



CARACTERIZACIÓN DE 6-AMINO-1,3-BENZOTIAZOL-2-CARBONITRILO PARA SU USO COMO SONDA FLUORESCENTE

Trabajo de fin de Grado

Ana Arias Rodríguez

2019

Departamento de Química Física - GRADO EN QUÍMICA

Universidade de Santiago de Compostela

M^a Flor Rodríguez Prieto, Catedrática de Química Física en la Universidad de Santiago de Compostela, y **M^a Carmen Ríos Rodríguez**, Profesora Titular de Química Física en la Universidad de Santiago de Compostela, como tutoras docentes del Trabajo de Fin de Grado en Química de **Ana Arias Rodríguez**,

AUTORIZAN la presentación del trabajo titulado “Caracterización de 6-amino-1,3-benzotiazol-2-carbonitrilo para su uso como sonda fluorescente” como conclusión de la labor realizada por esta alumna en el Centro Singular de Investigación en Química Biológica e Materiais Moleculares de la Universidad de Santiago de Compostela durante el curso 2018-2019.

Para que así conste, firmamos la presente en Santiago de Compostela, a 2 de Julio de 2019.

M^a Flor Rodríguez Prieto

M^a Carmen Ríos Rodríguez

Índice de contenidos

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	3
2.1. Solvatación e interacción con el disolvente.....	3
2.2. Transferencia intramolecular de carga (ICT).....	6
2.3. Sondas fluorescentes.....	6
3. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO	8
3.1. Objetivos	8
3.2. Plan de trabajo	8
4. PROCEDIMIENTO Y TÉCNICAS EXPERIMENTALES	9
4.1. Preparación de disoluciones	9
4.2. Absorción UV-Vis	10
4.3. Fluorescencia en estado estacionario	11
4.4. Medida de tiempos de vida de fluorescencia	12
4.4.1. <i>TCSPC (Time Correlated Single photon counting)</i>	12
4.5. Tratamiento de datos	13
4.5.1. <i>Corrección de espectros de fluorescencia</i>	13
4.5.2. <i>Medida de tiempos de vida de fluorescencia</i>	13
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	14
5.1. Absorción UV-Visible	14
5.1.1. <i>Efecto del disolvente</i>	14
5.1.2. <i>Efecto de la acidez en agua</i>	15
5.2. Medidas de fluorescencia	19
5.2.1. <i>Efecto de la acidez en agua</i>	19
5.2.2. <i>Otros disolventes</i>	28
5.3. Tiempos de vida y fluorescencia resuelta en el tiempo	32
5.3.1. <i>Medida de tiempos de vida de fluorescencia</i>	32
5.3.2. <i>Espectros resueltos en el tiempo (TRES)</i>	34

5.3.3. <i>Ajuste a un modelo de tres especies</i>	39
6. CONCLUSIONES	44
7. BIBLIOGRAFÍA	48
ANEXOS	
I. <i>Constante de disociación ácida</i>	
II. <i>Término de quenching estático</i>	
III. <i>Residuos ponderados para fluorescencia</i>	
IV. <i>Amplitud de las funciones exponenciales</i>	
V. <i>Residuos ponderados para el modelo de especies</i>	

1. RESUMEN

El gran interés en la cuantificación de parámetros como la acidez o la polaridad en microentornos reactivos químicos y biológicos ha impulsado de manera notable el desarrollo de técnicas de análisis que emplean sondas fluorescentes, lo que aprovecha la elevada sensibilidad que presenta la fluorescencia de este tipo de moléculas al medio en el que se encuentran. El objetivo de este trabajo ha sido, en consecuencia, la caracterización del comportamiento fisicoquímico del 6-amino-1,3-benzotiazol-2-carbonitrilo, por medio de espectroscopía de absorción UV-Vis y de fluorescencia (en estado estacionario y resuelta en el tiempo), con el fin de analizar la influencia del entorno sobre la fluorescencia de esta molécula. Los estudios de su comportamiento en medio acuoso ácido y neutro, así como en distintos disolventes y condiciones de pH, evidencian su elevada sensibilidad tanto a la acidez como a la polaridad del medio. El seguimiento de la forma neutra (la única emisora) y la aparición de especies protonadas en regiones distintas de la molécula en estado fundamental y excitado ponen de manifiesto la existencia de procesos de transferencia intramolecular de carga fotoinducida (ICT) y de *quenching*. Finalmente, la obtención de un modelo que justifica la evolución temporal del decaimiento de la señal de fluorescencia mediante un proceso de solvatación en el que intervienen tres especies corrobora la alta sensibilidad de la fluorescencia de esta molécula a las condiciones del medio, y respalda su validez como sonda fluorescente.

O grande interese en cuantificar parámetros como a acidez ou a polaridade en microcontornas reactivas químicas e biolóxicas leva impulsado de maneira notable nos últimos tempos o desenvolvemento de técnicas de análise que empregan sondas fluorescentes, o que aproveita a elevada sensibilidade que presenta a fluorescencia deste tipo de moléculas ó medio no que se atopan. O obxectivo deste traballo foi a caracterización fisicoquímica do 6-amino-1,3-benzotiazol-2-carbonitrilo, por medio de técnicas de espectroscopía de absorción UV-Vis e de fluorescencia (en estado estacionario e resolta no tempo), coa fin de analizar a influencia da contorna sobre esta molécula. Os estudos do seu comportamento en medio acuoso ácido e neutro así como en distintos

disolventes e condicións de pH evidencian a súa elevada sensibilidade tanto á acidez como á polaridade do medio. Para este fin, o seguimento da forma neutra (a única emisora) e a aparición de especies protonadas en distintas rexións da molécula poñen de manifesto a existencia de procesos de transferencia intramolecular de carga fotoinducida e de *quenching*. Finalmente, a obtención dun modelo que xustifica a evolución temporal do decaemento do sinal de fluorescencia por medio dun proceso de solvatación no que interveñen tres especies ratifica a elevada sensibilidade da fluorescencia da molécula ás condicións do medio, e respalda a súa validez como sonda fluorescente.

The relevance of quantifying parameters such as acidity or polarity in chemically and biologically reactive microenvironments has caused a significant development of analytical techniques focused on the use of fluorescent probes, which takes advantage of the high sensitivity of fluorescence this kind of molecules have towards their surroundings. The aim of this work has been, consequently, to study in detail the behaviour of 6-amino-1,3-benzothiazole-2-carbonitrile (*ABTC*), by means of UV-Vis absorption spectroscopy and fluorescence spectroscopy (steady-state and time-resolved), as a contribution to the research being done on the influence caused by the environment it experiences. The different behaviour *ABTC* has shown in neutral and acidic aqueous solution in addition to its varied reactivity in several solvents and pH conditions has stated its significant sensitivity towards media's acidity and polarity. Evolution of the neutral form has been followed over time as well as the protonation processes that occur, taking place in different regions of the molecule in ground and excited state. This study has proved that *ABTC* experiences both intramolecular charge transfer (ICT) and quenching processes. The final assignment has been to develop a model that justifies the observed fluorescence decay, related to the solvation process the molecule undergoes, performed by three different species that evolve throughout time. This work has finally validated 6-amino-1,3-benzothiazole-2-carbonitrile's aptitude to be used as a fluorescent probe.

2. INTRODUCCIÓN

La elevada especificidad y sensibilidad de la fluorescencia como método de medida la configura en la actualidad como una valiosísima herramienta para posibilitar el estudio de los procesos que tienen lugar en medios complejos. La cuantificación de parámetros como la acidez o la polaridad en microentornos reactivos químicos y biológicos, difícilmente medibles por otras técnicas disponibles en la actualidad, se ve facilitada por el uso de moléculas fluorescentes cuidadosamente seleccionadas, actuando como sondas³. Esto presenta ventajas significativas en comparación con otras técnicas, entre las que se encuentran un tiempo rápido de respuesta, una relación señal-ruido elevada, poca invasividad de la muestra a analizar y excelente precisión en la medida^{1,2}.

Previamente a su uso como sondas, los fluoróforos utilizados son sometidos a profundos estudios de caracterización que permiten desentrañar las dinámicas que rigen su comportamiento. La complejidad de los efectos que disolvente y entorno ejercen en la fluorescencia de la sonda se debe a la gran cantidad de factores de los que dependen; entre ellos se pueden mencionar la polaridad, la viscosidad y grado de relajación del disolvente o la existencia de procesos en estado fundamental y excitado que el fluoróforo puede experimentar, como la transferencia intramolecular de carga. El análisis detallado de esta amplia variedad de fenómenos constituye una vía decisiva para posibilitar el análisis ulterior de las condiciones de una gran cantidad de medios reactivos.

2.1 Solvatación e interacción con el disolvente

Los estudios preliminares en distintos disolventes se fundamentan en la obtención de los espectros de excitación y emisión de la molécula objeto de estudio, así como el conocimiento de su rendimiento cuántico. La constante dieléctrica (ϵ) se configura como una de las escalas que cuantifican la polaridad de un disolvente, siendo esta una propiedad que depende tanto de sus movimientos electrónicos como moleculares⁴. La relevancia de este parámetro reside en el hecho de que la polaridad del entorno es una de las causas más estudiadas del desplazamiento Stokes apreciable en la emisión⁵, lo que constituye una característica fácilmente identificable de los espectros de fluorescencia^{1,2}. La

cuantificación del desplazamiento espectral causado por el disolvente (conocido como *desplazamiento solvatoacrómico*) tiene su antecedente en los estudios de Lippert (1955)⁶ y Mataga (1956)⁷, que proponen un modelo en el que el fluoróforo es considerado un dipolo situado en un medio de constante dieléctrica continua, sin incluir otras interacciones que afecten a su emisión (enlaces de H, interacciones ion-dipolo o fuerzas de Van der Waals). Con este análisis se postula a los disolventes apróticos como aceptores finales de la energía vibracional que pierde la molécula. En la práctica, sin embargo, esta aproximación se hace insuficiente, debido a la existencia de interacciones específicas entre la sonda y el disolvente.

La emisión de los fluoróforos ocurre habitualmente a longitudes de onda mayores que la absorción. La molécula es excitada e, inmediatamente después, este excedente de energía vibracional se disipa por medio de una amplia variedad de procesos dinámicos que siguen a la absorción de luz, entre ellos la transferencia de energía al disolvente. En esta circunstancia concreta, el desplazamiento anómalo del espectro de emisión del fluoróforo a longitudes de onda mayores de lo habitual se debe a la estabilización de su estado excitado al alcanzar un estado de menor energía causado por los efectos del disolvente, más apreciables cuanto más polar sea (**Figura 2.1**). El fenómeno subyacente a este hecho radica en que el momento dipolar de un fluoróforo aumenta generalmente tras la excitación electrónica, por lo que las moléculas de disolvente han de reorientarse en torno al nuevo dipolo del fluoróforo hasta alcanzar un estado de energía libre mínima, menor cuanto mayor sea su polaridad¹⁰. En medios fluidos, esta relajación del disolvente es más rápida que la desactivación del fluoróforo excitado ($\sim 10^{-9}$ s), por lo que las moléculas de disolvente se pueden reorientar a sus posiciones de equilibrio antes de que la emisión del fluoróforo tenga lugar^{8,9}.

En última instancia, también la viscosidad del disolvente influye en su proceso de relajación. Cuando el medio es muy viscoso, la emisión del fluoróforo no se verá influida por la interacción con el disolvente, porque las moléculas de disolvente no tienen tiempo de reorientarse antes de la emisión del fluoróforo, de manera que el desplazamiento espectral no estará causado por este proceso. Cuando el tiempo de relajación del disolvente y el tiempo de vida del estado excitado son del mismo orden de magnitud, la forma y posición del máximo del espectro no se podrán relacionar directamente con la

polaridad del disolvente. Por el contrario, cuando el tiempo de relajación del disolvente es mucho menor que el tiempo de vida del estado excitado, el espectro de emisión se corresponderá con las moléculas de fluoróforo dispuestas en equilibrio con la estructura de solvatación, con lo que el decaimiento de la fluorescencia refleja de manera precisa la despoblación del estado excitado¹. De este modo, la gran variedad de interacciones que involucran a soluto y disolvente configuran la dinámica de los procesos de solvatación.

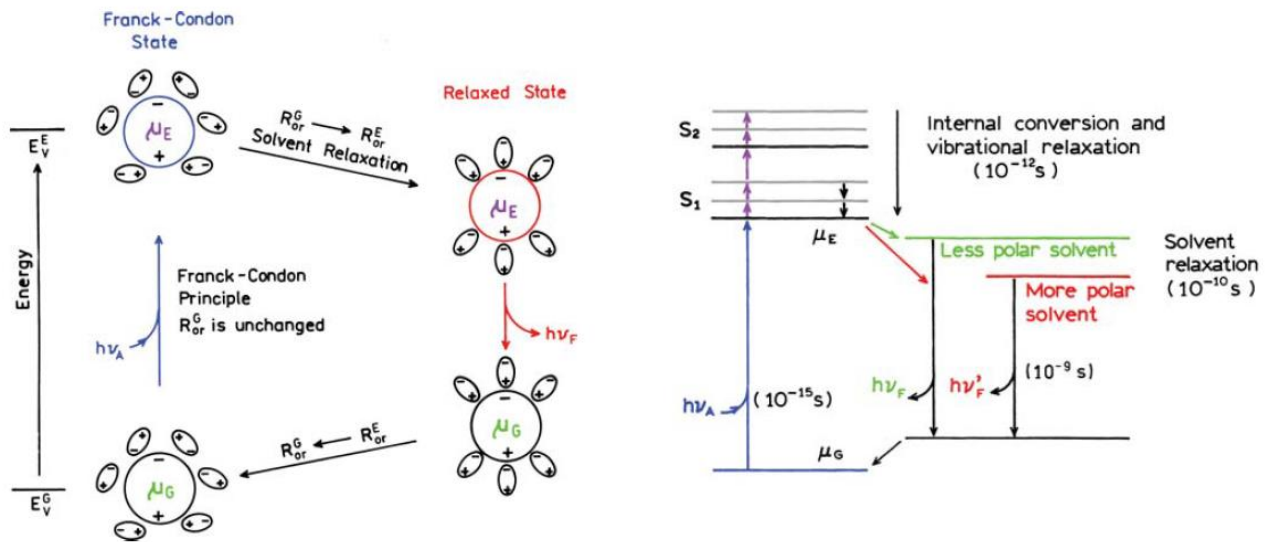


Figura 2.1. Dinámica de un proceso de solvatación (figura tomada de la bibliografía)².

El estudio de los fenómenos de solvatación está condicionado, sin embargo, por la complejidad intrínseca de sus circunstancias de medida, ya que, como se anticipaba anteriormente, los tiempos de vida de fluorescencia (1-10 ns) son significativamente superiores a los requeridos para la relajación del disolvente (10-100 ps)¹. Por este motivo el espectro de absorción tampoco revela información acerca de estos procesos, ya que la absorción de luz tiene lugar en órdenes de magnitud en torno a 10^{-15} s, un periodo de tiempo excesivamente limitado para apreciar movimiento en el soluto o el disolvente. Esto explica que el espectro de absorción no presente excesiva sensibilidad a la polaridad del disolvente, ya que la molécula se encuentra en el mismo entorno tanto en estado fundamental como excitado. Sin embargo, el espectro de emisión está expuesto al disolvente en condiciones de relajación, con lo que refleja el comportamiento del fluoróforo en estado excitado una vez que las moléculas de disolvente se han reorientado en torno a él. Consecuentemente y en términos generales, a longitudes de onda próximas

al UV la intensidad del decaimiento de la señal de fluorescencia es mayor, ya que se debe a la contribución combinada de los procesos de emisión y relajación del disolvente alrededor de la molécula en estado excitado. Sin embargo, a longitudes de onda mayores, el decaimiento se debe únicamente a la emisión de fluoróforos que ya se han relajado².

