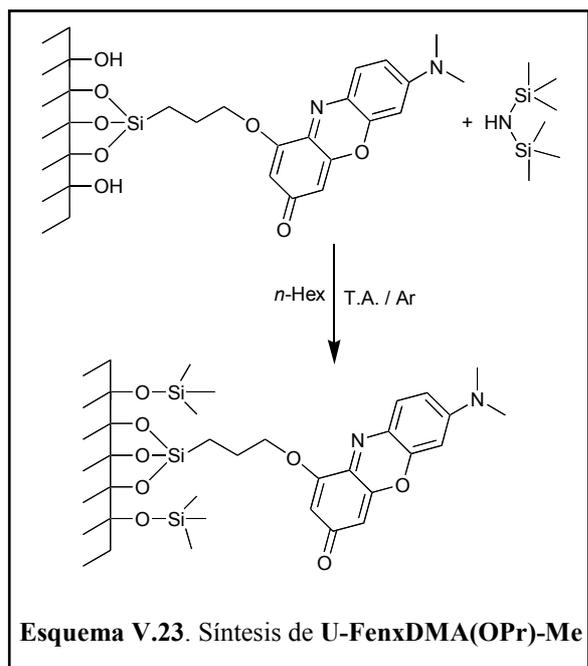


U-FenxDMA(OPr). 0.9 g de **U-IPr** fueron utilizados inmediatamente tras el paso anterior para su funcionalización con el derivado fenólico de la dimetilaminofenoxazinona (Esquema V.22). Este sólido fue suspendido en una disolución de 0.085 g de 7-(N,N-dimetilamino)-1-hidroxi-3H-fenoxazin-3-ona (0.33 mmol) en 10 mL dimetilformamida anhidra. Tras esto, 0.092 g de K_2CO_3 seco (0.67 mmol) se añadieron a la suspensión con el fin de neutralizar el HI que se libera durante la reacción. Esta suspensión se agita a 100 °C bajo atmósfera de argón y al cabo de 2 horas se filtra a vacío. El sólido blanco obtenido se lava con 80 mL de HCl 0.1 M para eliminar el exceso de K_2CO_3 , después con agua hasta pH 6-7, etanol y finalmente diclorometano. El sólido de color violeta se mantiene en extracción con un Soxhlet durante 6 h con etanol y después se seca en estufa a 75 °C hasta peso constante.

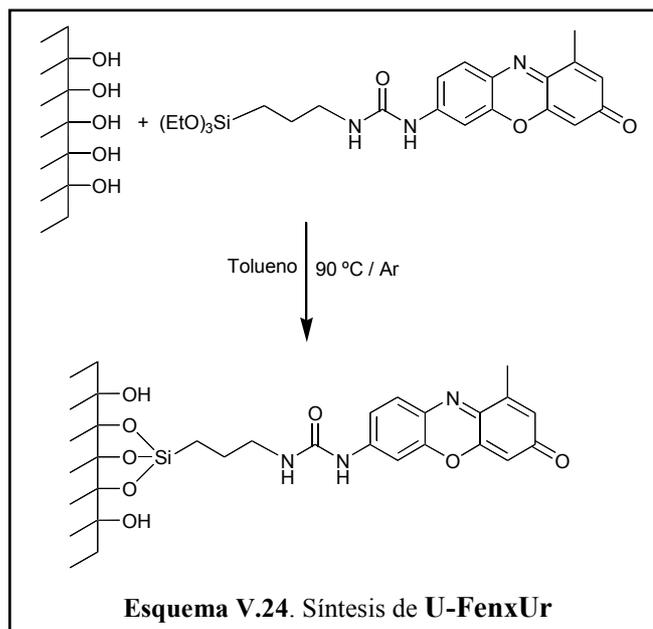


Esta muestra se separa en dos fracciones, una se utiliza tal cual para los estudios solvatocrómicos posteriores y la otra para la síntesis de **U-FenxDMA(OPr)-Me**.

U-FenxDMA(OPr)-Me. 1.27 mL de HMDS (6.0 mmol) se añaden a una suspensión de 0.40 g de **U-FenxDMA(OPr)** en 15 mL de *n*-hexano a temperatura ambiente y se mantiene con agitación magnética bajo argón durante toda la noche. El sólido obtenido se lava exhaustivamente mediante filtrado con *n*-hexano y finalmente con diclorometano. El alto grado de hidrofobación del material se puede apreciar fácilmente por el cambio de color del sólido seco de violeta a rosa y por la aparición de bandas correspondientes a vibraciones características del grupo $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ en el espectro de IR (ver Capítulo III, apartado B.2.2)).

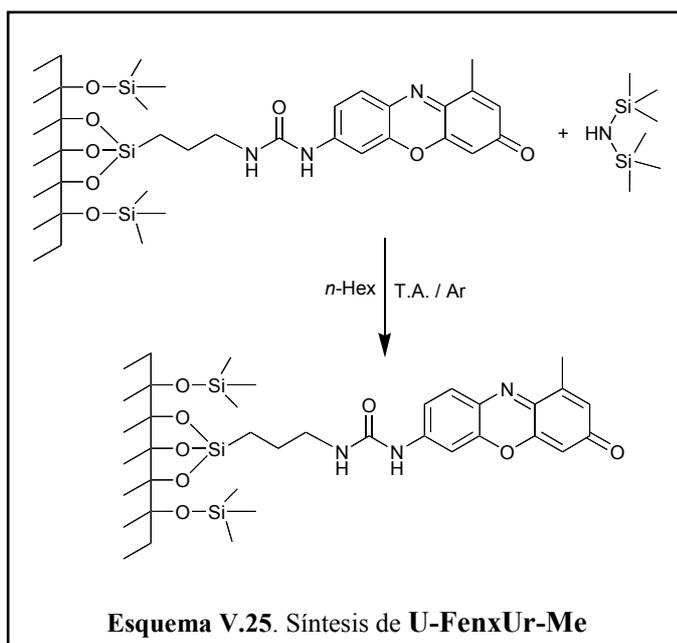


U-FenxUr. 0.036 g **FenxUrTES** (0.08 mmol) se disolvieron previamente en 2 mL de dimetilformamida anhidra ya que no es soluble totalmente en tolueno. Tras esto, se añaden 16 mL de tolueno anhidro y la disolución se calienta a 80 °C bajo atmósfera de argón, añadiéndose a continuación 1.00 g de **UVM-7** calcinada y secada en estufa a 120 °C durante 1 noche. La suspensión se agita a esta temperatura durante 24 horas y el sólido de color naranja obtenido se filtra y se lava varias veces con tolueno y diclorometano, tras lo que se mantiene 6 horas extrayéndose con etanol en un Soxhlet. Finalmente se seca a 75 °C hasta peso constante.



Este material se separa en 2 fracciones, **U-FenxUr** que se utiliza tal cual para los estudios posteriores y otra fracción que se utiliza para el paso siguiente de hidrofobación.

U-FenxUr-Me. 1.27 mL de HMDS (6.0 mmol) se añaden a una suspensión de 0.40 g de **U-FenxUr** en 15 mL de *n*-hexano a temperatura ambiente y se mantiene con agitación magnética bajo argón durante toda la noche. El sólido obtenido se lava exhaustivamente mediante filtrado con *n*-hexano y finalmente con diclorometano. El alto grado de hidrofobación del material se puede apreciar fácilmente por el cambio de color del sólido seco de naranja (**U-FenxUr**) a amarillo y por las bandas del espectro de IR (ver Capítulo III, apartado B.3.2)).