2.2 Transferencia Intramolecular de Carga (ICT)

La mayor parte de las sondas fluorescentes sufren una *transferencia intramolecular de carga fotoinducida (ICT)* después de la excitación^{11,12}. Este proceso implica la redistribución de la densidad electrónica de la sonda, lo que modifica la posición de la molécula con mayor densidad de carga (su región más básica) como consecuencia de la absorción de radiación. Los fluoróforos que presentan esta reactividad¹³⁻¹⁵ contienen tanto grupos donadores (habitualmente grupos amino) como aceptores de electrones, experimentando una transferencia intramolecular de carga (ICT) del donador al aceptor como consecuencia de la fotoexcitación.

Al proceso de fotoexcitación también se le atribuye el cambio en el momento dipolar de la molécula, cuyo valor en estado excitado (μ_e) difiere del valor en estado fundamental (μ_g), resultando habitualmente $\mu_e > \mu_g$. Esto se debe a que, de acuerdo con el principio de Franck Condon, a pesar de que la absorción de un fotón ($\sim 10^{-15}$ s) es un proceso mucho más rápido que el desplazamiento del núcleo, permite una redistribución de carga. Este efecto se vuelve más patente cuanto mayor es la polaridad del disolvente¹.

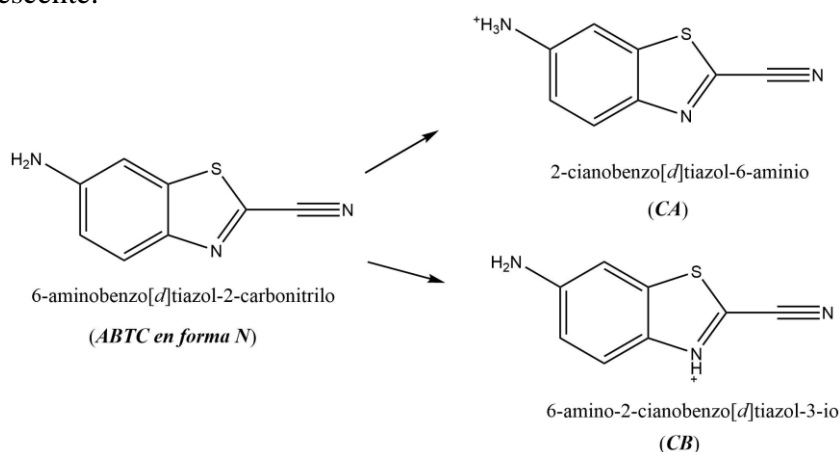
2.3 Sondas fluorescentes

Para que un fluoróforo con reactividad fundamentada en la ICT y la relajación del disolvente se pueda configurar como una sonda fluorescente con propiedades atractivas para su uso como indicador de polaridad, debe cumplir una serie de requisitos. El más relevante de todos ellos requiere que la molécula experimente un cambio significativo en su momento dipolar posteriormente a ser excitada, aunque conservando la dirección¹. Sin embargo, generalmente, solo los fluoróforos polares son capaces de experimentar una elevada sensibilidad a la polaridad del disolvente. El radio de un fluoróforo aromático

típico ($\sim 4 \text{ \AA}$) hace que un momento dipolar en estado excitado (μ_e) $\sim 20 \text{ D}$ equivalga a una unidad de separación de carga de distancia equiparable a su propio tamaño².

Los fluoróforos que experimentan ICT se configuran como idóneos para su uso como sondas de polaridad. Los primeros antecedentes se encuentran en la sonda ANS (1-anilino-8-naftalenosulfonato), presentada por Weber y Lawrence en 1954. Posteriormente, en 1979, Weber y Farris presentaron la sonda PRODAN [6-propionil-2-(dimetilaminonaftaleno)]¹. Años después se desarrollaron derivados de estas sondas como LAURDAN o los colorantes BODIPY¹⁶⁻¹⁸. A lo largo de las últimas décadas se han desarrollado numerosas líneas de investigación alternativas sobre familias de moléculas¹⁹ con propiedades atractivas para su uso como sondas fluorescentes, llevando a cabo, entre otros, estudios acerca de sus polaridades (debida a la reorientación de los dipolos del disolvente) en relación a las del disolvente (descrita por el índice de refracción, n). Entre estas familias de moléculas se encuentran los benzimidazoles, los benzoxazoles o los benzotiazoles²⁰⁻²³ como la luciferina. Precisamente, la falta de estudios previos sobre el comportamiento de una molécula concreta, el **6-amino-1,3-benzotiazol-2-carbonitrilo**, ha llevado a realizar un análisis de caracterización que permita establecer las bases de su reactividad.

La diferente posición de protonación de esta molécula en estado fundamental (que tiene lugar en el grupo amino) y excitado (en el átomo de N del grupo benzotiazol) confirma la existencia de una redistribución de su densidad electrónica por medio de una transferencia intramolecular de carga fotoinducida (ICT). Este proceso junto con un análisis detallado de su sensibilidad a las condiciones de acidez del medio la postularán, a lo largo de este trabajo, como una molécula con propiedades atractivas para su uso como sonda fluorescente.



3. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

3.1 Objetivos

El objetivo principal de este trabajo es la caracterización fisicoquímica del 6-amino-1,3-benzotiazol-2-carbonitrilo (al que nos referiremos en adelante como **ABTC**) mediante medidas de espectroscopía UV-Visible y espectroscopía de fluorescencia, con el objeto de conocer su reactividad en vistas a utilizarlo como sonda fluorescente en distintos medios de reacción de los que se desee conocer parámetros como la polaridad o la acidez. Se pretende, asimismo, estudiar el comportamiento de la molécula desde la óptica de su interacción con el disolvente, analizando la cinética de la reacción de solvatación y su influencia en la reactividad.

3.2 Plan de trabajo

El estudio se llevó a cabo de acuerdo con el plan de trabajo siguiente:

- a) Medidas de absorción UV-Vis en distintos medios de reacción y condiciones de acidez:
 - I. Agua (medio neutro, medio básico y serie de acidez creciente)
 - II. Etanol

- b) Medidas de fluorescencia en estado estacionario en diferentes disolventes y condiciones de acidez:
 - I. Agua (medio neutro y serie de acidez creciente)
 - II. Etanol, acetonitrilo, DMSO (dimetilsulfóxido), THF (tetrahidrofurano), 2-Butanol y ciclohexano

- c) Medidas de tiempos de vida de fluorescencia en 1-Butanol.

- d) Tratamiento de datos e interpretación de resultados.

4. PROCEDIMIENTO Y TÉCNICAS EXPERIMENTALES

4.1 Preparación de disoluciones

Se preparó una disolución inicial¹ de concentración $\sim 1,01 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ de 6-amino-1,3-benzotiazol-2-carbonitrilo (97%, marca Sigma-Aldrich) en etanol grado HPLC, diluida en la cubeta para las medidas de absorción UV-Vis de la molécula. A partir de esta disolución inicial se obtuvo una disolución acuosa de concentración $\sim 7,79 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, que se diluyó nuevamente en la cubeta para las medidas de fluorescencia.

Las medidas de absorción UV-Visible se llevaron a cabo manteniendo una concentración de muestra del orden de magnitud de $\sim 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, con la finalidad de asegurar el cumplimiento de la Ley de Beer-Lambert y con ello la proporcionalidad entre señal y concentración²⁴. También se estimó despreciable la influencia del disolvente de partida (etanol) para las medidas llevadas a cabo en otros disolventes distintos.

Para el análisis en medio ácido se prepararon disoluciones de HClO_4 de concentraciones 0,5, 0,02 y 0,0056 mol dm^{-3} (según el pH requerido), adicionadas en la cubeta directamente y de forma inmediatamente previa a la realización de las medidas. El pH se calculó a lo largo de este trabajo utilizando la expresión $\text{pH} = -\log [\text{H}^+]$. Para las medidas en medio básico se ha utilizado una disolución de NaOH $1,082 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$.

Para las medidas de fluorescencia, tiempos de vida y estado estacionario en distintos disolventes se utilizaron etanol, ciclohexano, DMSO, THF, 1-butanol, 2-butanol y acetonitrilo, todos ellos calidad HPLC. Se trabajó con la dilución de ABTC en H_2O de $7,79 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ (considerando nuevamente la influencia del disolvente despreciable), manteniendo siempre una concentración de muestra del orden de $\sim 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ en la cubeta, con la finalidad de garantizar, de manera análoga a lo que sucedía en las medidas de absorbancia, la dependencia lineal entre la intensidad de la fluorescencia y la concentración de muestra²⁴.

¹ La concentración de todas las disoluciones utilizadas en este trabajo se ha seguido por pesada, con la finalidad de obtener la máxima precisión posible.

4.2 Absorción UV-Visible

Los espectros de absorción se recogieron con un espectrofotómetro de doble haz marca VARIAN, modelo CARY 3E. Este equipo (**Figura 4.1**) utiliza un sistema óptico que cuenta con dos lámparas como fuente de radiación, una de deuterio (para λ en el UV) y otra de tungsteno (para λ en el visible). Esto permite medidas de absorción entre los 190 y los 900 nm en un intervalo de absorbancias entre 10^{-4} y 3, con resolución espectral máxima de 0,2 nm. El equipo cuenta con un premonocromador y un monocromador (como selectores de longitud de onda) y dos *chopper*, que permiten el paso del haz seleccionado (procedente de la muestra o de la referencia) a un elemento detector, en este caso un tubo fotomultiplicador²⁵.

Los espectros de absorción recogidos en este trabajo se registraron con rendijas de 2 mm y a velocidad de 60 nm/min (lo que implica la obtención de un dato cada 0,5 nm con un tiempo de integración de 0,5 s), midiendo previamente un blanco del disolvente a utilizar. Adicionalmente, las cubetas empleadas (dos simultáneamente, correspondientes a muestra y referencia) cuentan con dos caras opuestas pulidas y un paso de luz de 1 cm.

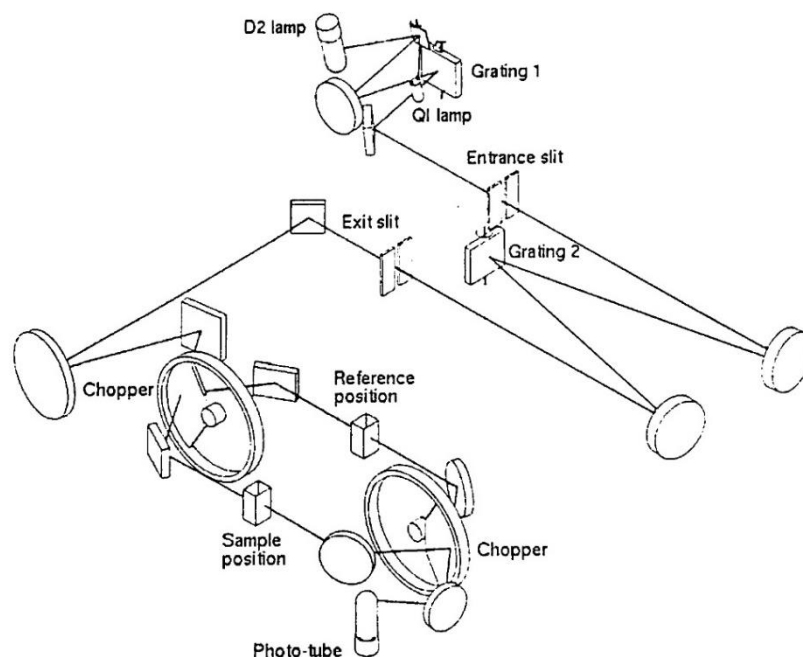


Figura 4.1. Esquema de la óptica de un espectrofotómetro de absorción UV-Vis VARIAN, modelo CARY 3E (disponible en el manual del equipo)²⁵.

4.3 Fluorescencia en estado estacionario

Los espectros de excitación y emisión de fluorescencia se registraron con un espectrofluorímetro marca SPEX modelo Fluorolog-2 FL340 E1, que utiliza la técnica de recuento de fotones. El equipo (**Figura 4.2**) cuenta con una lámpara continua de Xe de 450 W como fuente de excitación, dos monocromadores (uno de excitación y otro de emisión) y dos tubos fotomultiplicadores para la detección, que, al llevarse a cabo a 90 grados con respecto al haz de excitación, hace que para las medidas se requieran cubetas de cuarzo con las cuatro caras pulidas. El detector de referencia del equipo (una disolución concentrada de Rodamina B en etilenglicol) constituye un sistema de corrección espectral frente a fluctuaciones en la intensidad de la lámpara²⁶.

La obtención de los espectros de excitación y emisión de la molécula se debe a la coordinación de los dos monocromadores (manteniendo fijo uno de ellos para cada medida). Midiendo previamente un blanco del disolvente a utilizar, se utilizaron rendijas de 0,5 mm para excitación y 0,2 mm para emisión, con un tiempo de integración de 0,5 s y registrando un dato cada 0,5 nm. Con la finalidad de minimizar el ruido de fondo todos los espectros fueron registrados en modo *autocero* y señal/referencia, lo que corrige la variación de intensidad en la radiación excitatriz con la longitud de onda.

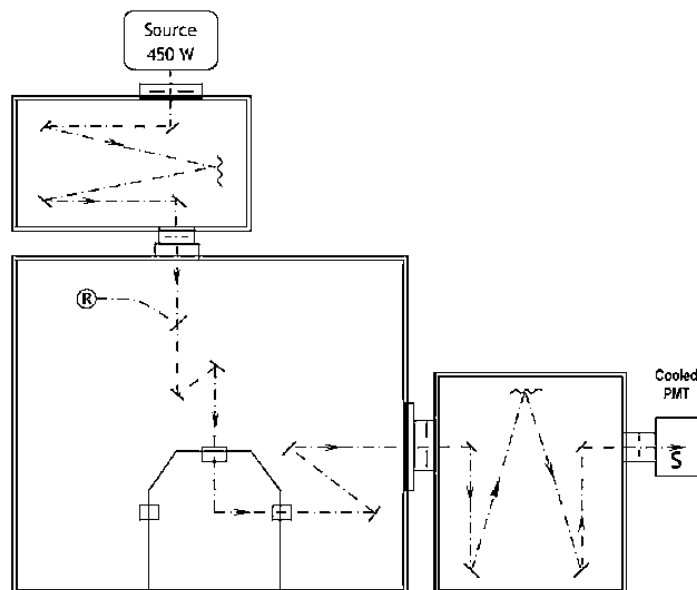


Figura 4.2. Esquema de la óptica de un espectrofluorímetro SPEX, modelo Fluorolog-2 FL340 E1 T1 (disponible en el manual del equipo)²⁶.

4.4 Medida de tiempos de vida de fluorescencia

Los tiempos de vida de fluorescencia se midieron empleando la técnica de recuento de fotones individuales correlacionada con el tiempo o *TCSPC*, utilizando un espectrofotómetro marca EDINBURGH INSTRUMENTS modelo LifeSpec-ps. Este equipo utiliza un láser de diodo de picosegundos como fuente de excitación, con $\lambda_{\text{EXC}} = 370 \text{ nm}$; la emisión de luz polarizada de esta fuente hace necesaria la presencia de un polarizador Glan Thompson. También se incluye un monocromador con rendijas de 0,5, 1 y 2 mm y un fotomultiplicador *Multichannel Plate* como detector²⁷.

4.4.1. TCSPC (*Time Correlated Single Photon Counting*)²

La técnica TCSPC o *Time Correlated Single Photon Counting* (técnica de recuento de fotones individuales correlacionada con el tiempo) es una de las herramientas más sensibles disponibles en la actualidad para la medida de tiempos de vida de fluorescencia.

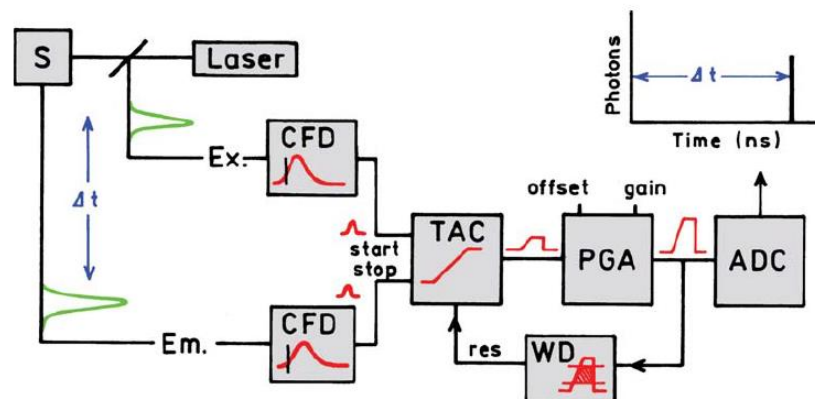


Figura 4.3. Esquema electrónico de la TCSPC (figura tomada de la bibliografía)².

El fundamento de esta técnica (**Figura 4.3**) se basa en la correlación entre el recuento de fotones y el pulso de excitación. La muestra se excita y genera una señal que pasa por un CFD (Constant Function Discriminator) que determina con precisión su tiempo de llegada. La señal pasa posteriormente a un TAC (Time to Amplitude Converter), que origina un voltaje creciente que aumenta de manera lineal en relación al tiempo en una escala de nanosegundos. Paralelamente, un segundo canal detecta el pulso procedente del fotón emitido mediante otro CFD, lo que cuantifica la demora (Δt) entre

las señales de excitación y emisión. Este voltaje se amplifica utilizando un PGA (Programmable Gain Amplifier) y un ADC (Analog to Digital Converter) lo transforma en un valor numérico, reflejando el decaimiento de la señal de fluorescencia².

4.5 Tratamiento de datos

Los datos experimentales obtenidos en este trabajo se analizaron utilizando el programa Sigmaplot 12.5, a excepción de los ajustes realizados con los datos de fluorescencia resuelta en el tiempo, gestionados usando MATLAB.

4.5.1. Corrección de espectros de fluorescencia

La dependencia de la eficiencia de los monocromadores de excitación y emisión y de los tubos fotomultiplicadores con la longitud de onda hace necesaria una corrección posterior a su obtención de los espectros de excitación y emisión de la muestra, con la finalidad de que reflejen la realidad. Esta corrección se lleva a cabo con una función suministrada por la casa comercial $[C(\tilde{\nu})]$, que tras multiplicar por las medidas obtenidas experimentalmente $[F'(\tilde{\nu})]$ proporciona los datos reales $[F(\tilde{\nu})]$:

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

4.5.2. Medida de tiempos de vida de fluorescencia²

La emisión de fluorescencia que sucede a la excitación de una muestra se puede expresar de acuerdo con los valores experimentales $F(t)$, una distribución temporal generada a partir de la integral de convolución del pulso de la fuente, $L(t)$. El equipo que se utiliza es capaz de generar $D(t)$ – la señal de fluorescencia que se obtendría si el sistema fuese excitado con un pulso muy breve – mediante el método de reconvoluciones iterativas por mínimos cuadrados, suponiendo modelos de decaimiento basados en sumas de funciones exponenciales que permitan calcular $F(t)$ y compararlo con el experimental.

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

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Absorción UV-Visible

5.1.1 Efecto del disolvente

El estudio del ABTC se inicia con el análisis de su comportamiento en estado fundamental, por medio de la medida de su espectro de absorción UV-Visible en dos disolventes, H₂O y etanol (**Figura 5.1**).

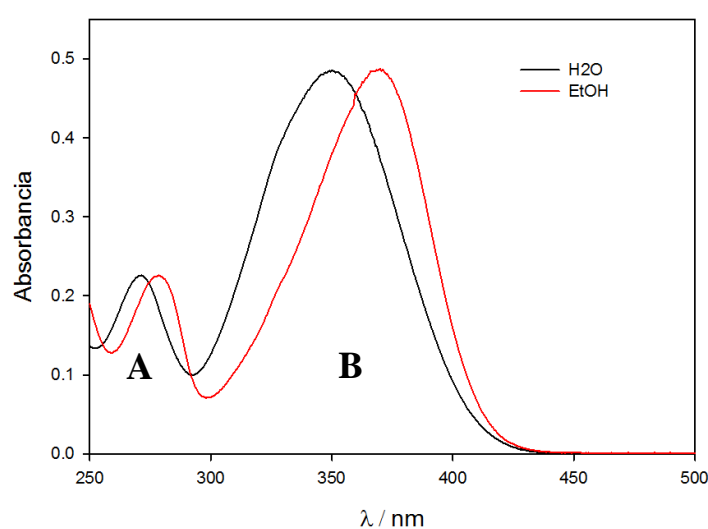


Figura 5.1. Espectros de absorción UV-Vis en H₂O y EtOH medidos a una concentración $6,31 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ de ABTC.

La destacable similitud en la forma de los espectros nos confirma que la molécula se encuentra en los dos casos en una misma especie, la forma neutra (a la que nos referiremos en adelante como **N**). En ambos se observa una banda principal de intensidad significativa y ligeramente anheada – banda **B** – (engloba dos transiciones electrónicas), y una segunda banda de intensidad notablemente inferior – banda **A** –, correspondiente a otra transición más energética (situada a menor longitud de onda). Estas bandas varían su posición en función del disolvente, presentándose el espectro ligeramente desplazado hacia longitudes de onda mayores en el caso del etanol (**Tabla 5.1**).

Tabla 5.1. Posición de los máximos de absorción de las dos bandas UV-Vis en H₂O y EtOH.

Disolvente	λ Banda A / nm	λ Banda B / nm
H ₂ O	274	350
EtOH	278	370

El desplazamiento del espectro de absorción de ABTC en agua respecto al espectro en etanol pone de manifiesto su comportamiento solvatoocrómico^{6,7} (un desplazamiento espectral en respuesta a una variación de la polaridad del disolvente). También corrobora la fuerte interacción de la molécula con el disolvente y su elevada sensibilidad como sonda fluorescente para determinar variaciones en la polaridad del medio, y predice una enorme relevancia de la dinámica de solvatación en su comportamiento.

5.1.2. Efecto de la acidez en agua

El estudio en UV-Vis continúa con el análisis del comportamiento de la molécula en distintas condiciones de pH, con la finalidad de caracterizar su reactividad para su uso posterior como una sonda fluorescente que permita determinar las condiciones de acidez del medio objeto de análisis. Utilizando como disolvente H₂O, se adicionan NaOH y HClO₄ en dos series distintas. Con ello se comprueba que el espectro de absorción de la molécula en agua no cambia al basificar el medio, con lo que el ABTC no se desprotona en esas condiciones de acidez. Por el contrario, el espectro de absorción de ABTC en agua varía tras la acidificación progresiva del medio en un rango entre pH ~ 4 y pH ~ 0,8 (**Figura 5.2**)^{II}. A medida que aumenta la acidez, la banda con máximo a 350 nm (correspondiente a la molécula neutra) pierde intensidad progresivamente al avanzar la protonación, mientras que la banda que presentaba inicialmente un máximo a 274 nm experimenta un aumento continuado en intensidad y desplaza ligeramente la posición del

^{II} Los espectros correspondientes a series de medidas (**Figuras 5.2 y 5.6**) se representan con el factor de corrección correspondiente a la dilución causada por la adición de ácido

máximo a longitudes de onda mayores. Este aumento paulatino en la absorbancia paralelo al aumento de protones en el medio corrobora la hipótesis de que esa banda se corresponde con la aparición de una forma catiónica (protonada) de la molécula. A pH ~ 1 , la banda correspondiente a la molécula neutra presenta una intensidad mínima, y la banda correspondiente a la forma protonada de la molécula alcanza su máximo de absorbancia, lo que evidencia una protonación total.

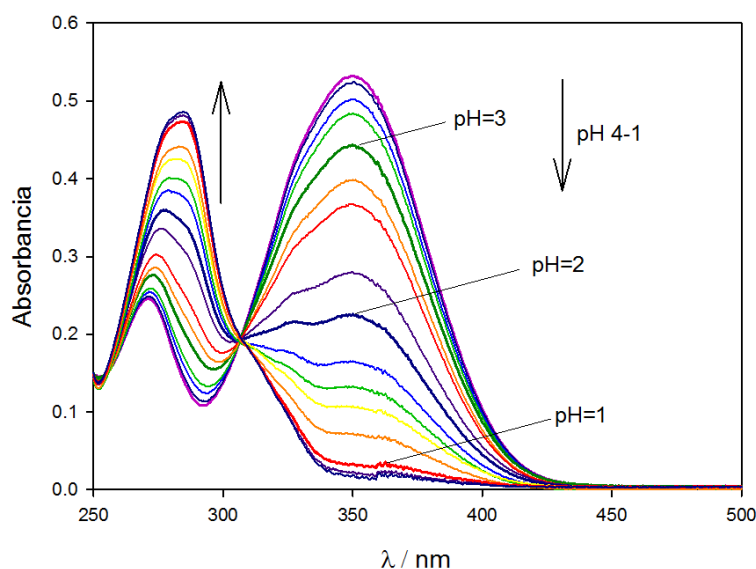
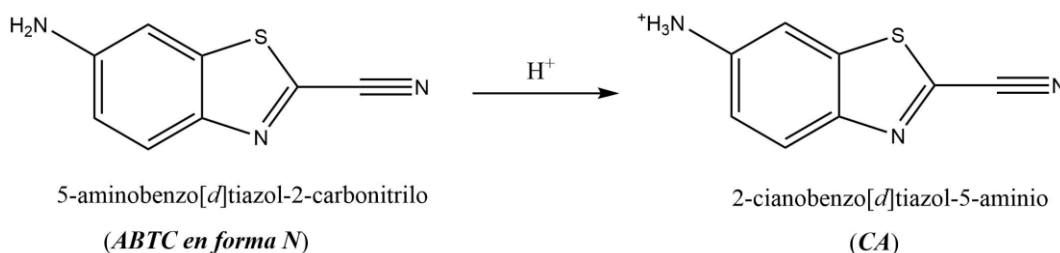


Figura 5.2. Espectros de absorción UV-Vis en una serie de acidificación progresiva con HClO_4 de pH 4 a 1 medidos a una concentración inicial de $7,13 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ de ABTC.

Confirmada la existencia de un proceso de aparición de una forma catiónica de la molécula en medio ácido, pasa a discutirse la posición a la que se dirigen los protones y la posibilidad de una protonación múltiple, debido a la existencia de dos posibles zonas de protonación (el grupo amino y el átomo de N del grupo benzotiazol). La forma y posición de la banda correspondiente al catión (con máximo a longitudes de onda menores que la molécula neutra) respaldan la protonación única en el grupo amino, sustentada también por la comparación con datos bibliográficos de moléculas similares como la anilina²⁸. Una hipotética protonación en el N benzotiazólico vendría acompañada de la aparición de una banda de absorción desplazada hacia longitudes de onda mayores que la banda de absorción de la molécula neutra²⁹, lo que no se observa. Esto postula al grupo amino como la zona más básica de la molécula en estado fundamental e identifica a la molécula protonada como el 2-cianobenzo[d]tiazol-6-aminio (**Figura 5.3**), a la que nos

referiremos en adelante como catión aminio (**CA**), cuya aparición se debe al proceso $\text{N} + \text{H}^+ \rightarrow \text{CA}$.

Figura 5.3. Estructura molecular del catión aminio (**CA**).



Sabiendo que el espectro de absorción de la molécula se debe a todas las especies presentes en disolución y que la absorbancia a valores bajos es una propiedad física directamente relacionada con la concentración (**Ec 1**), la absorbancia de la muestra medida se deberá a la suma de las absorbancias de las dos formas en las que está presente la molécula: la forma neutra (**N**) y la forma protonada, el catión aminio (**CA**).

$$A(\lambda) = \sum_{i=1}^n \varepsilon_i \cdot c_i \cdot b \quad (\text{Ec 1})$$

(Siendo i cada especie que absorbe radiación, ε_i su coeficiente de absorción molar en $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$, c_i su concentración en disolución y b la longitud en cm de la cubeta en la que se llevan a cabo las medidas).

Obtenidos experimentalmente los espectros en el rango de pH 4-1, procede a realizarse un ajuste con los datos de absorbancia que proporcione el valor de la constante de disociación ácida (K_a) del catión aminio (**CA**) según el proceso $\text{CA} \rightleftharpoons \text{N} + \text{H}^+$, obteniendo un valor que satisfaga la ecuación a todas las longitudes de onda (**Ec 2**)^{III}.

$$A(\lambda, \text{H}^+) = A_1(\lambda) \cdot \frac{[\text{H}^+]}{K_a + [\text{H}^+]} + A_2(\lambda) \cdot \frac{K_a}{K_a + [\text{H}^+]} \quad (\text{Ec 2})$$

Del ya mencionado ajuste de la (**Ec 2**) a los datos espectrales de la (**Figura 5.2**) se obtienen los valores de los términos A_1 y A_2 para cada longitud de onda (ya que dependen de la longitud de onda de la medida además de la concentración de protones) y el valor K_a del catión (**Tabla 5.2**).

Tabla 5.2. Valores de los términos A_1 , A_2 y la constante K_a a varias λ , obtenidos del ajuste de la (Ec 2) a los datos de la (Figura 5.4) ^{IV}.

λ / nm	A_1	A_2	K_a / M
270	0,3795(20)	0,2433(16)	0,00950(70)
285	0,5048(45)	0,1337(15)	0,00900(50)
300	0,2636(19)	0,1370(24)	0,00990(70)
315	0,1439(26)	0,2850(24)	0,00790(70)
330	0,0407(60)	0,4515(53)	0,00840(60)
350	-0,0131 ~ 0	0,5434(68)	0,00860(60)

Se calcula un valor promedio de $K_a = \mathbf{0,00888(26) M}$ (lo que se corresponde con un $\mathbf{pK_a = 2,051(29)}$). La representación gráfica de los datos experimentales y los obtenidos mediante el ajuste confirma que el modelo propuesto es adecuado (**Figura 5.4**).

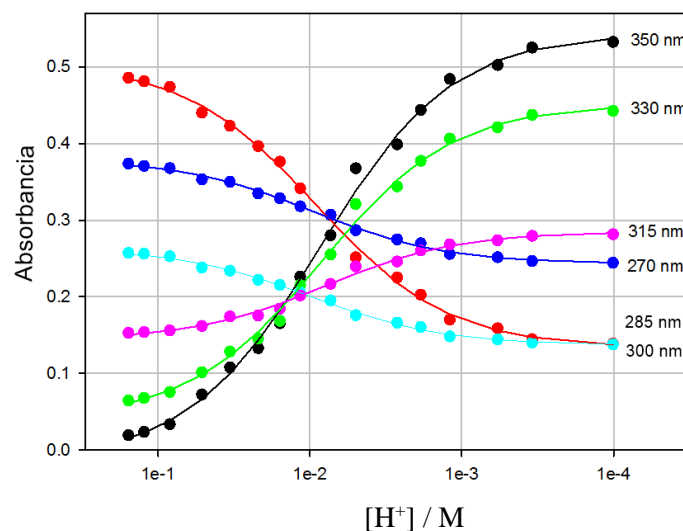


Figura 5.4. Datos experimentales de absorbancia frente a la concentración de protones a varias longitudes de onda (puntos) y representación del ajuste (línea).