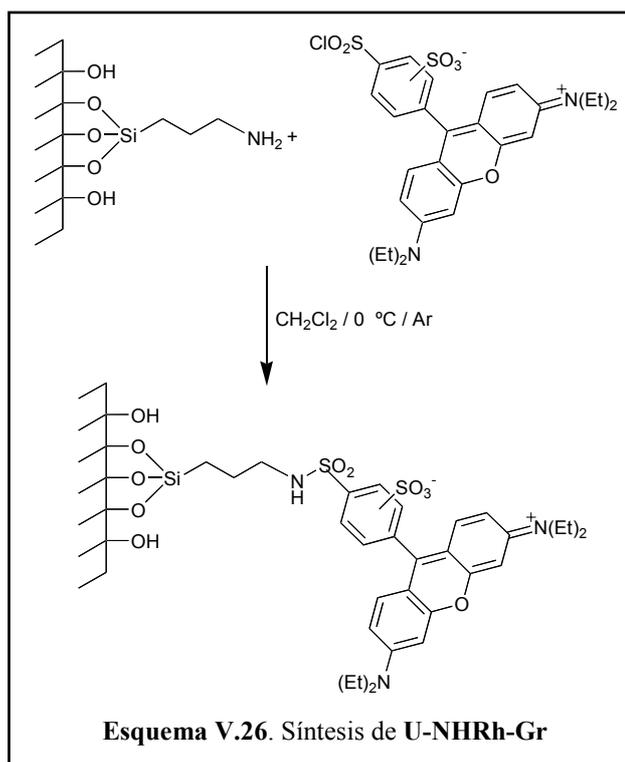


En el caso de los materiales **U-FenxDMA(OPr)-Me** y **U-FenxUr-Me** es posible medir la densidad óptica de una suspensión preparada con estos sólidos, ya que los materiales son transparentes en el intervalo de longitud de onda de medida. Por esta razón, en lugar de emplear la técnica de ATG –poco fiable para concentraciones bajas de cromóforo– se ha decidido hacer una estimación del contenido por gramo de sólido a partir de los valores del coeficiente de absorción molar tal y como se describe en el apartado 2.2 de este capítulo. Obteniendo los siguientes valores:

$$\mathbf{U-FenxDMA(OPr)-Me} \quad c = (5.04 \pm 0.12) \times 10^{-3} \text{ mmol g}^{-1}$$

$$\mathbf{U-FenxUr-Me} \quad c = (1.21 \pm 0.04) \times 10^{-2} \text{ mmol g}^{-1}$$

U-NHRh. Se parte del sólido funcionalizado con grupos aminopropilo **U-NH₂(E)-Gr**. Se prepara una suspensión de 0.5 g de este sólido en 20 mL de diclorometano (recién destilado) en un matraz de fondo redondo de dos bocas que se introduce en un baño de hielo. Desde un embudo de adición compensada se añaden gota a gota (durante unos 20 minutos) 0.16 g de cloruro de sulforhodamina B (0.28 mmol) disueltos en 10 mL de diclorometano seco, bajo atmósfera de argón. Tras la adición, se deja agitando durante 24 h a temperatura ambiente, se filtra y se lava con etanol y diclorometano.



El sólido de color fucsia obtenido se mantiene en extracción en un Soxhlet con etanol durante 2 días para asegurar la eliminación de restos de colorante adsorbido en la superficie (hasta que el etanol de lavado deja de salir de color rosa).

2.- ESTUDIOS ESPECTROSCÓPICOS.

2.1.- Instrumentación.

▪ Espectroscopia de Fluorescencia en el Estado Estacionario.

La espectroscopía de fluorescencia en el estado estacionario para las valoraciones de los Capítulos II y III.B) se llevó a cabo en un espectrofotómetro FS900 de Edimburgh, con una lámpara de arco de xenon de 450 W (Xe900) refrigerada por aire, con monocromadores de rejilla. El detector es un tubo fotomultiplicador dispuesto en una geometría de 90° con respecto al haz de excitación, acoplado a un refrigerante que normalmente trabaja a -20 °C para reducir el ruido de la señal. Los espectros de emisión fueron corregidos con el fichero de corrección proporcionado con el software del instrumento, obtenido mediante un procedimiento de calibración mediante el uso de una fuente de luz calibrada. La corrección de los espectros se aplica para corregir la respuesta del detector y la eficiencia espectral del monocromador de emisión.

Los estudios solvatocrómicos para los derivados de fenoxazinona, así como las valoraciones con los distintos iones del Capítulo III.A) se llevaron a cabo con equipos del departamento I.3 del Bundesanstalt für Materialforschung und – prüfung (BAM) en Berlín (Alemania), instrumentos que se describen a continuación.

▪ Espectroscopías de Absorción y Fluorescencia de UV/visible en el Estado Estacionario.

Las espectroscopía en el estado estacionario se llevó a cabo en un espectrofotómetro Bruins Instruments Omega 10 y un espectrofluorímetro Spectronics Instruments 8100. Todas las medidas se realizaron a 298 ± 1 K con disoluciones diluidas, manteniendo la absorbancia máxima en un intervalo de 0.05-0.1 para evitar la reabsorción de la luz. Las medidas de fluorescencia se realizaron con una geometría estándar de 90° y polarizadores a 54.7° para la emisión y a 0°

para la excitación. Todos los espectros fueron corregidos por la respuesta espectral del sistema de detección y por la irradiancia espectral del canal de excitación.¹⁰

Las valoraciones se realizaron en un espectrofotómetro Carl Zeiss Specord M400/M500 y en un espectrofluorímetro Perkin-Elmer LS50B.

▪ Espectroscopía de Fluorescencia Resuelta en el Tiempo

En el caso de la fluorescencia en el estado estacionario las medidas se llevan a cabo con una iluminación y observación constante de la muestra, es decir, la muestra se ilumina con un haz continuo de luz mientras se registra la intensidad de emisión. Mientras que en el caso de la espectroscopía de fluorescencia resuelta en el tiempo la muestra se expone a un pulso de luz que generalmente es más corto que el tiempo de decaimiento de la muestra.

Los tiempos de vida de fluorescencia (τ_f) fueron medidos y analizados por el Dr. Knut Rurack empleando un fluorímetro láser de impulso único con resolución de picosegundos.¹¹ Los perfiles de tiempo de vida de fluorescencia fueron analizado con un PC utilizando un paquete de software Global Unlimited V2.2 (Laboratory for Fluorescence Dynamics, University of Illinois) y FLA 900/Level 2 (Edinburgh Instruments; para el análisis de la distribución de los tiempos de vida de decaimiento simple). La bondad del ajuste para los decaimientos simples se juzgó mediante chi-cuadrado (χ_R^2) y la función de autocorrelación $C(j)$ de los residuos. χ_R^2 siempre se mantuvo por debajo de 1.2.

▪ Espectroscopía de RMN.

Los experimentos de valoración con los distintos aniones por RMN de ^1H se llevaron a cabo en un espectrómetro Bruker 400 MHz Avance, tomando como referencia la señal del DMSO- d_6 a 2.49 Hz frente a TMS como referencia secundaria. Se emplearon concentraciones de ligando 2.5 mM y se fueron añadiendo las alícuotas necesarias de una disolución stock 250 mM de la sal de NBu_4AcO o NEt_4F .

¹⁰ K. Rurack, J. L. Bricks, B. Schulz, M. Maus, G. Reck, U. Resch-Genger, *J. Phys. Chem. A*, **2000**, *104*, 6171.

¹¹ U. Resch, K. Rurack, *Proc. SPIE-Int. Soc. Opt. Eng.*, **1997**, *3105*, 96.

2.2.- Reactivos, Disolventes y Procedimientos de Medida.

Disolventes. Todos los disolventes empleados fueron de grado espectroscópico –y en su defecto, de la mayor pureza disponible– proporcionados por Aldrich o Merk.

- Valoraciones en función del pH en el Capítulo II.