^{III} Desarrollo matemático de la ecuación en el anexo

^{IV} Los valores negativos no tienen sentido matemático en estas circunstancias y se aproximan a 0 por medio de la desviación estándar

5.2 Medidas de fluorescencia

5.2.1 Efecto de la acidez en agua

Finalizado el estudio del comportamiento del ABTC en estado fundamental se procede al análisis de su reactividad en estado excitado, que se inicia con la medida de su espectro de excitación y emisión en H₂O (**Figura 5.5**). Comparando el espectro de excitación (**Figura 5.5**) con el espectro de absorción UV-Vis (que corresponde a la especie **N** – **Figura 5.2**), la similitud en la forma y la coincidencia de la posición del máximo (a 350 nm) confirman que la molécula se encuentra en forma neutra (**N**) en ambos casos. El espectro de emisión de **N*** muestra muy poco solapamiento con su espectro de excitación, lo que indica que **N** experimenta un cambio estructural en estado excitado, que se discutirá más adelante.

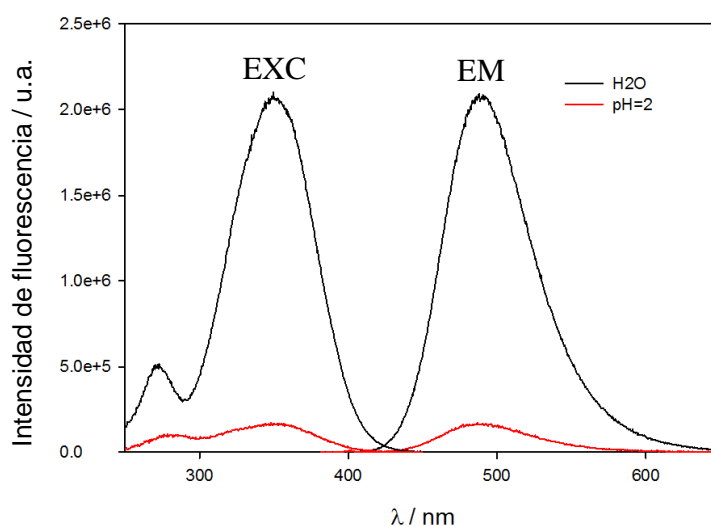


Figura 5.5. Espectros de excitación y emisión para ABTC en H₂O y a pH=2.

Analizada la relevancia de la presencia de protones en el medio para el comportamiento del ABTC en estado fundamental, se prevé que las condiciones de pH afecten también de manera significativa en estado excitado. Se lleva a cabo, por tanto, una primera aproximación a la influencia de la acidez del medio en estas condiciones por medio del cálculo de la constante de disociación ácida para la molécula en estado excitado (pK_a^*), ya que el pK_a^* difiere del valor del pK_a en estado fundamental, calculado previamente en el apartado anterior ($pK_a = 2,051$). Para ello se aplica la ecuación del

Ciclo de Förster (**Ec 3**)¹. En esta expresión $\tilde{\nu}_N$ y $\tilde{\nu}_{CA}$ hacen referencia a los valores en número de onda de las transiciones $0 \rightarrow 0$ de las formas **N** y **CA** respectivamente. Dado que los espectros de ABTC en agua no muestran estructura vibracional no es posible conocer el número de onda de estas transiciones, pero $(\tilde{\nu}_N - \tilde{\nu}_{CA})$ se puede estimar como la diferencia entre los máximos de absorción correspondientes a las especies neutra y protonada del ABTC en estado fundamental (**Tabla 5.3**).

$$pK_a^* - pK_a = 2,1 \cdot 10^{-3} \cdot (\tilde{\nu}_N - \tilde{\nu}_{CA}) \quad (\text{Ec 3})$$

Tabla 5.3. Posición de los máximos de absorción de las formas neutra y protonada de ABTC.

Espece	λ / nm	$\tilde{\nu} / 10^3 \text{ cm}^{-1}$
ABTC neutro (N)	349,5	28,61
Catión aminio (CA)	284,5	35,15

En condiciones análogas a las de este estudio, en las que la banda de emisión de la forma neutra se encuentra a longitudes de onda mayores que la de la forma protonada, el valor de pK_a^* será menor que el de pK_a . El cálculo proporciona, confirmando este planteamiento teórico, un valor de $pK_a^* = -11,7$ para el proceso $\text{CA} \rightleftharpoons \text{N} + \text{H}^+$, y postula a la molécula CA^* como un ácido mucho más fuerte que **CA**. Casos análogos bibliográficamente documentados de otras moléculas similares al ABTC como la acridina también presentan valores de pK_a^* notablemente inferiores a los de pK_a , debidos a la tendencia de los electrones solitarios del grupo $-\text{NH}_2$ a experimentar un aumento de la conjugación al anillo aromático en estado excitado.

Estas condiciones implican la imposibilidad de la protonación en el grupo amino en estado excitado, ya que se requeriría un pH extremadamente ácido para lograr un direccionamiento de los protones hacia esa posición. Sin embargo, una adición preliminar de HClO_4 (pH ~ 2) muestra unos espectros de intensidades notablemente distintas a las que presentaba la molécula en medio neutro (**Figura 5.5**), aunque con máximos de excitación y emisión comunes – 350 y 489 nm respectivamente – (**Tabla 5.4**), que se utilizarán como parámetros fijos para las medidas de todos los espectros de este apartado.

Tabla 5.4. Posición de los máximos de excitación y emisión de ABTC en H₂O.

Disolvente	$\lambda_{\text{EXC}} / \text{nm}$	$\lambda_{\text{EM}} / \text{nm}$
H ₂ O	350	489

El estudio prosigue con un análisis detallado de la influencia de la acidez para seguir el avance de la protonación que tiene lugar y poder contrastarlo con el comportamiento de la molécula en estado fundamental. Para tal fin se registraron los espectros de fluorescencia en estado estacionario del ABTC en agua, en una serie de acidificación progresiva en un rango entre pH ~ 5 y pH ~ 1 (**Figura 5.6**) a $\lambda_{\text{EXC}} = 350$ nm, en condiciones de acidez análogas a la llevada a cabo en estado fundamental. Esta serie muestra una gran disminución de la intensidad de fluorescencia de N* al aumentar la acidez del medio. La emisión de N* tiene su origen en la excitación de N (la especie que absorbe a 350 nm), y dado que al disminuir el pH la especie N se protona en el estado fundamental para dar el catión CA (que no absorbe apreciablemente a 350 nm), la intensidad de fluorescencia de N* debe disminuir al aumentar la acidez, como de hecho se observa, debido a la desaparición progresiva de N en el estado fundamental.

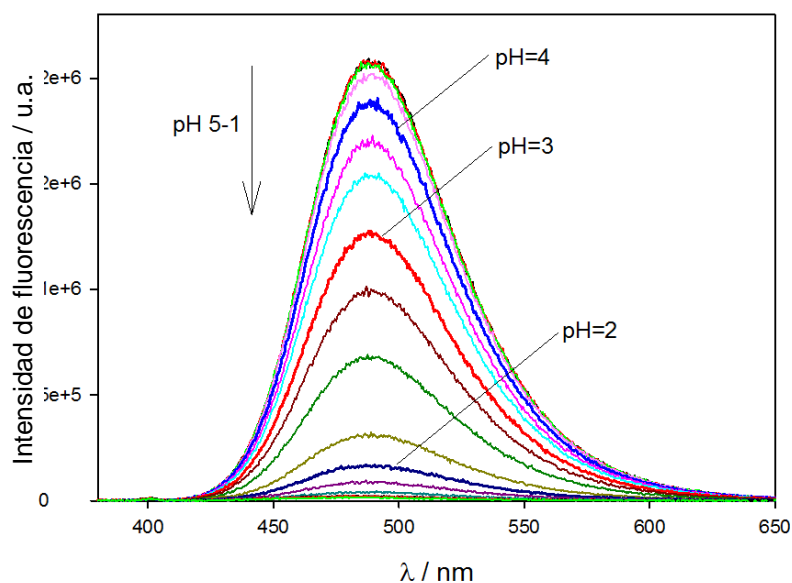


Figura 5.6. Espectros de fluorescencia en estado estacionario a $\lambda_{\text{EXC}} = 350$ nm en una serie de acidificación progresiva con HClO₄ de pH 5 a 1, a una concentración 3×10^{-6} mol dm⁻³ de ABTC.

Por otra parte, mientras que el espectro de absorción a pH 2 (**Figura 5.7**) muestra las contribuciones de **CA** y **N**, el de excitación registrado en el máximo de emisión de **N*** al mismo pH corresponde mayoritariamente a la forma neutra, pero se observa también una pequeña contribución de **CA**. Esto indica que si se excita la muestra a longitudes de onda donde **CA** absorbe luz, se obtiene **CA***, pero el catión se disocia para dar **N*** en concordancia con el gran incremento de acidez que experimenta **CA** tras la excitación electrónica ($pK_a^* = -11,7$).

De acuerdo con la ecuación de Henderson-Hasselbach (**Ec 4**), presentando la molécula un $pK_a = 2,051$, a $pH \sim 2$ el 50% de la cantidad total de ABTC debería encontrarse en forma de catión aminio (**CA**), que al ser una especie no emisora habría provocado un descenso de la señal de emisión a la mitad (de manera análoga a la reducción a la mitad de la señal de absorbancia de la molécula en las medidas de UV-Vis).

$$pH = pK_a + \log \frac{[N]}{[CA]} \quad (\text{Ec 4})$$

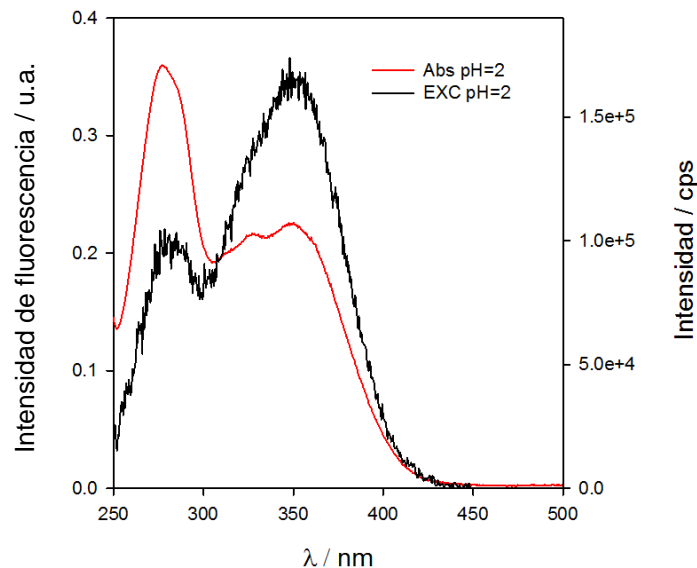


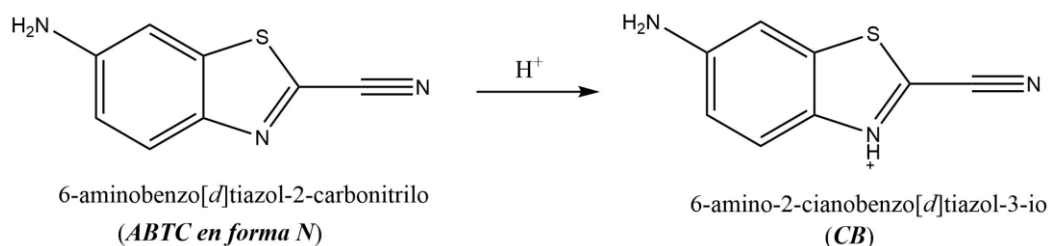
Figura 5.7. Espectros de absorción UV-Vis (eje izquierdo, rojo) y excitación para ABTC (eje derecho, negro) a $pH=2$.

Sin embargo, a este pH la intensidad es notablemente inferior a lo esperado. Este drástico descenso de la intensidad de la señal de emisión pone de manifiesto la existencia de un proceso de *quenching*, que se tendrá en cuenta como una vía adicional de

desactivación del estado excitado. En términos generales se define quenching como un descenso acusado de la señal de fluorescencia, debido, por lo general, al contacto entre el fluoróforo (la molécula objeto de estudio) y una especie ajena a él, el quencher (el elemento que ejerce el quenching), ya que solo en contadas ocasiones se debe a procesos intramoleculares. En el caso que nos ocupa se plantea un modelo en el que el proceso de quenching está causado por el efecto de los protones sobre la especie N^* , que por tanto debe protonarse en estado excitado para dar lugar a un catión, posiblemente no emisor (lo que se discutirá posteriormente) y distinto también del catión CA (forma protonada en estado fundamental).

Conocida la imposibilidad de protonación en el grupo amino debido al elevado valor de pK_a^* para CA (-11,7) pero constatada la aparición de una especie catiónica, se teoriza la existencia en la especie **N** de una transferencia intramolecular de carga fotoinducida en estado excitado (ICT), lo que se traduce en una redistribución de la densidad electrónica de la molécula que provoca que la zona con mayor densidad de carga deje de ser el grupo amino y pase a ser el átomo de N del grupo benzotiazol. Esta hipótesis se recoge bibliográficamente en casos de otras moléculas similares con grupos donadores de electrones (-OH, -SH o -NH₂)¹², y se evidencia asimismo en el poco solapamiento entre los espectros de excitación y emisión de la de la especie **N** (**Figura 5.5**). Con esto se postula al átomo de N benzotiazólico como la región más básica de la molécula en estado excitado, y se identifica a la molécula resultante de la protonación como el 6-amino-2-cianobenzo[d]tiazol-3-io (**Figura 5.8**), al que nos referiremos en adelante como catión benzotiazolio (**CB**), que aparece de acuerdo con el proceso $N + H^+ \rightarrow CB^*$.