Para la valoración de **AnNIC8** se preparó una disolución 4×10^{-6} M en agua a partir de otra más concentrada (10^{-4} M) preparada en etanol. En el caso de los sólidos, se prepararon suspensiones de 0.1 mg mL^{-1} en agua bidestilada, y se mantuvieron en ultrasonidos durante 30 minutos para dispersar las partículas de manera que las suspensiones fuesen lo más homogéneas y así tener mejor reproducibilidad en las medidas.¹² En todos los casos, la disolución a valorar se ajustó a un pH inicial de aproximadamente 2.2 con HNO_3 y se fue subiendo mediante la adición de unos pocos microlitros de varias disoluciones (1 M, 0.1 M y 0.01 M) de KOH. La fluorescencia se registró excitando a 370 nm.

- Valoraciones con ATP en el Capítulo II.

Las sales disódica y monosódica de ATP y ADP, respectivamente, fueron obtenidas de Aldrich. Todas las disoluciones de ATP y ADP fueron preparadas en agua bidestilada inmediatamente antes de realizar los estudios.

En la preparación de las suspensiones de los distintos materiales siempre se ha empleado una concentración de 0.1 mg de sólido por cada mL de agua bidestilada. Para cada suspensión se ajustó el pH a 3 con disoluciones acuosas de HNO_3 , tras lo que se mantuvieron en ultrasonidos durante un tiempo de 25-30

¹² En todos los apartados de esta tesis las valoraciones por fluorescencia con los sólidos se llevaron a cabo en suspensiones del sólido en el disolvente apropiado, sin que fuese necesaria la agitación magnética, ya que agitando manualmente la cubeta en el momento inmediatamente anterior a las medidas la intensidad de emisión de las suspensiones permanece constante durante el tiempo necesario para registrar el espectro (ver un ejemplo de la variación de la intensidad en función del tiempo en el punto AP.2 del Apéndice).

minutos. Finalmente el pH de las mismas se ajusta a un valor de 2.8. De esta suspensión, se reparten alícuotas de 10 mL en viales para la preparación de los puntos correspondientes del calibrado mediante la adición de los microlitros necesarios de la disolución recién preparada de ATP o ADP. Al cabo de 3 horas se procede a la medición de la intensidad de fluorescencia –a pesar de que en algunos de los sólidos, por ejemplo en **U-NH₂An(2-E)**, la respuesta es prácticamente instantánea, en algunos casos es necesario dejar las suspensiones en contacto con el ATP durante un tiempo, probablemente debido a la difusión lenta de esta molécula de tamaño considerable a través de materiales con una mayor funcionalización; con el objetivo de que las respuestas fuesen comparables se deja un tiempo suficiente y similar en todos los casos antes de medir.

En el caso de **AntNIC8** se prepara una disolución 4×10^{-6} M en agua a pH 2.8, a partir de la disolución 10^{-4} M en etanol (de la misma manera que en los estudios en función del pH) y se añaden las cantidades correspondientes de ATP para registrar la curva de calibrado.

- Estudios Solvato-crómicos y Solvato-cinéticos.

Rendimientos cuánticos de fluorescencia (Φ_f). Para la determinación de los rendimientos cuánticos de fluorescencia se emplearon como estándares Rhodamina 101 en etanol ($\Phi_f = 1.00 \pm 0.02$)¹³ y DCM en metanol ($\Phi_f = 0.43 \pm 0.08$).¹⁴ Todos los rendimientos cuánticos de fluorescencia se expresan como la media de los valores, obtenidos a partir de al menos dos medidas diferentes, calculados a según la ecuación (1),¹⁵ con una desviación de ± 3 % para $\Phi_f > 0.2$, ± 6 % para $0.2 > \Phi_f > 0.02$, ± 10 % para $0.02 > \Phi_f > 5 \times 10^{-3}$, y ± 15 % para $5 \times 10^{-3} > \Phi_f$.

$$\Phi_f^x = \Phi_f^s \frac{A^s I_f^x(\lambda) n_x^2}{A^x I_f^s(\lambda) n_s^2} \quad (6)$$

¹³ D. F. Eaton, *Pure Appl. Chem.*, **1988**, 60, 1107.

¹⁴ J. M. Drake, M. L. Lesiecki, *Chem. Phys. Lett.*, **1985**, 113, 530.

¹⁵ J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 2nd ed., 1999, Kluwer Academic, Plenum Publishers, pág. 52.

Donde los superíndices x y s hacen referencia al compuesto problema y al empleado como estándar, respectivamente, A es la absorbancia a la longitud de onda de excitación, I es la integral de la intensidad de fluorescencia y n es el índice de refracción del disolvente (ver valores en la Tabla A.1 del Apéndice).

Conversión de los espectros a la escala del número de onda (cm^{-1}). Para la conversión de los espectros de emisión de la escala de longitud de onda a la escala lineal de energía en número de onda, además de la conversión de nm a cm^{-1} (ecuación 7), hay que tener en cuenta que la intensidad de la fluorescencia también se ve afectada por esta conversión, ya que, el paso de banda en número de onda no es constante cuando los espectros se recogen con una resolución constante en la longitud de onda, que es lo normal cuando se utilizan monocromadores de rejilla. La conversión a la escala en número de onda requiere que la intensidad de fluorescencia se multiplique por λ^2 , tal y como se indica en la ecuación 8.¹⁵

$$\bar{\nu} = \frac{1}{\lambda} \times 10^7 \quad (\text{cm}^{-1}) \quad (7)$$

$$I(\bar{\nu}) = \lambda^2 I(\lambda) \quad (8)$$

Donde $I(\bar{\nu})$ es la intensidad de fluorescencia en la escala del número de onda e $I(\lambda)$ es la intensidad en la escala de longitud de onda (la que se obtiene directamente del espectrofotómetro).

*Tiempos de vida de fluorescencia (τ_f).*¹⁶ El tiempo de vida del estado excitado se define como el tiempo medio que la molécula pasa en el estado excitado antes de volver al estado fundamental.

$$\tau_f = \frac{1}{k_r + k_{nr}} \quad (\text{generalmente se expresa en nanosegundos}) \quad (9)$$

En la ecuación (9) k_r y k_{nr} representan las constantes de decaimiento del estado excitado radiativa y no radiativa, respectivamente, expresadas en s^{-1} .

La fracción del fluoróforo que decae a través de procesos emisivos, y por tanto, el rendimiento cuántico de fluorescencia, viene dada por la ecuación (10).

¹⁶ Para una discusión más detallada sobre las medidas de fluorescencia resuelta en el tiempo ver J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 2nd ed., 1999, Kluwer Academic, Plenum Publishers, págs. 95-140.

$$\Phi_f = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}} \quad (10)$$

(Por tanto, $\Phi_f \approx 1$ cuando $k_r \gg k_{nr}$)

De las ecuaciones (9) y (10) se deduce

$$k_r = \frac{\Phi_f}{\tau_f} \quad (11) \quad \text{y} \quad k_{nr} = \frac{(1 - \Phi_f)}{\tau_f} \quad (12)$$

Las expresiones (11) y (12) son las que se han empleado en el Capítulo III para el cálculo de k_r y k_{nr} .

La emisión es un proceso aleatorio, lo produce un decaimiento exponencial de la población del estado excitado

$$n(t) = n_0 e^{-t/\tau_f} \quad (13)$$

Donde n_0 representa la población inicial de fluoróforos en el estado excitado y $n(t)$ es el número de moléculas excitadas a un tiempo t .

En un experimento de fluorescencia no observamos el número de moléculas excitadas, si no una intensidad de fluorescencia, que es proporcional a $n(t)$. Esta intensidad se puede expresar como

$$I(t) = I_0 e^{-t/\tau_f} \quad (14)$$

Donde I_0 es la intensidad de fluorescencia a tiempo cero y τ_f se define en (9).

El tiempo de vida de fluorescencia se puede obtener de dos maneras:

- como el tiempo en el que la intensidad decrece a un valor $1/e$ con respecto a su valor inicial

- o como más comúnmente se hace, mediante la determinación de la pendiente de una gráfica en la que se representa $I(t)$ frente a t .

Para un decaimiento exponencial sencillo se considera que el 37 % de las moléculas decaen a un tiempo $t > \tau_f$ y un 63 % lo hacen con anterioridad a $t = \tau_f$.

- Valoraciones con los Distintos Iones en el Capítulo III.

Disoluciones stock de las sales empleadas para las valoraciones. Cationes. En todos los casos se emplearon sales de perclorato de los cationes metálicos, excepto en el caso de la plata, en el que se empleó el triflato. Las sales se obtuvieron de Merk, Acros y Aldrich. Para la preparación de las disoluciones stock, las sales fueron previamente secadas manteniéndolas en una estufa a vacío a las temperaturas descritas en la bibliografía.¹⁷ *Aniones.* Para los estudios en disolventes orgánicos, en la mayoría de los casos se emplearon sales de tetrabutilamonio del anión correspondiente, excepto en el caso de fluoruro, que se utilizó como sal de tetraetilamonio. En los estudios en disolución acuosa de la parte B) del Capítulo III se emplearon en ocasiones las sales de TBA o TEA, y en la mayoría de los casos las sales sódicas o potásicas. Algunos de los aniones orgánicos no son comerciales como sal, pero sí como ácido, por lo que fue necesaria la previa formación de la sal mediante la adición de una disolución acuosa de KOH hasta un pH adecuado. Para la preparación de las disoluciones stock los aniones fueron empleados tal cual, y sólo se requirió su secado en el caso de algunas sales muy higroscópicas como el TEAF. Todos los aniones o los ácidos correspondientes se obtuvieron de Aldrich, excepto en el caso del ácido mono-*n*-dodecilsulfónico (DdOPO₃H₂), que sólo estaba disponible en Lancaster.

Procedimiento para las valoraciones en fase homogénea. A 2500 µL del disolvente correspondiente se añaden la cantidad de µL necesaria de la disolución stock del cromóforo para que dé una absorbancia máxima de 0.05-0.1. Generalmente en el caso de las muestras con un coeficiente de absorción mayor (**FenxDMA**, **FenxA15C5**, **FenxA18C6**, **FenxAT₂15C5** y **FenxNH₂**), las concentraciones finales de cromóforo fueron 2x10⁻⁶ M, mientras que en el caso de muestras menos absorbentes (**FenxAmd**, **FenxUr** y **FenxTur**) la concentración empleada suele ser 4.5x10⁻⁶ M. Manteniendo fija la concentración de ligando, se van añadiendo cantidades crecientes de la sal del ion correspondiente a partir de la disolución stock de la misma.

En el caso de las valoraciones con iones por fluorescencia siempre se excita a la longitud de onda del punto isobéptico para asegurar que la absorción es la misma en todos los puntos del calibrado y que la emisión así leída por tanto es

¹⁷ *Gmelins Handbuch der Anorganischen Chemie. Chlor*, 8th ed., VCH, Berlin, 1927.

comparable. En cualquier caso también se tiene la precaución de dividir la intensidad de fluorescencia por la densidad óptica a la longitud de onda de excitación.

*Procedimiento para las valoraciones en fase heterogénea (con **U-FenxUr** y **U-FenxUr-Me**). Determinación de las constantes de adsorción.* Para la obtención de las curvas de calibrado empleadas para el cálculo de las constantes se pesa 1 mg de sólido directamente en la cubeta y se añaden 2.5 mL de agua bidestilada. Se procede a registrar la emisión de fluorescencia en un intervalo de 500 a 750 nm empleando una $\lambda_{\text{exc}} = 475$ nm –que se corresponde con el punto isobéptico en la valoración del ligando análogo en fase homogénea (**FenxUr**) con acetato en disolventes polares como el DMSO–, la cubeta se tapa, se agita manualmente para homogeneizar la suspensión e inmediatamente después se procede a la medida de la fluorescencia una vez nos aseguramos que no existen burbujas. A esta suspensión se van añadiendo alícuotas sucesivas de una disolución stock 0.1 M de la sal sódica/potásica del anión correspondiente y se va registrando la emisión para cada punto por duplicado o triplicado –para asegurar que las medidas son reproducibles.

*Interferentes para las valoraciones en fase heterogénea (con **U-FenxUr** y **U-FenxUr-Me**). Procedimiento general.* Sobre una porción de **U-FenxUr-Me** (aproximadamente 1 mg) se añaden 100 μL de agua bidestilada en un vial eppendorf, sobre la que el sólido hidrófobo permanece flotando y sin cambiar su apariencia incluso después de agitar. Tras esto se añaden 50 μL de una disolución stock 0.1 M de la sal sódica/potásica del anión correspondiente. En el caso de respuestas positivas se observa el hundimiento inmediato del sólido en el agua y un cambio de color así como un aumento de la fluorescencia.

En el caso de **U-FenxUr**, como el cambio inducido por el anión correspondiente no puede ser apreciado a simple vista –en este caso el sólido ya está hundido en el agua y apreciar un cambio de color sería difícil–, se procedió a la medida de la variación de la intensidad de la emisión de fluorescencia. Se prepara una suspensión inicial del sólido en agua, de 5 mg mL⁻¹, que se mantiene en ultrasonidos durante 20-30 minutos y a partir de ésta se toman alícuotas que se añaden directamente a 2500 μL de agua en la cubeta de medida, de manera que tenemos una cantidad final de 0.2 mg de sólido por mL de agua. La suspensión se

agita manualmente manteniendo tapada la cubeta y se registra la emisión en las mismas condiciones que para la determinación de las constantes de adsorción.

El ajuste de las curvas de calibrado para las distintas valoraciones con los iones, tanto en fase homogénea como heterogénea, se realizó mediante un ajuste no lineal empleando las ecuaciones descritas en los Capítulos II y III con el programa Origin 7.0. Los ajustes obtenidos presentan con coeficientes de correlación de al menos 0.99 (excepto para algunos de los materiales híbridos en los que $r = 0.95$).

- Determinación de la concentración de cromóforo en los materiales **U-FenxDMA(OPr)-Me** y **U-FenxUr-Me** mediante la ley de Lambert-Beer.

Debido a que la carga con grupos orgánicos en los materiales híbridos en el caso de **U-FenxDMA(OPr)** y **U-FenxUr** es demasiado baja para poderla determinar con fiabilidad mediante técnicas de ATG o de análisis elemental, se ha decidido estimar la concentración de los cromóforos en los sólidos mediante el empleo de la ley de Lambert-Beer (ecuación 15). Es decir, al tratarse de materiales transparentes en el intervalo de longitud de onda de interés es posible medir la densidad óptica de las suspensiones y relacionarla con el coeficiente de absorción molar de los correspondientes cromóforos en disolución, **FenxDMA(OPr)** y **FenxUr**, que son conocidos. Pesando una cantidad conocida del material híbrido en un volumen conocido de disolución se puede deducir la concentración (en mol L⁻¹) de especie fotoactiva en la suspensión a partir de los espectros de absorción de estas suspensiones.

$$A = \varepsilon \cdot b \cdot c \quad (15)$$

Donde ε representa el coeficiente de absorción molar del cromóforo en un disolvente determinado y a una longitud de onda determinada (en L mol⁻¹ cm⁻¹), el valor de b en todos los casos es 1 cm, y c es la concentración de la especie que absorbe la luz (en mol L⁻¹).

Por tanto, a partir de la ecuación (15), podemos conocer la concentración del cromóforo según (16), conociendo su coeficiente de absorción molar en el disolvente correspondiente y a la longitud de onda apropiada.

$$c = \frac{A}{\varepsilon \cdot b} \quad (16)$$

El procedimiento para determinar de la cantidad de cromóforo por gramo de sólido se describe a continuación.