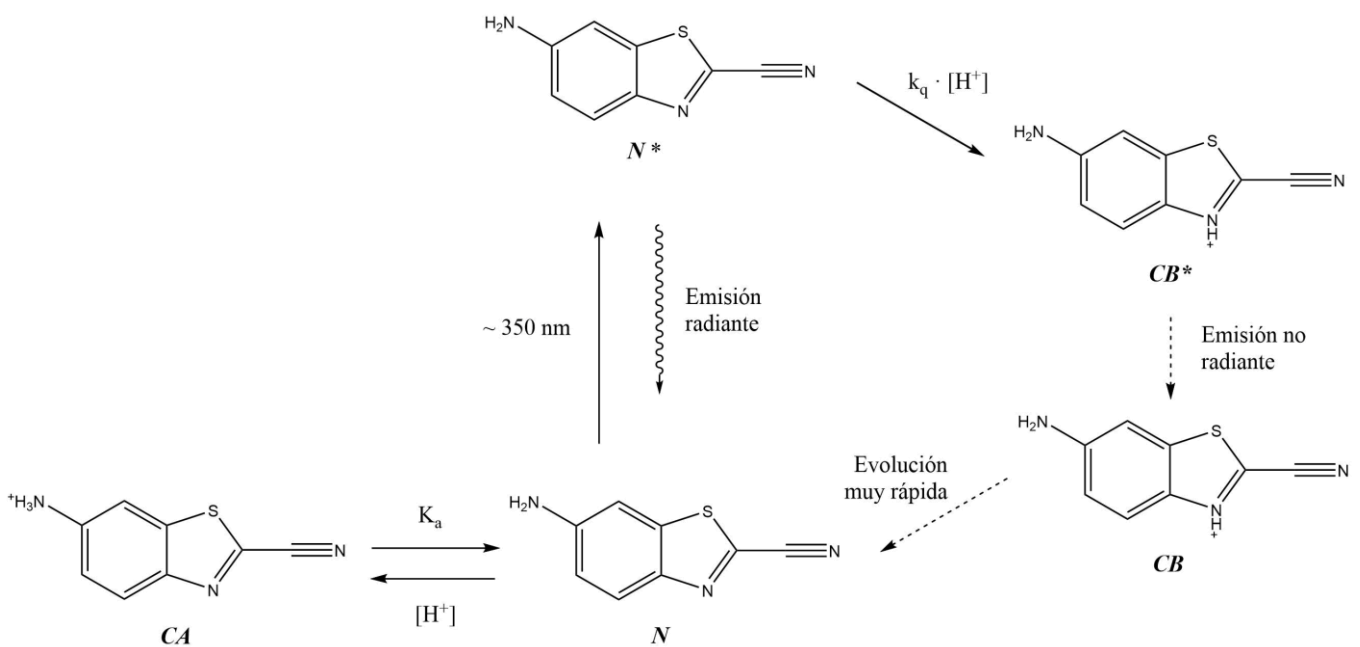
Figura 5.8. Estructura molecular del catión benzotiazolio (CB).



Evidenciada la coexistencia del catión benzotiazolio y la forma neutra de ABTC a lo largo del proceso de protonación, procede a analizarse qué moléculas intervienen en la señal de emisión (fluorescencia). Se observa que, a lo largo de la serie de acidificación progresiva (**Figura 5.6**), no aparece una banda correspondiente al catión (a diferencia de en UV-Vis), sino que la banda de N^* únicamente disminuye paulatinamente de intensidad, lo que plantea la posibilidad de que la única especie emisora sea la forma neutra de la molécula de ABTC (N). Esta hipótesis se confirma normalizando los espectros de la serie, que al resultar superpuestos e indistinguibles (idéntica forma y posición común del máximo – a 489 nm) corroboran que la única especie emisora con excitación a 350 nm es la molécula neutra de ABTC, y ponen de manifiesto que el catión CB^* no emite (tiene un rendimiento cuántico de fluorescencia que hace que su contribución sea prácticamente inapreciable).

Se propone, por tanto, un modelo (**Figura 5.9**) en el que la forma neutra de la molécula de ABTC, N , alcanza el estado excitado por medio de absorción de radiación (I_a), obteniéndose N^* , y se desactiva a través de varias vías: por medio de emisión de radiación (procesos radiantes - k_r), procesos no radiantes (k_{nr}) y un proceso de quenching (siendo k_q la constante de eficiencia del quenching) debido a la presencia de protones en el medio, lo que provoca la aparición de una especie protonada no emisora (CB^*).

Figura 5.9. Esquema de los procesos que experimenta la molécula de ABTC.



Una vez propuesto el modelo es necesario comprobar su validez. Para ello se deriva la ecuación que relaciona la intensidad de fluorescencia con $[H^+]$ y se ajusta a los datos experimentales. En términos generales, el descenso de la señal de fluorescencia de una molécula A se atribuye a la existencia de procesos de desactivación radiantes (que tienen como consecuencia la emisión de un fotón y el cambio entre estados con la misma multiplicidad) y no radiantes (como la conversión interna y el cruce intersistemas), reflejados en la ley de desaparición (**Ec 5**), en la que el tiempo de vida de A^* (τ) se corresponde con la inversa de la suma de las constantes de desactivación por medio de los procesos radiantes (k_r) y no radiantes (k_{nr}).

$$[A^*]_t = [A^*]_{t=0} \cdot e^{-t/\tau} \quad ; \quad \tau = \frac{1}{k_r + k_{nr}} \quad (\text{Ec 5})$$

En el caso del ABTC, la existencia del proceso $N + H^+ \rightarrow CB^*$ hace necesario incluir el término $k_q \cdot [H^+]$ en la ecuación que analiza la evolución de la concentración de estado estacionario de la molécula N^* (**Ec 6**), en la que aparecen en el numerador los procesos que contribuyen a su aparición y en el denominador los responsables de la desaparición. Se observa en esta expresión que la $[N^*]_{ss}$ (y con ello la intensidad de fluorescencia de N^*) disminuye al aumentar la acidez debido tanto al descenso de I_a (como consecuencia de la protonación de N en el estado fundamental) como al incremento del término $k_q \cdot [H^+]$ (que hace disminuir el tiempo de vida de fluorescencia de N^*).

$$[N^*]_{ss} = \frac{I_a}{k_r + k_{nr} + k_q \cdot [H^+]} \quad (\text{Ec 6})$$

Como se justificó anteriormente, la hipótesis de trabajo se basa en la simultaneidad de los procesos de quenching estático y dinámico (en estado fundamental y excitado respectivamente), lo que se discutirá a continuación de manera más extensa³⁰⁻³³. Con la finalidad de analizar las diferencias entre los dos procesos de quenching mencionados anteriormente proceden a analizarse por separado, con la salvedad de que en ambos se requiere un contacto directo entre el fluoróforo y el quencher.

En primer lugar y en términos generales, el proceso de **quenching estático** se debe a la desaparición de la especie neutra – la molécula emisora de ABTC – como consecuencia de la formación de un complejo no emisor en el estado fundamental, lo que en este caso se corresponde con la protonación y aparición del catión aminio ($\mathbf{N} + \mathbf{H}^+ \rightarrow \mathbf{CA}$). Este proceso no modifica el tiempo de vida de fluorescencia de \mathbf{N}^* , y afecta a la molécula en estado fundamental, ya que cuanto mayor sea la cantidad de quencher añadido menor será la concentración de molécula disponible para ser excitada, y en consecuencia se obtendrá una intensidad de emisión (F) menor. La relación entre la intensidad de fluorescencia en ausencia de quencher (F_0) y en presencia del mismo (F) viene dada por la **(Ec 7)**, que se desarrolla en el Anexo.

$$\frac{F_0}{F} = 1 + \frac{1}{K_a} \cdot [H^+] \quad , \quad \text{siendo} \quad \frac{1}{K_a} = \frac{[CA]}{[N] \cdot [H^+]} \quad \text{(Ec 7)}$$

Por el contrario y a diferencia del quenching estático, el **quenching dinámico** o quenching colisional es un proceso bimolecular en el estado excitado (intervienen tanto la especie emisora como el quencher) resultado del proceso difusivo del quencher hacia el fluoróforo y las colisiones posteriores, que disminuye el tiempo de vida de la molécula, despoblando el estado excitado sin emisión de fotones. Para casos generales, este proceso está representado de acuerdo con la ecuación de *Stern-Volmer* **(Ec 8)**, en la que la constante k_q está relacionada con la frecuencia colisional entre moléculas. Si el resultado es un valor de k_q en torno a $1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ existe un control difusional, mientras que para valores superiores se pone de manifiesto la formación de algún enlace.

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q \cdot \tau \cdot [H^+] \quad \text{(Ec 8)}$$

En el caso concreto que se estudia, en el que hay simultáneamente quenching estático y dinámico la expresión F_0/F viene dada por la **(Ec 9)**, que incluye los términos correspondientes a los procesos de quenching estático (término izquierdo en el producto) y dinámico (término derecho en el producto).

$$\frac{F_0}{F} = \left(1 + \frac{1}{K_a} \cdot [H^+]\right) \cdot (1 + \tau \cdot k_q \cdot [H^+]) \quad \text{(Ec 9)}$$

La representación de la relación de intensidad de la fluorescencia (F_0/F) frente a la concentración de protones (gráfica de *Stern-Volmer*) debe ser lineal cuando solo existe quenching estático (**Ec 7**) o dinámico (**Ec 8**), mientras que si ocurren ambos procesos se obtiene una curva como consecuencia de la aparición de un término cuadrático (**Ec 9**). La gráfica de Stern-Volmer para el ABTC (**Figura 5.10**) muestra una curva ascendente, ratificando la presencia de quenching estático y dinámico.

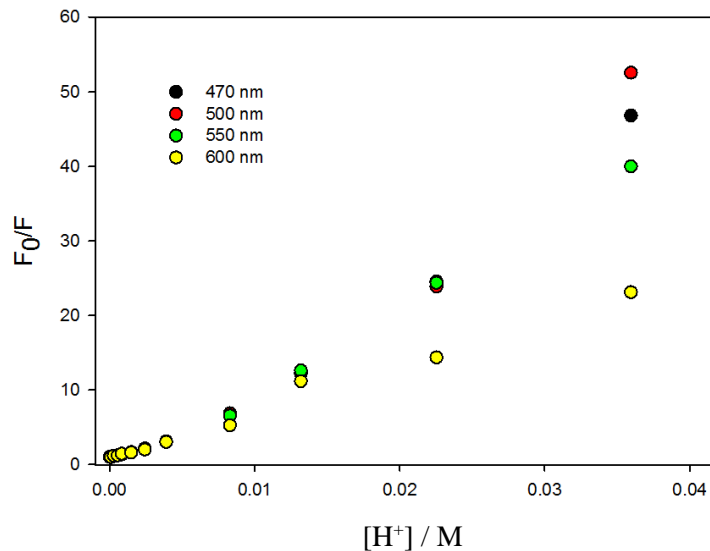


Figura 5.10. Representaciones a varias longitudes de onda del cociente entre la fluorescencia en el momento inicial y la fluorescencia a medida que avanza la serie de acidificación del medio (F_0/F) frente a la concentración de protones (Gráfica de Stern-Volmer).

Para este estudio se trabajará con la (**Ec 10**), inversa de la (**Ec 9**). Esta expresión utiliza una variación para el término izquierdo (quenching estático) que refleja la cantidad de especie emisora (N) disponible a cada momento en función de la concentración de protones. A concentraciones bajas de protones, $[H^+]$ será despreciable y el término equivaldrá a 1, y, a medida que la concentración de protones aumente, el término se hará menor (reflejando la desaparición de la especie neutra por medio del proceso de protonación que da lugar al catión aminio: $N + H^+ \rightarrow CA$). La contribución de cada proceso de quenching se corresponde con un término de la ecuación, siendo el producto de ambos el responsable del modelo (**Figura 5.11**).

$$\frac{F}{F_0} = \frac{K_a}{K_a + [H^+]} \cdot \frac{1}{1 + \tau \cdot k_q \cdot [H^+]} \quad (\text{Ec 10})$$

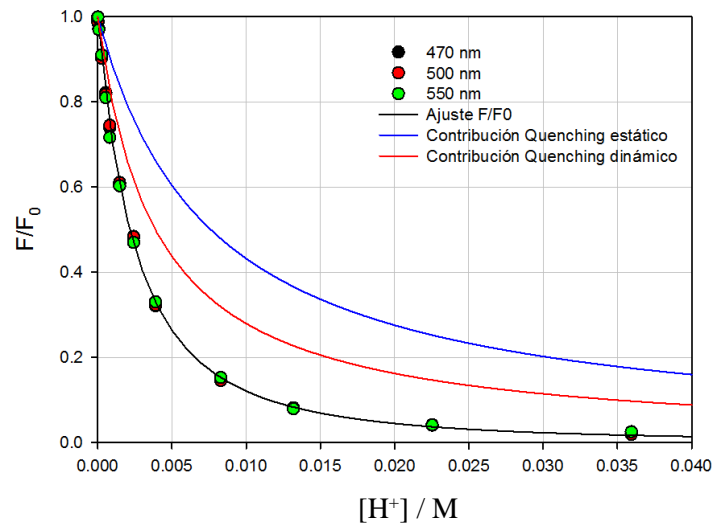


Figura 5.11. Valores experimentales de fluorescencia (F/F_0) a 470, 500 y 550 nm y modelo de quenching propuesto para el proceso (negro), con las contribuciones del término de quenching estático (azul) y dinámico (rojo).

Del ajuste de este modelo en un rango de longitudes de onda entre los 450 y los 550 nm se obtiene un valor de $K_a = 0,00760(20) \text{ M}$ (concordante con el obtenido en las medidas de absorción UV-Vis: $K_a = 0,00888(26)$) y un producto $\tau \cdot k_q = 2,582(41) \times 10^2 \text{ M}^{-1}$, que hace necesarias las medidas de tiempo de vida de la molécula para poder despejar el valor de k_q . La obtención de un valor de tiempo de vida para la molécula en H_2O $\tau = 5,75 \text{ ns}$ nos indicará un valor de $k_q = 4,49 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, lo que sugiere la existencia de control por difusión

5.2.2 Otros disolventes

Con la finalidad de constatar, para su uso como sonda, que la molécula objeto de este estudio (el ABTC) es altamente sensible a las condiciones de polaridad del medio en que se encuentra, se profundiza en el análisis realizando medidas de su comportamiento en distintos disolventes. La fuerte interacción con el disolvente ya se evidenciaba en el espectro de la molécula en agua realizado a comienzos del apartado anterior (**Figura 5.5** – apartado 5.2.1), que presentaba un amplio desplazamiento Stokes acompañado de una pérdida significativa de energía (el máximo se presenta a longitudes de onda mayores).

El poco solapamiento de las bandas correspondientes a la excitación y emisión de la molécula también se presenta en las medidas en otros disolventes como etanol, 2-butanol, acetonitrilo, ciclohexano, THF o DMSO (como el observa en la **(Figura 5.12)** para acetonitrilo, DMSO y THF) poniendo de manifiesto la existencia de procesos que suponen modificaciones estructurales debidas a la solvatación e interacción con el disolvente. Las interacciones que se establecen entre la molécula y el disolvente (de tipo Van der Waals o enlaces de H) estabilizan energéticamente a la molécula, provocando cambios en su energía de solvatación, y dependerán también de su polarizabilidad y la del disolvente cuando ambos presentan momento dipolar

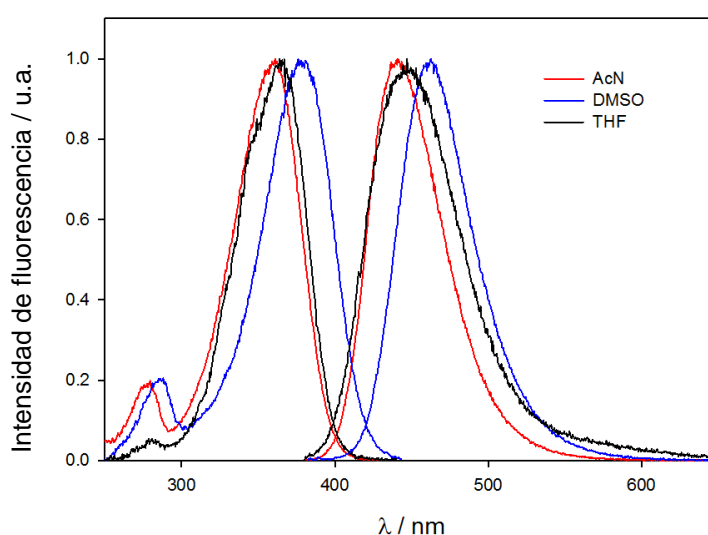


Figura 5.12. Espectros de emisión de ABTC en disolventes apróticos (acetonitrilo, DMSO y THF).