Procedimiento para el cromóforo en disolución. Se preparan tres disoluciones stock diferentes con el colorante en DMSO. A partir de éstas se preparan, directamente en la cubeta de medida, disoluciones más diluidas tomando unos pocos microlitros de la disolución stock, que se añaden a 2500 microlitros de DMSO, de manera que la absorbancia máxima de las disoluciones sea siempre 0.1. Se realiza un experimento por duplicado a partir de cada disolución stock y el resultado final se expresa como la media de 6 medidas diferentes.

$$\varepsilon_{539nm}^{FenxDMA(OPr)/DMSO} = (3.43 \pm 0.09) \times 10^4 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$$

$$\varepsilon_{483nm}^{FenxUr/DMSO} = (1.35 \pm 0.12) \times 10^4 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$$

Procedimiento para los sólidos. Se preparan dos muestras para cada material, **U-FenxDMA(OPr)-Me** y **U-FenxUr-Me** pesando 2 mg (muestra **1**) o 4 mg (muestra **2**) del sólido en 1 mL de DMSO. 700 μL (para **1**) ó 500 μL (para **2**) de la suspensión correspondiente se añaden a una cubeta que contiene 2500 μL de DMSO. Las medidas se repitieron varias veces para asegurar que no habían grandes dispersiones en las medidas debido a la decantación del sólido en la cubeta. La absorbancia en la Tabla V.4 es la media resultante de las medidas correspondientes.

Tabla V.4. Resultados obtenidos para la estimación de la concentración de cromóforo en los materiales híbridos.

| sólido | c_{muestra}^a mg mL ⁻¹ | A^b | $c_{\text{cromóforo}}^c$ mmol mL ⁻¹ | $c_{\text{cromóforo}}$ mmol mg ⁻¹ |
|--------------------------|---|---------|---|---|
| U-FenxDMA(OPr)-Me | 0.4333 | 0.07713 | 2.25×10^{-6} | 5.18×10^{-6} |
| | 0.4333 | 0.07569 | 2.20×10^{-6} | 5.09×10^{-6} |
| | 0.5194 | 0.08791 | 2.56×10^{-6} | 4.93×10^{-6} |
| | 0.5194 | 0.08812 | 2.57×10^{-6} | 4.94×10^{-6} |
| U-FenxUr-Me | 0.5235 | 0.08782 | 6.52×10^{-6} | 1.25×10^{-6} |
| | 0.5235 | 0.08795 | 6.53×10^{-6} | 1.25×10^{-6} |
| | 0.4256 | 0.06745 | 5.01×10^{-6} | 1.28×10^{-6} |
| | 0.4256 | 0.06764 | 5.03×10^{-6} | 1.18×10^{-6} |

^a $c_{\text{muestra}} = c_{\text{stock}} * V_{\text{diluc}} / (V_{\text{diluc}} + 2500)$

^b Media de las diferentes réplicas de las medidas a 539 nm para **U-FenxDMA(OPr)-Me** y 483 nm para **U-FenxUr-Me**.

^c La concentración se calcula empleando la ecuación (16) y los correspondientes coeficientes de absorción molar.

A partir de los datos de la tabla anterior, podemos establecer la concentración media de cromóforos en los sólidos como:

U-FenxDMA(OPr)-Me $c = (5.04 \pm 0.12) \times 10^{-3} \text{ mmol g}^{-1}$

U-FenxUr-Me $c = (1.21 \pm 0.04) \times 10^{-2} \text{ mmol g}^{-1}$

- Determinación de fluoruro mediante fluorimetría utilizando el sólido U-NHAn(E-E)-Gr. Procedimiento General.

Se prepara una suspensión del sólido **U-NHAn(E-E)-Gr** añadiendo 1 mg de dicho sólido por cada mL de una disolución tampón de hidrogenofalato potásico/ácido ftálico 0.1 M de pH 2.5 (el pH se ajusta con HCl). De esta suspensión se toman alícuotas de 10 mL (se pipetea manteniendo la suspensión en agitación) añadiendo el volumen correspondiente de una disolución estándar de fluoruro sódico (Aldrich). Éstas se introducen en un tubo de polipropileno con un imán agitador. Todos los tubos se tapan herméticamente y se introducen en un baño de agua termostatizado a 25 °C. Se mantienen en agitación durante el tiempo correspondiente (en general es suficiente con 1 hora). Al cabo de este tiempo, todas las suspensiones se filtran con la ayuda de una jeringuilla a través de un filtro de nylon para eliminar los restos de sólido. Estas disoluciones así obtenidas, se introducen en una cubeta de cuarzo para medir la fluorescencia ($\lambda_{\text{exc}} = 370 \text{ nm}$).

Se representa finalmente el logaritmo de la emisión de fluorescencia obtenida para las distintas muestras a 420 nm vs. el logaritmo de la concentración de fluoruro obteniendo así una respuesta lineal.

- Determinación de fluoruro mediante fluorimetría utilizando el sólido U-NHRh. Procedimiento General.

Se sigue el mismo procedimiento descrito para **U-NHAn(E-E)-Gr**, sólo que en este caso, $\lambda_{\text{exc}} = 566 \text{ nm}$ y se representa el logaritmo de la emisión de fluorescencia obtenida para las distintas muestras a 586 nm vs. el logaritmo de la concentración de fluoruro, obteniendo así una respuesta lineal.

- Determinación del contenido de fluoruro en una pasta de dientes comercial mediante utilizando los sólidos U-NHAn(E-E)-Gr y U-NHRh.

Las muestras de pasta de dientes se prepararan suspendiendo 10.5 g de pasta de dientes de la marca *Colgate* en 60 mL de agua bidestilada. Esta mezcla se mantiene en agitación durante 2 horas en un vaso de polipropileno a 60 °C. Tras

esto se filtra para eliminar los sólidos que permanecen en suspensión y el sólido sobrante se lava con un poco más de agua bidestilada hasta completar el volumen a 100 mL. Esta disolución de 100 mL es a partir de la cual se toman las distintas alícuotas que se añaden a las suspensiones conteniendo el sólido reactivo, bien **U-NHAn(E-E)-Gr**, bien **U-NHRh**. Tras la adición de las alícuotas de la muestra problema (0.5 mL de problema en 5.0 mL de suspensión en la disolución tamponada) se procede de la misma forma que para los puntos del calibrado, es decir, agitación a 25 °C en viales de polipropileno tapados durante un tiempo dado y posterior filtrado del sólido silíceo que permanece sin disolver. La toma de lectura de la absorbancia o intensidad de emisión de las disoluciones filtradas, según el caso, y finalmente interpolación de los valores leídos en la correspondiente curva de calibrado, nos da el contenido de fluoruro en la muestra problema. La concentración teórica de fluoruro en las muestras se calcula a partir del dato dado por el fabricante (contenido en NaF = 0.24 % en peso, que en los 10.5 g pesados representan 6×10^{-4} moles de NaF, y en los 100 mL finales de disolución da una $[F^-] = 6 \times 10^{-3}$ M. La concentración teórica final de F^- en las muestras por tanto es de 5.45×10^{-4} M).

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En esta tesis se ha descrito el desarrollo de varias sondas fluorescentes y materiales híbridos para la detección óptica de diversas especies tanto catiónicas (mercurio(II) y metales alcalinotérreos), aniónicas (ATP, carboxilatos de cadena larga y fluoruro) como neutras (vapores orgánicos).