Con el fin de analizar el comportamiento en más disolventes se registran sus espectros de excitación y emisión. A pesar de que el espectro de emisión (**Figura 5.13**) aparece siempre a longitudes de onda mayores que el de excitación, la interacción con el disolvente puede desplazarlo a longitudes de onda todavía mayores, siendo esta situación conocida como desplazamiento solvatocrómico. Esto se debe a que, después de la excitación, el disolvente sufre una relajación que lo lleva a alcanzar un estado de energía libre mínima, que será menor cuanto mayor sea su polaridad. Esta reorientación de los dipolos de los disolventes polares tiene como consecuencia una estabilización del estado excitado de la molécula, provocando un descenso de su energía. Por el contrario, los disolventes apolares tienen un momento dipolar nulo ($\mu = 0$), con lo que no hay dipolos que se reorienten alrededor del fluoróforo en estado excitado.

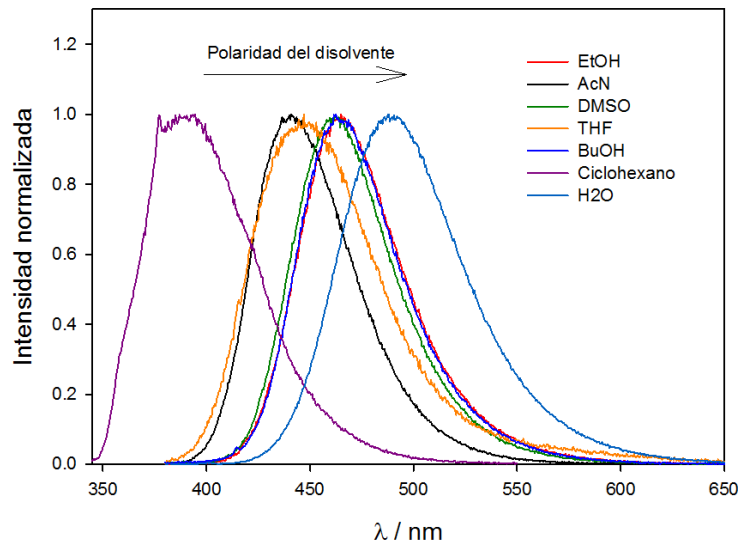


Figura 5.13. Espectros de emisión de ABTC en varios disolventes (agua, etanol, 2-butanol, ciclohexano, acetonitrilo, DMSO y THF).

Un análisis preliminar de los espectros de la (**Figura 5.13**) pone de manifiesto la existencia de solvatocromismo positivo (batocromismo), al desplazarse las bandas a longitudes de onda mayores en respuesta a un aumento de la polaridad del disolvente. El análisis continúa aplicando la ecuación de *Lippert-Mataga* (**Ec 11**), que cuantifica, por medio del desplazamiento espectral, la pérdida de energía vibracional de la molécula en disolventes apróticos (aquellos incapaces de formar enlace de H).

$$\tilde{\nu}_a - \tilde{\nu}_e = \frac{2 \Delta f}{h \cdot c \cdot a^3} (\mu_e - \mu_g)^2 \quad (\text{Ec 11})$$

(Siendo $\bar{\nu}_a$ y $\bar{\nu}_e$, los máximos, en número de onda, de los espectros de excitación y emisión; μ_e y μ_g los momentos dipolares de los estados excitado y fundamental, Δf la polarizabilidad de orientación (mayor cuánto más polar sea el disolvente), h la constante de Planck, c la velocidad de la luz y a el radio de la cavidad que alberga el soluto)^{6,7}.

Este modelo considera al fluoróforo como un dipolo situado en un medio de constante dieléctrica continua, sin incluir otras interacciones químicas que afectan a la emisión de la molécula. Esto explica la detección de desviaciones de la teoría general en casos que incluyan, por ejemplo, la formación de enlaces de H. En la ecuación de *Lippert-Mataga* se cuantifica el cambio en la magnitud del momento dipolar de transferencia de

carga con la excitación. Este parámetro es relevante debido a que un cambio en la densidad electrónica de una molécula implica un cambio en su momento dipolar, haciendo que el momento dipolar de una molécula en estado excitado pueda diferir del valor en estado fundamental, siendo habitualmente mayor ($\mu_e > \mu_g$).

Cuando la representación gráfica de Δf frente a $\bar{\nu}_a - \bar{\nu}_e$ (**Figura 5.14**) no refleja un comportamiento lineal, si no que la linealidad se observa considerando por separado en dos series a los disolventes próticos y los apróticos, se corrobora la existencia de interacciones específicas entre el soluto y el disolvente, como podrían ser enlaces de H. Por este motivo los disolventes apróticos presentan habitualmente un comportamiento lineal². En el caso que se estudia, al estar la no linealidad motivada por las medidas en alcoholes, se confirma que el cambio estructural y energético está relacionado con la capacidad de estos disolventes de formar enlace de H y no con otros fenómenos, como la transferencia intramolecular de carga. Se podrá obtener información acerca de la dinámica específica de solvatación del ABTC en alcoholes mediante la realización de medidas de fluorescencia resuelta en el tiempo, que se discutirá en el apartado 5.3.

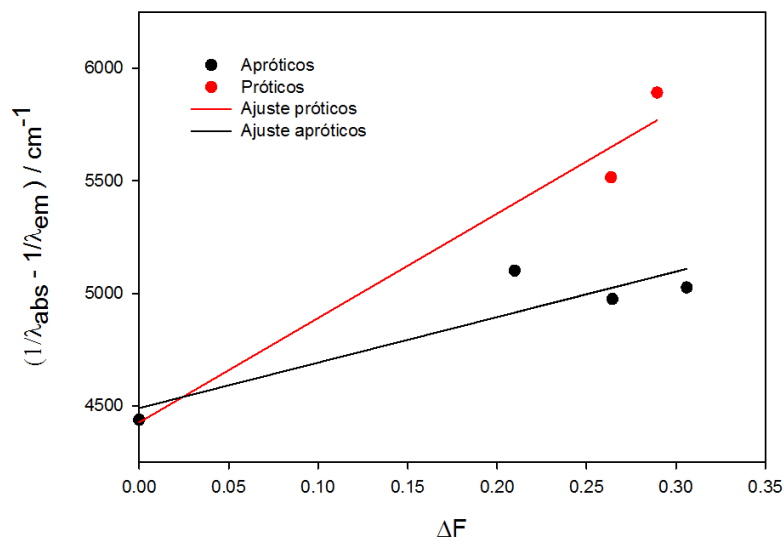


Figura 5.14. Representación de la ecuación de Lippert-Mataga para el ABTC en varios disolventes próticos (etanol y butanol, utilizando el ciclohexano como valor en el origen) y apróticos (ciclohexano, acetonitrilo, DMSO y THF), siendo el valor encima del eje y el correspondiente al ciclohexano, por tener $\Delta f = 0$. Los valores experimentales se representan como puntos y el ajuste como una línea, siendo $R^2 = 0,9709$ para los disolventes próticos y $R^2 = 0,8279$ para los apróticos.

5.3 Tiempos de vida y fluorescencia resuelta en el tiempo

5.3.1 Medida de tiempos de vida de fluorescencia

Como parte final del estudio de caracterización de la molécula de ABTC se llevan a cabo las medidas de tiempos de vida de fluorescencia. Una primera aproximación analiza el comportamiento de la molécula en H₂O y etanol, aunque la viscosidad de estos disolventes es tan baja que la velocidad del proceso de solvatación es excesivamente rápida. Para resolver este problema se elige un disolvente viscoso, el 1-Butanol, y se registra la evolución temporal de la intensidad de fluorescencia del ABTC en un rango de longitudes de onda situadas entre los 400 y los 600 nm (**Figura 5.15**).

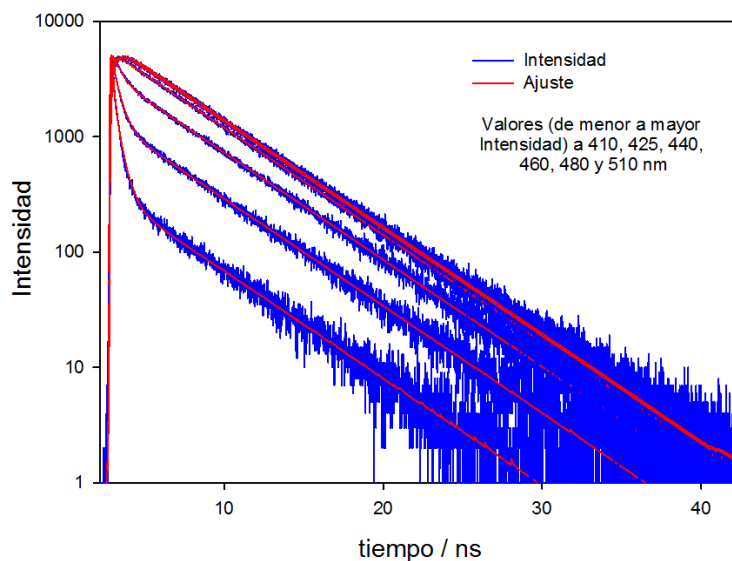


Figura 5.15. Decaimiento de la fluorescencia para ABTC en 1-Butanol, representando en azul los datos experimentales y en rojo los resultados del ajuste utilizado (los residuos ponderados para esta medida están disponibles en el anexo).

Los datos experimentales obtenidos presentan un comportamiento multiexponencial que evidencia una cinética compleja; un ajuste matemático permite expresar el decaimiento de la señal de fluorescencia como el sumatorio de tres funciones exponenciales (**Ec 12**). La función propuesta (representada como una línea roja en la **Figura 5.15**) genera valores que representan adecuadamente la realidad, al coincidir con los obtenidos experimentalmente, y se obtienen también los valores de tiempos de vida (τ_i) (**Tabla 5.5**) y los factores preexponenciales (a_i).

$$F(t, \lambda) = \sum_{i=1}^3 \alpha_i(\lambda) \cdot e^{-t/\tau_i} \quad (\text{Ec 12})$$

Tabla 5.5. Valores de tiempo de vida τ_1 , τ_2 y τ_3 para el ABTC en 1-Butanol.

τ_1 / ns	τ_2 / ns	τ_3 / ns
0,0977	0,4495	4,6379

El ajuste a la suma de tres funciones exponenciales prosigue cuantificando la contribución de cada una de ellas por medio de un análisis de sus amplitudes. Los valores obtenidos experimentalmente cada 5 nm en un rango entre los 410 y los 515 nm han de dividirse por el tiempo de medida para poder ser comparables (**Figura 5.16**). Esto se debe a que las mediciones de los decaimientos a cada longitud de onda se llevan a cabo hasta que el valor máximo alcanza las 5000 cuentas, lo que requiere un tiempo de adquisición diferente para cada una. Por el contrario, cuando se registra un espectro de fluorescencia en estado estacionario, el tiempo de adquisición a cada λ es constante.

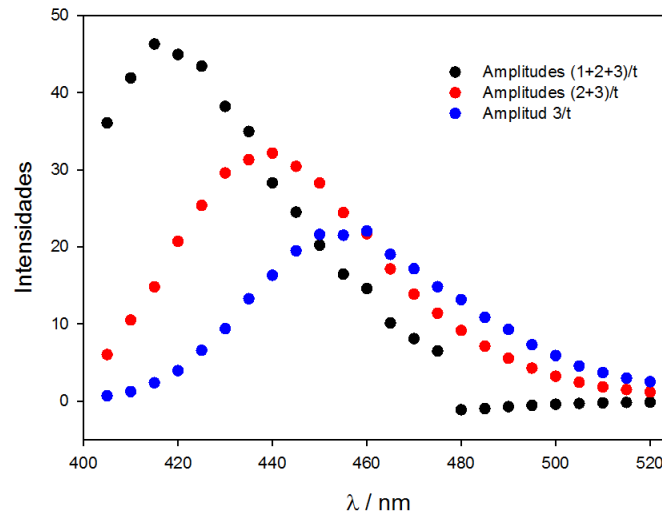


Figura 5.16. Contribución de las exponenciales propuestas de acuerdo con el modelo de ajuste, correspondiendo la serie en negro al espectro de la molécula (suma de las tres exponenciales), y las serie en rojo y azul a espectros correspondientes a la suma de la segunda y la tercera exponencial y a la tercera exponencial respectivamente. Se incluye una tabla con los valores representados en el anexo.

Persiguiendo evidenciar que el modelo propuesto representa la realidad, se grafican los decaimientos de fluorescencia experimentales junto con los valores predichos de las contribuciones de las tres exponenciales y la suma de las mismas a varias longitudes de onda (**Figura 5.17**). El hecho de que sea necesaria una función triexponencial para ajustar los datos experimentales de fluorescencia pone de manifiesto que el modelo de solvatación presenta una cinética compleja. Sin embargo, es posible obtener más información del modelo de solvatación a partir de los espectros resueltos en el tiempo.

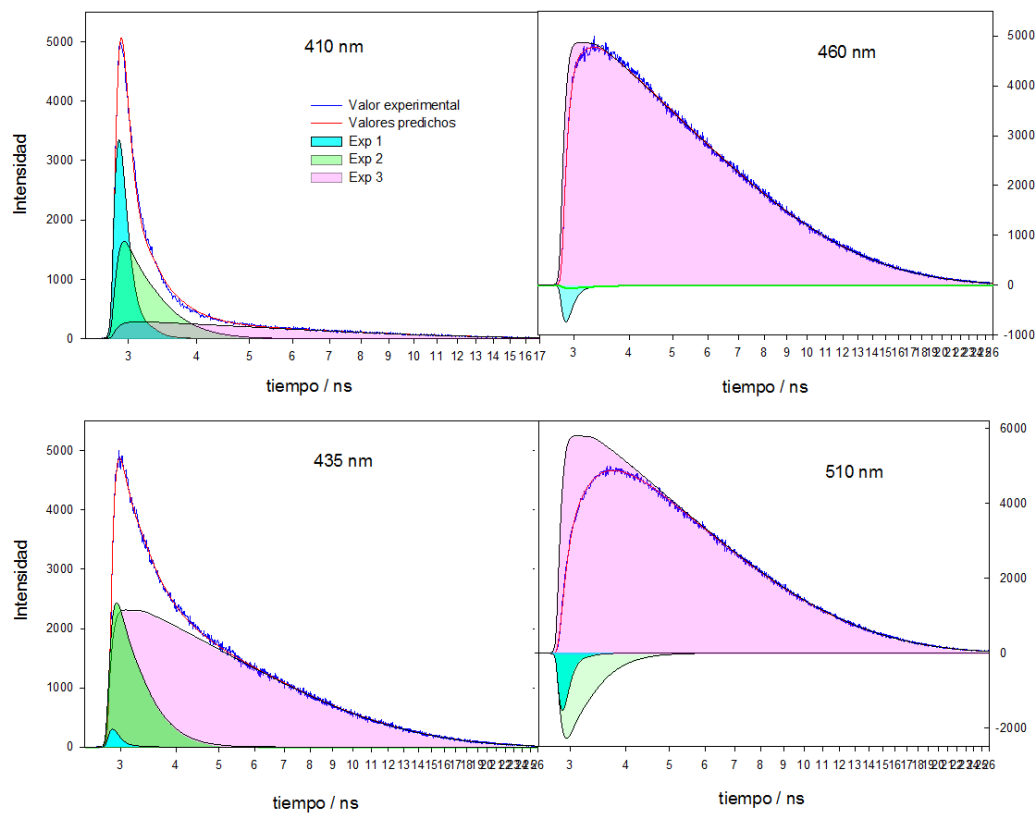


Figura 5.17. Contribución de las exponenciales a varias longitudes de onda, siendo la línea azul los valores experimentales, la línea roja los valores predichos según el modelo de ajuste y las áreas coloreadas en azul, verde y rosa las correspondientes a las exponenciales 1, 2 y 3 respectivamente.

5.3.2 Espectros resueltos en el tiempo (TRES)

Realizadas las primeras aproximaciones de ajuste a los datos experimentales obtenidos, se prosigue planteando un modelo que los represente adecuadamente, con la finalidad de analizar en profundidad y con detalle el transcurso de los procesos que tienen

lugar por medio de la evolución de los espectros. Para este fin se generan los espectros resueltos en el tiempo o *TRES* (*Time Resolved Emission Spectra*) (**Figura 5.18**) a partir de los valores discretos obtenidos experimentalmente. Una vez obtenidos los espectros con datos cada 5 nm se generan los espectros en el intervalo completo de longitudes de onda por medio de una función logaritmo normal (**Ec 13**).

$$I(\tilde{\nu}) = f_0 \cdot \exp \left[-\ln 2 \cdot \frac{\ln \left(1 + \frac{2b \cdot (\tilde{\nu} - \tilde{\nu}_0)^2}{\Delta} \right)}{b} \right] \quad (\text{Ec 13})$$

(Siendo f_0 la intensidad de fluorescencia máxima, $\tilde{\nu}_0$ la posición del máximo de emisión (en cm^{-1}), Δ la anchura media de la banda y b el parámetro de asimetría).

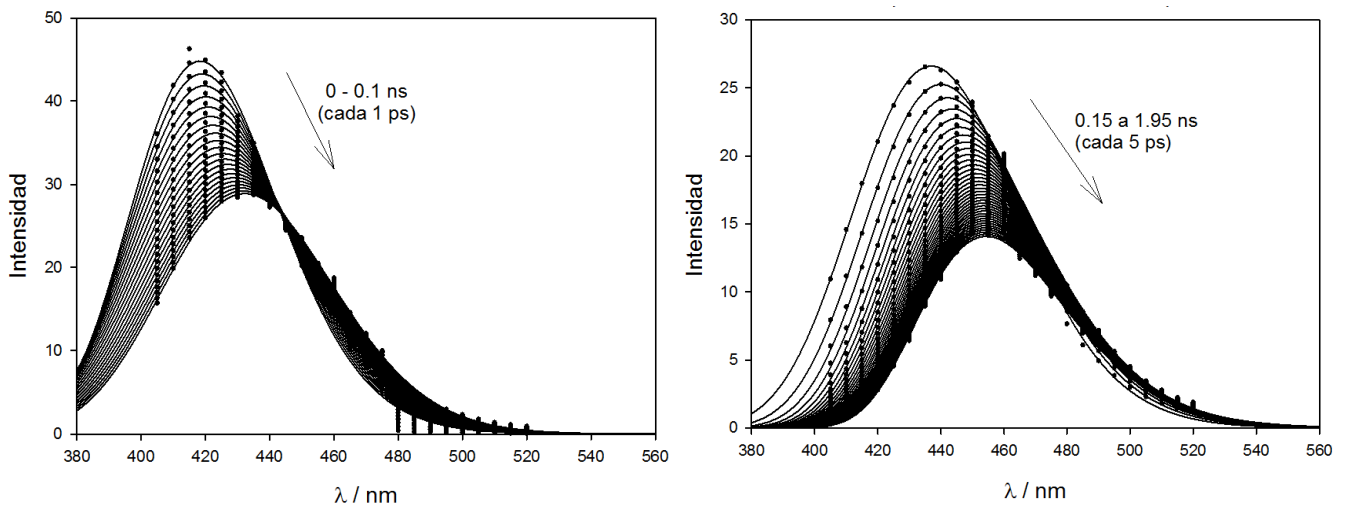


Figura 5.18. Espectros resueltos en el tiempo en dos series (de 0 a 0,1 ns cada 1 ps y de 0,15 a 1,95 ns cada 5 ps). Los valores discretos obtenidos experimentalmente se representan como puntos, y el ajuste a una función logarítmica como líneas

Los valores de f_0 y $\tilde{\nu}_0$ se obtienen de los espectros experimentales; el ajuste de la (**Ec 13**) a esos datos conduce a los espectros de la (**Figura 5.18**). La existencia de dos puntos isoemisivos (en los que los espectros presentan la misma intensidad) pone de manifiesto la interconversión de unas especies en otras y descarta que el proceso que tiene lugar se deba únicamente al desplazamiento espectral con el tiempo, es decir, al cambio de la posición del máximo, de acuerdo con un proceso análogo al que se observa en la

figura inferior (**Figura 5.19**). Este análisis pone de manifiesto la hipótesis de que los espectros representen un mecanismo de evolución de especies.

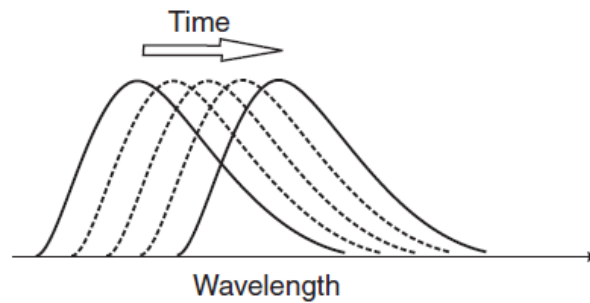


Figura 5.19. Evolución de la posición del máximo cuando los espectros únicamente se desplazan a longitudes de onda mayores con el tiempo (figura tomada de la bibliografía).¹

Para confirmar esta hipótesis se estudia la evolución de la posición del máximo en nm y cm^{-1} (**Figura 5.20**), lo que revela su ajuste (siendo la posición del máximo el valor de la función, f , y el tiempo en ns el parámetro x) a una función biexponencial (**Ec 14**). De este ajuste se obtienen tanto los valores de los parámetros de la ecuación como los tiempos de vida de la molécula en 1-butanol (**Tabla 5.6**), que resultan ser equiparables a los que se presentan en estudios bibliográficos como el de Maroncelli³⁴.

$$f = A + B \cdot e^{-x/\tau_1} + C \cdot e^{-x/\tau_2} \quad (\text{Ec 14})$$

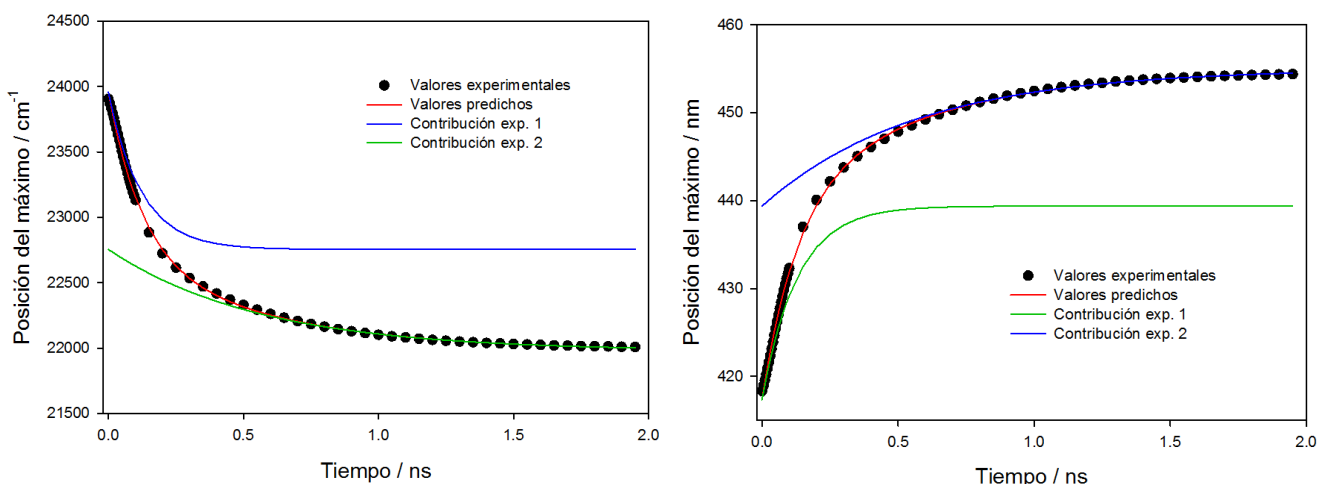


Figura 5.20. Evolución de la posición del máximo en cm^{-1} (izquierda) y nm (derecha), y contribución de las dos funciones exponenciales que las constituyen (exp1 en verde y exp2 en azul).

Tabla 5.6. Posición de los máximos de la función logarítmica que representa las amplitudes y separación entre ellos, en nm y cm^{-1} .

	A	B	C	τ_1 / ns	τ_2 / ns
Valor / nm	454.9983	- 22.0296	- 15.6219	0.1269	0.5652
Valor / cm^{-1}	21977.9943	1202.2593	776.4917	0.1213	0.5595

Este análisis también revela los valores esperados de la posición de los máximos en el modelo de especies que se estudiará posteriormente (**Tabla 5.7**).

Tabla 5.7. Posición de los máximos obtenida del ajuste de la evolución de la posición del máximo a una función logarítmica, y separación entre ellos, en nm y cm^{-1} .

	Máx. 1	Máx. 2	Máx. 3		Máx 1-2	Máx 2-3
f / nm	417	439	454	$\Delta f / \text{nm}$	22	15
f / cm^{-1}	23956	22754	22001	$\Delta f / \text{cm}^{-1}$	1202	753

La posibilidad de ajuste de los datos a un modelo en el que intervienen especies que evolucionan en el tiempo se analiza asimismo por medio del seguimiento de otros parámetros obtenidos en el ajuste a la función logaritmo normal. La evolución de la anchura media del espectro (FWHM) (**Figura 5.21**) también respalda esta hipótesis; al no configurarse como una función continuamente creciente ni decreciente (presenta un hombro que revela su ajuste biexponencial) se pone de manifiesto que el proceso no responde únicamente a la evolución espectral con el tiempo. También se detalla la evolución de la anchura media del espectro durante los cien primeros ps (correspondientes a τ_1), con la finalidad de poder observar el tiempo de relajación del 1-Butanol. La evolución de la anchura media del espectro obtenida se ve reflejada, en última instancia, representando funciones gaussianas teóricas correspondientes con un modelo de evolución de dos especies (**Figura 5.22**), a diferencia de lo que sucedía cuando la evolución temporal de los espectros se debía únicamente a su desplazamiento a λ mayores.

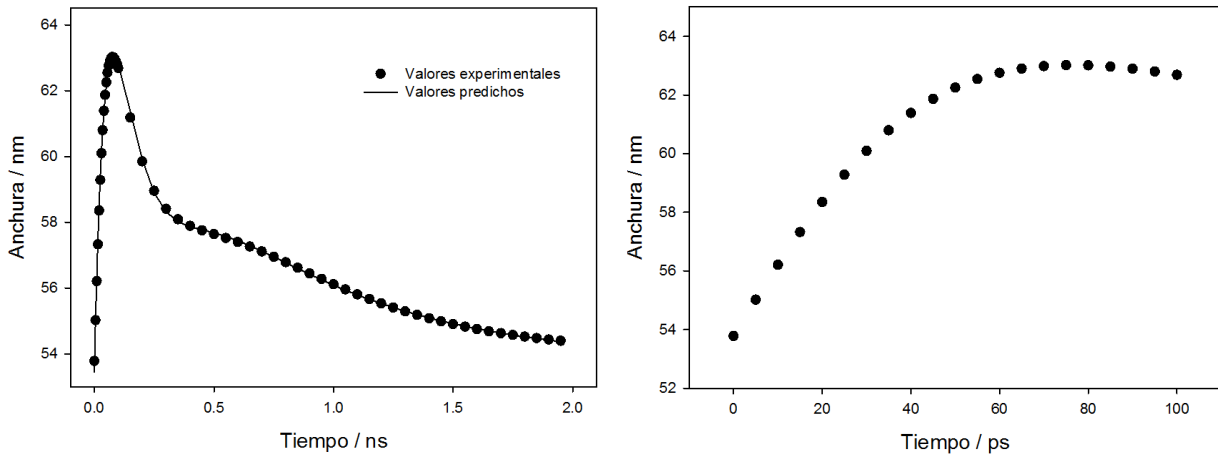


Figura 5.21. Evolución de la anchura media del espectro (Δ) a lo largo de 2 ns (figura izquierda) y detalle a 100 ps (figura derecha).

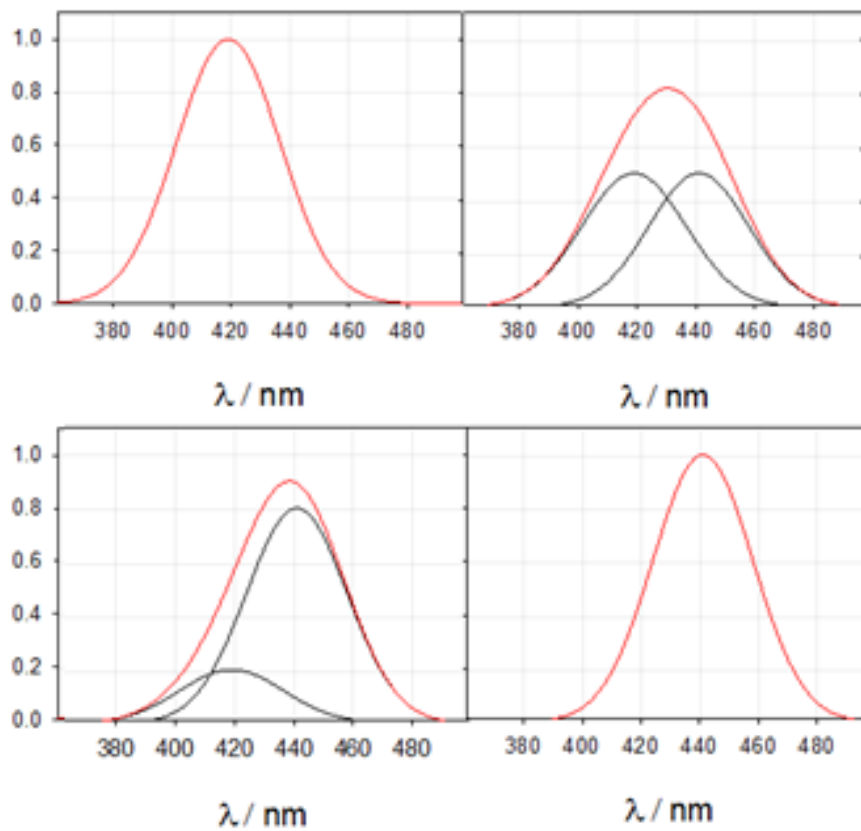
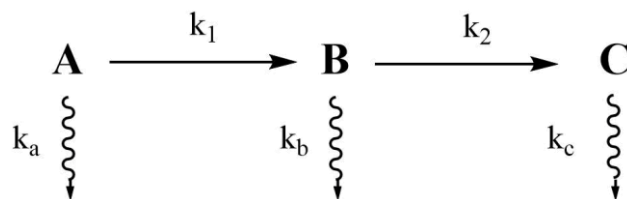


Figura 5.22. Funciones gaussianas concordantes con el modelo de especies que se postula, analizando su evolución en el tiempo; en el momento inicial solo está presente la primera especie (máximo a 417 nm), que a medida que avanza el tiempo desaparece dando lugar a la segunda (máximo a 439 nm).