CAPÍTULO II

i) Se han descrito varios procedimientos para la síntesis de una serie de materiales híbridos tipo **UVM-7** incorporando el ligando fluorescente N-alkil-N-(9-antrilmetil)amina, mediante cohidrólisis y *grafting*.

ii) Se han llevado a cabo experimentos de fluorescencia con suspensiones de los materiales en disolución acuosa poniendo de manifiesto que es posible el reconocimiento de un anión de interés biológico como el ATP.

iii) La inmovilización de los ligandos en los soportes sólidos produce una mejora evidente de la interacción con el anión ATP con respecto al ligando análogo en disolución. Por ejemplo, $\log K(\text{U-NHAn(2-E)-Co}) = 4.78$ y $\log K(\text{AnNIC8}) = 2.92$. Mejora atribuida a un aumento de las interacciones electrostáticas en el sólido, relacionada con un aumento de la concentración efectiva de los ligandos en la superficie. Esta última observación se confirma en parte por la menor interacción con el anión menos cargado ADP ($\log K = 3.3$ para ADP en el caso del sólido **U-NHAn(2-E)-Co**).

iv) El control de la concentración superficial de los sensores fluorescentes es importante. Una elevada carga de los materiales con las mismas puede causar una pérdida de calidad de la señal:

- Se observa la aparición de excímeros inducida por la adición de ATP en sólidos con elevado contenido en grupos aminometilantraceno.
- Hay una disminución de la constante de adsorción al aumentar la concentración de los ligandos en el sólido. Por ejemplo, $\log K(\text{U-AnTES(0.3)}) = 4.34$ y $\log K(\text{U-AnTES(4)}) = 3.32$.

CAPÍTULO III

i) Se ha descrito la síntesis de varias sondas cromo-/fluorogénicas basadas en el núcleo de 7-amino-3H-fenoxazin-3-ona. Estos colorantes poseen propiedades óptimas para el desarrollo de sensores moleculares ópticos como elevados Φ_f , ϵ , λ_{abs} y λ_{em} .

ii) Estudios solvato-crómicos y solvato-cinéticos en una serie de disolventes de varios sistemas modelo ha permitido una mejor comprensión de los mecanismos de respuesta frente a las especies a determinar:

- El aumento polaridad del disolvente (en disolventes apróticos) y el aumento del carácter electrón dador del sustituyente en posición 7 de la fenoxazinona inducen un aumento de λ_{abs} , λ_{em} y Φ_f . Estos cambios espectroscópicos favorables han sido atribuidos a un aumento del carácter polimetínico del colorante.

- Los derivados con sustituyentes de carácter electrón dador fuerte presentan un marcado solvato-cromismo, atribuido a la CT parcial que tiene lugar tras la excitación electrónica desde el grupo dador de la molécula (NR_2) al aceptor ($C=O$).

- Aparte de la formación de enlaces de hidrógeno en disolventes próticos (lo que conduce a una desactivación parcial de la fluorescencia), el aumento/disminución de la fluorescencia en un disolvente dado parece depender únicamente de la fuerza electrón dadora/aceptora de los sustituyentes (han sido descartadas vías alternativas de desactivación no radiativa desde el estado excitado como TICT). Esto posibilita una mejor predicción de los cambios en la fluorescencia inducidos por la coordinación de un ion a través de D o A.

iii) La elevada densidad electrónica en el grupo carbonilo en compuestos con un D de elevado carácter electrón dador, favorece coordinación especies electrófilas en esta posición. Estudios con **FenxDMA** con cationes metálicos en acetonitrilo han revelado que la banda de absorción de **FenxDMA** se desplaza hacia el rojo en todos los casos en los que hay coordinación. Mientras que la introducción de un receptor a través de D permite detectar mediante cambios espectroscópicos selectivos la presencia de un determinado tipo de cationes:

- Se ha descrito un sensor que cambia de color selectivamente para Hg^{2+} en agua (**FenxAT₂15C5**); con un $\log K = 6.08$.
- La introducción del ligando macrocíclico **A18C6** ha permitido diferenciar Mg^{2+} frente a Ba^{2+} mediante distintos cambios de color inducidos por la diferente posición de coordinación del catión en el cromóforo.
- En el caso de $D = \text{A15C5}$ (ligando introducido para la coordinación de Ca^{2+}), la interacción con el receptor no es suficientemente fuerte y se sigue observando la coordinación por el C=O.

iv) La introducción de un grupo electrón dador débil en la posición 7 capaz de coordinar aniones (compuesto **FenxUr**) ha permitido la detección de acetato en DMSO con un $\log K = 2.12$ y un aumento de 5 veces de la fluorescencia por el aumento de la densidad electrónica en esta posición tras la coordinación del anión.

v) Estudios mediante espectroscopía de UV/Vis y de RMN de **FenxUr**, **FenxAmd** y **FenxTur** han confirmado que en el caso del anión fluoruro en lugar de la coordinación tiene lugar la desprotonación del sensor en DMSO.

vi) La inmovilización de **FenxUr** en **UVM-7** y la creación de un microambiente hidrófobo particular en el material ha posibilitado la detección de sales de ácidos grasos de cadena larga en disolución acuosa de forma selectiva:

- Es posible distinguir carboxilatos de más de 10 átomos de carbono, (respuesta positiva), frente a carboxilatos de cadena más corta (ausencia de respuesta).
- El sistema responde por la combinación de las interacciones por enlace de hidrógeno con el cromóforo y las interacciones adicionales no covalentes (por fuerzas de van der Waals) introducidas en el sólido por la funcionalización con grupos metilo. Por ejemplo, al igual que el resto de grupos urea sencillos, **FenxUr**, no es capaz de detectar aniones en disolución acuosa, mientras que para **U-FenxUr-Me** / DdO^- $\log K = 2.52$ en agua y va aumentando con la longitud de la cadena alifática, 3.32 para TdO^- 4.32 para $c\text{-OdO}^-$ y 4.32 para $c,c\text{-OdO}^-$.

viii) El solvatocromismo de las fenoxazinonas se ha aprovechado para el desarrollo de sensores ópticos de vapores. Se ha descrito una ruta de anclaje de 7-(N,N-dimetilamino)-3H-fenoxazin-3-ona) en **UVM-7** y se ha observado que es posible la detección de vapores orgánicos de forma rápida y reversible.

CAPÍTULO IV

El anclaje covalente de moléculas indicadoras en **UVM-7** ha permitido determinar fluoruro mediante una reacción específica de este anión con el soporte silíceo a pH ácido. La liberación de la molécula indicadora como consecuencia de la disolución de la sílice provoca la aparición de color/fluorescencia en la disolución, cuya intensidad es proporcional a la cantidad de fluoruro presente. La elevada superficie y el sistema de poros bimodal de **UVM-7** aseguran una respuesta relativamente rápida, condiciones de reacción suaves con bajas concentraciones de F^- (límite de detección *ca.* 0.1 ppm).

En resumen, el presente diseño permite una fácil adaptación a varios analitos y alberga un potencial enorme para el desarrollo futuro de dispositivos para sensores ópticos.

El establecimiento de las relaciones entre las propiedades espectroscópicas y la estructura de los cromóforos, junto con la selección de receptores apropiados, puede representar una aproximación sencilla y rápida para la obtención de estructuras funcionales cromo-/fluorogénicas.

Además, la incorporación de las sondas en los materiales silíceos de elevada superficie con un sistema ordenado de canales nanométricos ha producido una mejora evidente de la aplicabilidad de los sensores. El elevado control sintético que se puede alcanzar para la obtención de estos materiales híbridos (mediante procedimientos de *grafting* o cohidrólisis) y la posibilidad de introducir funcionalidades orgánicas adicionales (a parte de la sonda molecular) que permiten regular las propiedades superficiales de los materiales, abre un gran abanico de posibilidades para el diseño futuro de dispositivos sensores.

APÉNDICE.

AP.1.- PROCESOS DE FISISORCIÓN Y QUIMISORCIÓN.

En este apartado se introducen algunas de las nociones básicas de los procesos de fisisorción y de quimisorción en superficies y su relación con las isothermas BET empleadas para el cálculo de la superficie específica en los sólidos mesoporosos y con la ecuación de Langmuir empleada para la deducción de las ecuaciones (2) y (1) de los Capítulos II y III.B), respectivamente.

AP.1.1.- Fisisorción.¹ Los procesos de fisisorción en superficies se deben a las fuerzas de tipo físico. Son fuerzas débiles y en consecuencia, el calor de fisisorción es pequeño.

En fisisorción se obtienen experimentalmente isothermas que presentan una forma diferente según la naturaleza del sistema que se esté estudiando. La mayoría pertenecen a alguno de los cinco tipos de la clasificación de Brunauer, Deming, Deming y Teller (BDDT), ver Fig. AP.1. Los cinco tipos se pueden explicar satisfactoriamente a partir de la teoría de Brunauer, Emmett y Teller (BET)² que constituye el modelo básico de la fisisorción.

Modelo BET. Las hipótesis principales de este modelo son las siguientes:

- 1) La superficie del adsorbente se supone uniforme y no porosa. Aunque una superficie real suele presentar irregularidades y defectos que hacen que las moléculas se adsorban preferentemente en determinados centros denominados *centros activos*, en fisisorción la magnitud de las interacciones es suficientemente pequeña para que la diferencia de actividad entre unos centros y otros pueda despreciarse y suponerse que las moléculas no tengan preferencia apreciable por adsorberse en ningún punto determinado.
- 2) Las moléculas de gas se adsorben sobre la superficie en capas sucesivas, completas o no, en equilibrio dinámico entre sí y con las moléculas del gas (es un modelo multicapa, que se puede considerar como la extensión del mecanismo de adsorción en monocapa de Langmuir)

¹ M. Díaz, A. Muntaner, *Química Física*, Vol. II, 2da ed., 1988, Ed. Alambra, pág. 1036.

² S. Brunauer, P. H. Emmet, E. Teller, *J. Am. Chem. Soc.*, 1938, 60, 309.

Esto lleva a la deducción de la formula que ya se ha explicado en el Capítulo IV (ecuación (1)).

$$\frac{P}{V(P_0 - P)} = \frac{1}{V_m K} + \frac{K - 1}{V_m K} \left(\frac{P}{P_0} \right) \quad (1) \text{ C. IV.}$$

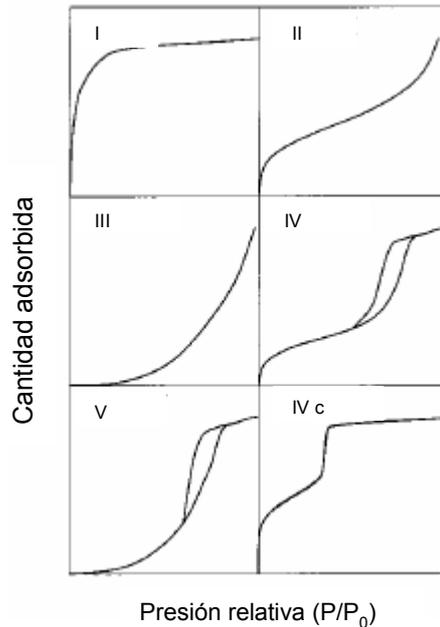


Fig. AP.1 Clasificación de las isothermas de adsorción de gases.³ En el eje x se representa la presión relativa del fluido y el eje y hace referencia al gas adsorbido. El tipo (I) corresponde a la adsorción en monocapa (válida para sólidos microporosos); los tipos (II) y (III) son para adsorción en multicapa (material macroporoso); y finalmente (IV) y (V) representan la adsorción en multicapa con condensación capilar (sólidos mesoporoso).

Sólidos mesoporosos. La adsorción en sólidos mesoporosos procede a través de adsorción en multicapa seguida de condensación capilar. Las isothermas presentan dos características principales: *saturación* e *histéresis*. Inicialmente, el proceso de adsorción es similar al proceso en sólidos macroporoso, pero a elevadas presiones la cantidad de gas adsorbido aumenta muy lentamente con la presión debido a la condensación capilar en los mesoporos (saturación). La histéresis consiste en que la curva que se obtiene por adsorción difiere de la obtenida (en las mismas condiciones) de la de desorción. El ciclo de histéresis que se observa en los sólidos mesoporosos es debido a que el proceso de desorción no es un proceso de

³ M. Kruk, M. Jaroniec, *Chem. Mater.*, **2001**, *13*, 3169.

equilibrio (la condensación capilar y la evaporación capilar frecuentemente no tienen lugar a la misma presión). Aunque también se ha confirmado que la condensación- evaporación capilar en los mesoporos puede ser reversible (isoterma tipo IVc).³

La región a bajas presiones es idéntica a la de la isoterma de BET, ya que en esta zona la cantidad de moléculas adsorbidas es pequeña y los poros se comportan igual que la superficie externa. Si seguimos adsorbiendo gas llega un momento en que los poros se llenan dando lugar a la condensación capilar del gas, que es cuando la isoterma empieza a desviarse de la de BET. Cuando llegamos a una rama horizontal de la isoterma, se han llenado todos los poros, y se puede calcular el volumen total de los mismos.

AP.1.2.- Quimisorción. Las características principales de la quimisorción incluyen la formación de una monocapa. El modelo más simple y más antiguo fue formulado por Langmuir en 1918. Este modelo supone que las moléculas se adsorben sobre la superficie hasta formar una monocapa completa (en cuyo momento cesa la adsorción) y que la superficie es homogénea. El modelo resulta ser un caso particular de BET si se limita este último a una sola capa.

Al haber una sola capa, podemos definir un solo θ como la fracción de centros recubiertos

$$\theta = \frac{x}{x_m} = \frac{Kp}{1 + Kp} \quad (1)$$

Si representamos x frente a p , se obtiene una curva ascendente que tiende a una saturación (asíntota horizontal), que es precisamente la capacidad de la monocapa x_m , ya que la ecuación anterior tiende a 1 a p elevadas.

La deducción de las ecuaciones (2) y (1) de los Capítulos II y III.B), respectivamente, se basan en el modelo desarrollado para la isoterma de Langmuir. Así por ejemplo, en el caso de la ecuación (1) del Capítulo III.B) empleada para describir el proceso de adsorción de los distintos carboxilatos sobre el material híbrido **U-FenxUr-Me** se han tenido en cuenta las siguientes consideraciones:

$$I = I_L \frac{Kc}{1 + Kc} \quad ; \quad c = \frac{-\left\{\frac{1}{K} + \frac{n_M}{V} - c_0\right\} + \sqrt{\left(\frac{1}{K} + \frac{n_M}{V} - c_0\right)^2 + \frac{4c_0}{K}}}{2} \quad (1) \text{ C. III.B}$$

- (i) el adsorbato forma una monocapa
- (ii) en cada centro de adsorción hay cero o una única molécula adsorbida
- (iii) todos los centros poseen la misma energía de adsorción
- (iv) no hay interacción entre los centros.

En la isoterma de Langmuir, el grado de recubrimiento θ es función de ambos, la temperatura y la concentración de adsorbato. Si la temperatura se mantiene constante entonces el recubrimiento es función únicamente de la concentración:

$$\theta = \frac{n_A}{n_M} = \frac{I}{I_L} = \frac{Kc}{1 + Kc} \quad (2)$$

En la ecuación (2) θ es la fracción de carboxilato adsorbido (n_A , en moles) vs. la cantidad máxima de anión (n_M , en moles) que puede ser adsorbida en la monocapa, siendo equivalente a la relación de intensidades (integral de fluorescencia) entre la fluorescencia medida y la señal que se obtendría tras la saturación con el analito (valor límite). Alternativamente, θ puede ser expresada como la constante de adsorción de Langmuir K y la concentración c (en mol L⁻¹) del anión en el equilibrio. Por tanto, K tiene en cuenta la interacción entre el carboxilato y los centros de reconocimiento anclados en el sólido.

A partir de (2) obtenemos:

$$n_A = n_M \theta = \frac{n_M Kc}{1 + Kc} \quad (3)$$

teniendo en cuenta que el número de moles añadidos a la suspensión que contiene el sólido adsorbente es igual a la suma del número de moles adsorbidos en la monocapa (n_A) más los moles que quedan en disolución sin adsorber (n)

$$n_0 = n + n_A \quad (4)$$

obtenemos

$$n_0 = n + \frac{n_M Kc}{1 + Kc} \quad (5)$$

dividiendo por el volumen de la suspensión (V en L) tenemos

$$c_0 = c + \frac{\frac{n_M}{V} Kc}{1 + Kc} \quad (6)$$

y finalmente

$$Kc^2 + (1 + K \frac{n_M}{V} - Kc_0)c - c_0 = 0 \quad (7)$$

lo que nos lleva a

$$c = \frac{-\left\{\frac{1}{K} + \frac{n_M}{V} - c_0\right\} + \sqrt{\left(\frac{1}{K} + \frac{n_M}{V} - c_0\right)^2 + \frac{4c_0}{K}}}{2} \quad (8)$$

de la ecuación (2) tenemos

$$I = I_L \frac{Kc}{1 + Kc} \quad (9)$$

Mediante sustitución de la ecuación (8) en (9), llegamos a la ecuación final empleada para el ajuste de las curvas de valoración en el Capítulo III.B).

Para la deducción de la ecuación (2) del Capítulo II

$$I = I_L + (I_{LA} - I_L) \frac{Kc}{1 + Kc}; \quad c = \frac{-\left\{\frac{1}{K} + \frac{n_M}{V} - c_0\right\} + \sqrt{\left(\frac{1}{K} + \frac{n_M}{V} - c_0\right)^2 + \frac{4c_0}{K}}}{2}$$

(2) C. II

se ha seguido básicamente el mismo procedimiento, solo que en este caso, la interacción con el anión resulta en una disminución de la fluorescencia, de manera que, si para el caso anterior (ecuación (1) C. III) definíamos la fracción de centros cubiertos según

- recubrimiento total ($\theta = 1$) ---> La intensidad máxima de fluorescencia es la de saturación.

- cuando no hay centros cubiertos (situación inicial, $\theta = 0$) ---> La intensidad de fluorescencia es prácticamente cero.

En el caso de las valoraciones con los materiales híbridos conteniendo aminometilantraceno para la detección de ATP, la intensidad máxima de fluorescencia no se corresponde con la ocupación máxima de centros ($\theta = 1$), si no con $\theta = 0$. Lo que se mide con la disminución de la intensidad es $1 - \theta$, es decir, a medida que se cubren centros activos ($= \theta$ aumenta), la intensidad leída disminuye. La ecuación correcta en este caso es la siguiente:

$$1 - \theta = \frac{I_{rel}}{I_{m\acute{a}x}} = \frac{I - I_{LA}}{I_L - I_{LA}} \quad (10)$$

Donde I es la intensidad de fluorescencia leída, e I_L e I_{LA} son las intensidades de fluorescencia del ligando libre y en presencia de un exceso de anión, respectivamente.

De (10) tenemos que

$$\theta = 1 - \frac{I - I_{LA}}{I_L - I_{LA}} = \frac{Kc}{1 + Kc} \quad (11)$$

por lo que

$$\frac{I_L - I}{I_L - I_{LA}} = \frac{Kc}{1 + Kc} \quad (12)$$

y finalmente

$$I = I_L + (I_{LA} - I_L) \frac{Kc}{1 + Kc} \quad \text{que es la ecuación empleada en (2) C. II}$$

AP.2.- APLICABILIDAD DE LAS SUSPENSIONES DE LA MATRIZ DE SÍLICE PARA LAS MEDIDAS DE FLUORESCENCIA.

Propiedades Ópticas. La matriz de sílice empleada para el anclaje de los distintos cromóforos no interfiere en la medida de la emisión de fluorescencia tal y como se puede apreciar en la Fig. AP.2, donde se muestran los espectros de emisión y excitación para una UVM-7 blanca suspendida en DMSO, donde no se observa dispersión de la luz que pueda interferir en la medida.

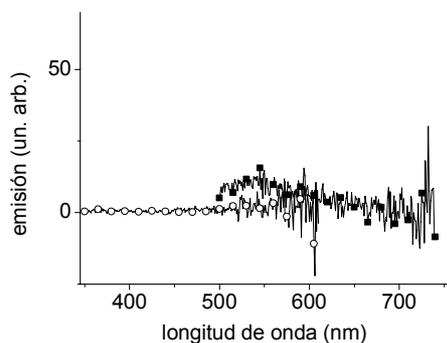


Fig. AP.2. Espectros de emisión (■, $\lambda_{exc} = 475$ nm) y excitación (○, $\lambda_{em} = 620$ nm) para una suspensión de una UVM-7 calcinada en DMSO.

Propiedades de las Suspensiones. En la siguiente figura (AP.3) se muestra además cómo la emisión de una suspensión permanece estable durante al menos 5 minutos sin necesidad de agitación magnética –también se probaron a realizar medidas con agitación magnética, pero la dispersión de los puntos era mayor. Esto confirma que todas las medidas realizadas con las distintas suspensiones son suficientemente reproducibles durante el tiempo que se tarda en registrar un espectro de emisión (2-4 minutos).

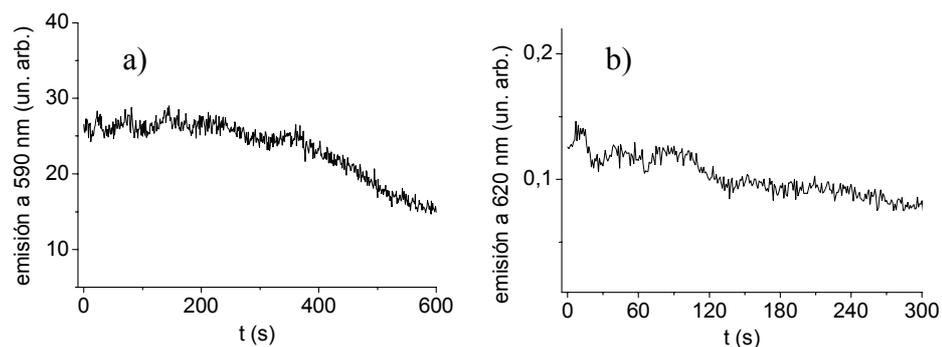


Figura AP.3 Variación de la intensidad de fluorescencia a una longitud de onda fija (620 nm) en función del tiempo para una suspensión de a) **U-FenxUr-Me** y b) **U-FenxUr** en DMSO sin agitación magnética ($\lambda_{exc} = 475$ nm).

AP.3.- VALORES DE INDICE DE REFRACCIÓN Y ESCALA $E_T(30)$ PARA LOS DISOLVENTES EMPLEADOS.

Tabla AP.1. Valores del índice de refracción⁴ y de la escala $E_T(30)$ ⁵ para los distintos disolventes empleados en el Capítulo III.

| Disolvente | n_D^{20} | $E_T(30)$ (kcal mol ⁻¹) | Disolvente | n_D^{20} | $E_T(30)$ (kcal mol ⁻¹) |
|------------------|------------|--|---------------------------------|------------|--|
| H ₂ O | 1.333 | 63.1 | Acetona | 1.3587 | 42.2 |
| Glicerol | 1.469 | — | Ciclohexanona | 1.4510 | 39.8 |
| Etilenglicol | 1.4318 | 53.8 | CH ₂ Cl ₂ | 1.4242 | 40.7 |
| MeOH | 1.3284 | 55.4 | THF | 1.4072 | 37.4 |
| EtOH | 1.3614 | 51.9 | AcOEt | 1.3724 | 38.1 |
| DMSO | 1.4793 | 45.1 | Et ₂ O | 1.3524 | 34.5 |
| MeCN | 1.3441 | 45.6 | Bu ₂ O | 1.3992 | 33 |
| PrCN | 1.3658 | 43.7 | <i>n</i> -hexano | 1.3749 | 31 |

⁴ *CRC Handbook of Chemistry and Physics*; Ed. D. R. Lide; CRC Press: Boca Raton, 1993, 73rd edn.

⁵ C. Reichardt, *Chem. Rev.*, **1994**, *94*, 2358.