5.3.3 Ajuste a un modelo de tres especies

Como parte final del estudio y corroborado por las variaciones de la anchura del espectro final, la posición e intensidad del máximo, los análisis previos en las condiciones concretas de viscosidad de 1-BuOH permiten postular un mecanismo de reacción basado en un proceso de solvatación (**Figura 5.23**). En este mecanismo intervienen tres especies que evolucionan en el tiempo, cada una de las cuales tiene un tiempo de vida y una disponibilidad regida por procesos de aparición y desaparición que se procede a analizar.

Figura 5.23. Modelo de evolución de especies propuesto para ABTC en 1-Butanol.



El modelo propone a **A** como la molécula en el momento inicial, **B** como la molécula solvatada (rotando en el interior de la esfera de butanol) y **C** como la molécula que ya ha adoptado su conformación energética más estable (tras haber establecido las interacciones específicas de tipo enlace de H con el disolvente). Los dos puntos isoemisivos presentes en los espectros resueltos en el tiempo representan, por tanto la evolución entre estas especies, el paso de $A \rightarrow B$ y de $B \rightarrow C$. El estudio prosigue describiendo la contribución de cada una de ellas según los procesos de aparición y desactivación que experimentan, lo que se puede expresar conjuntamente de forma matricial (**Ec 15**), dando lugar a una suma de exponenciales (**Tabla 5.8**). A partir de estas expresiones y a través de un proceso de tratamiento de datos utilizando el software MATLAB se obtienen los valores de los términos preexponenciales (**Tabla 5.9**).

$$\frac{d}{dt} \begin{pmatrix} A \\ B \\ C \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} k_1 + k_a & 0 & 0 \\ -k_1 & k_2 + k_b & 0 \\ 0 & -k_2 & k_c \end{pmatrix} \begin{pmatrix} A \\ B \\ C \end{pmatrix} \quad (\text{Ec 15})$$

Tabla 5.8. Exponenciales correspondientes a las especies de ABTC en 1-Butanol.

$\frac{A}{A_0} = e^{-t/\tau_1}$
$\frac{B}{A_0} = b \cdot (e^{-t/\tau_2} - e^{-t/\tau_1})$
$\frac{C}{A_0} = c_1 \cdot e^{-t/\tau_3} - c_2 \cdot e^{-t/\tau_2} + c_3 \cdot e^{-t/\tau_1}$

Tabla 5.9. Valores de los términos preexponenciales de las especies del ABTC en 1-Butanol.

b	c_1	c_2	c_3
1,1529	0,9217	1,1529	0,2312

Con esto se propone una correspondencia entre el mecanismo cinético del modelo de especies y estos términos preexponenciales. Sabiendo que en el instante inicial solo está presente la especie A, a medida que avanza el tiempo aparecen B y C de acuerdo con un proceso biexponencial y triexponencial respectivamente, lo que se refleja en sus ecuaciones de desaparición (**Tabla 5.10**).

Tabla 5.10. Modelo propuesto de evolución de las especies del ABTC en 1-Butanol.

$\frac{A}{A_0}(t) = e^{-t/\tau_1}$		
$\frac{B}{A_0}(t) = \frac{k_1}{\frac{1}{\tau_1} - \frac{1}{\tau_2}} \left(e^{-t/\tau_2} - e^{-t/\tau_1} \right)$		
$\frac{C}{A_0}(t) = \frac{k_1 \cdot k_2}{\frac{1}{\tau_1} - \frac{1}{\tau_2}} \left(\frac{-e^{-t/\tau_1}}{\frac{1}{\tau_1} - \frac{1}{\tau_3}} + \frac{e^{-t/\tau_2}}{\frac{1}{\tau_2} - \frac{1}{\tau_3}} + \frac{e^{-t/\tau_3}}{\left(\frac{1}{\tau_2} - \frac{1}{\tau_3}\right) - \left(\frac{1}{\tau_1} - \frac{1}{\tau_3}\right)} \right)$		
$\tau_1 = \frac{1}{k_1 + k_a}$	$\tau_2 = \frac{1}{k_b + k_2}$	$\tau_3 = \frac{1}{k_c}$

De acuerdo con el modelo propuesto, se generan las amplitudes correspondientes a las tres especies (**Figura 5.24**) aplicando la (**Ec 16**). La posición de los máximos obtenidos (**Tabla 5.11**) coincide con la del análisis previo de la evolución del máximo (**Tabla 5.7**).

$$F(\lambda, t) = \sum_{i=1}^3 F_i(t) \cdot E_i(\lambda) \quad (\text{Ec 16})$$

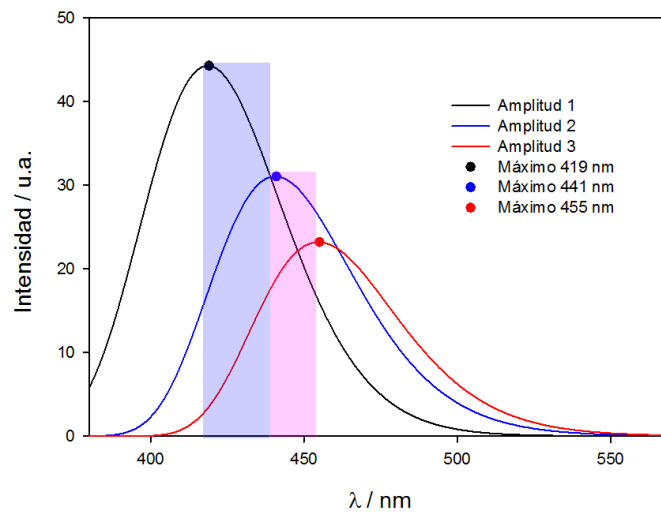


Figura 5.24. Representación de las amplitudes de las tres especies (A en negro, B en azul y C en rojo). Los máximos obtenidos del modelo de ajuste de especies se representan con puntos, y su comparativa con los valores generados del análisis de la posición del máximo se representa con las superficies coloreadas en azul y rosado.

Tabla 5.11. Valores de la posición del máximo de acuerdo con el ajuste de las amplitudes de las especies propuestas a una función logarítmica.

λ Máximo 1 / nm	λ Máximo 2 / nm	λ Máximo 3 / nm
419	441	455

Posteriormente se obtienen las constantes de velocidad de acuerdo con el modelo de especies (**Tabla 5.12**), donde se aprecia que los valores para las constantes k_a y k_b son notablemente inferiores a las de los procesos de evolución entre especies: $A \rightarrow B$ (k_1) y

$B \rightarrow C$ (k_2), con lo que se pone de manifiesto que la evolución de los espectros se debe fundamentalmente a la evolución entre especies, y no a sus procesos de desactivación. Este análisis también corrobora que la molécula de ABTC sufre una ICT que causa una redistribución de su densidad electrónica en estado excitado, provocando una reorganización del disolvente en torno al campo eléctrico que genera. Esta rotación dura el equivalente a τ_2 , 500 ps, tras los cuales la molécula establece la interacción específica con el 1-BuOH por medio de un enlace de H. Una vez que se encuentra en equilibrio con el disolvente, se desactiva de acuerdo con un tiempo de vida $\tau_3 = 4,6379$ ns (**Tabla 5.5**).

Tabla 5.12. Valores de las constantes de evolución de las especies de ABTC en 1-Butanol.

k_a / ns^{-1}	k_b / ns^{-1}	k_1 / ns^{-1}	k_2 / ns^{-1}	k_c / ns^{-1}
1	0,21560(10)	9,24(17)	2,009(19)	0,21560(10)

La comprobación final de la validez de este modelo se obtiene representando los espectros correspondientes a los valores predichos de las contribuciones de las tres especies a varias longitudes de onda, con lo que se observa que coinciden con los valores obtenidos experimentalmente (**Figura 5.25**). Finalmente, la integral $F(t)$ (**Ec 17**) de cada especie representa adecuadamente la cantidad de radiación que emite, es decir, su contribución al espectro de fluorescencia en estado estacionario (**Figura 5.26**).

$$\int_0^{\infty} F_i(t) dt \quad (\text{Ec 17})$$

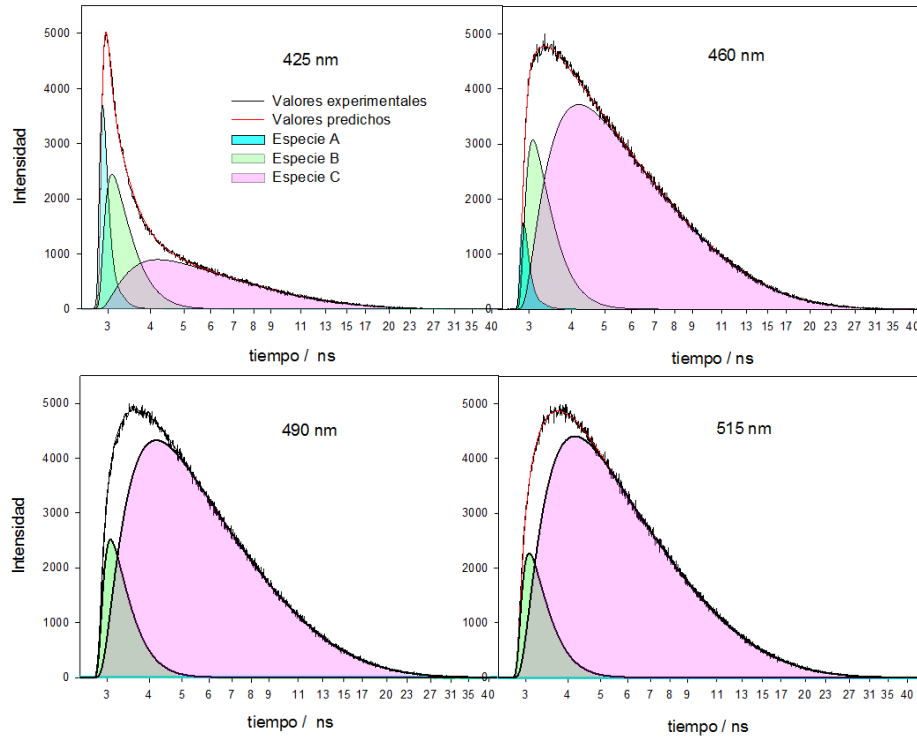


Figura 5.25. Contribución de las tres especies a varias longitudes de onda, siendo la línea negra los valores experimentales, la línea roja los valores predichos según el modelo de ajuste y las áreas coloreadas en azul, verde y rosado las correspondientes a las contribuciones de las especies A, B y C respectivamente.

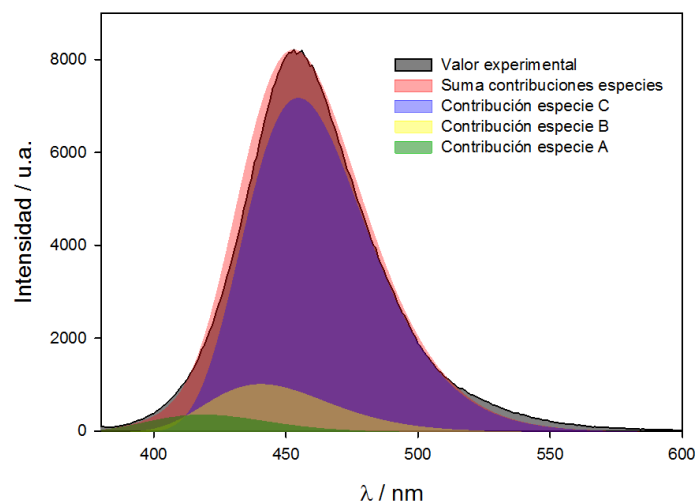


Figura 5.26. Representación de la intensidad de fluorescencia experimental (superficie gris) y la obtenida a partir del modelo (superficie roja), con la contribución de las tres especies (especie A en verde, B en rosa y C en azul).

6. CONCLUSIONES

En este trabajo se ha analizado el comportamiento fisicoquímico del 6-amino-1,3-benzotiazol-2-carbonitrilo (**ABTC**) en diferentes disolventes y condiciones de acidez, por medio de medidas de absorción UV-Vis y fluorescencia en estado estacionario y resuelta en el tiempo. Se ha estudiado su interacción con los protones presentes en el medio y la dinámica de los procesos de solvatación que experimenta. Del análisis de los resultados obtenidos se infieren las conclusiones siguientes:

- 1) En estado fundamental, la molécula de ABTC permanece en forma neutra (**N**) en medio acuoso y en medio de basicidad creciente, mientras que en medio ácido se protona en el grupo amino dando lugar a la especie catiónica **CA**, que presenta una constante de disociación ácida $K_a = 0,00888(26) \text{ M}$ ($\text{p}K_a = 2,051(29)$).
- 2) En estado excitado, **CA*** presenta un $\text{p}K_a^* = -11,7$ (es una especie mucho más ácida que CA), con lo que se disocia dando lugar a **N*** (única especie emisora).
- 3) La interacción con los protones persiste, sin embargo, en estado excitado, al experimentar la forma neutra de la molécula de ABTC una transferencia intramolecular de carga fotoinducida (ICT) que la lleva a protonarse en el átomo de N benzotiazólico, dando lugar a la especie catiónica **CB*** (no emisora).
- 4) En estado excitado, los protones presentes en el medio se configuran como quencher, dando lugar un proceso de quenching dinámico (que ocurre simultáneamente al quenching estático) que provoca un descenso significativo en la señal de fluorescencia, regido por una constante $k_q = 4,49 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.
- 5) En cuanto a la interacción con el medio, la especie **N** presenta una elevada sensibilidad a la polaridad de los disolventes en los que se encuentra, como consecuencia del incremento de momento dipolar que experimenta en estado excitado.
- 6) Se determina que la molécula de ABTC presenta solvatocromismo positivo (batocromismo), al desplazarse el espectro hacia λ mayores en respuesta a un aumento de la polaridad. También se confirma la formación de enlaces de H con disolventes próticos.

- 7) Finalmente, el seguimiento de su proceso de solvatación en 1-BuOH revela un modelo constituido por tres especies que evolucionan en el tiempo: **A** (molécula en el momento inicial), **B** (molécula solvatada rotando en la esfera de disolvente) y **C** (producto final, molécula solvatada después de haber establecido interacciones específicas – enlace de H – con el disolvente).
- 8) El análisis de las constantes cinéticas que rigen el mecanismo evidencia que los procesos de evolución $A \rightarrow B$ y $B \rightarrow C$ son mucho más rápidos que los procesos de desactivación de las propias especies, de acuerdo con tiempos $\tau_A = 0,0977$ ns y $\tau_B = 0,4495$ ns, mientras que la especie C tiene un tiempo de vida $\tau_C = 4,6379$ ns.

Neste traballo analizouse o comportamento fisicoquímico do 6-amino-1,3-benzotiazol-2-carbonitrilo (**ABTC**) en diferentes disolventes e condicións de acidez, por medio de medidas de absorción UV-Vis e fluorescencia en estado estacionario e resolta no tempo. Analizouse a súa interacción cos protóns presentes no medio así como a dinámica dos procesos de solvatación que experimenta. Da análise dos resultados obtidos obtéñense as conclusións seguintes:

- 1) En estado fundamental, a molécula de ABTC permanece en forma neutra (**N**) en medio acuoso e en medio de basicidade crecente, mentres que en medio ácido se protona no grupo amino dando lugar á especie catiónica **CA**, que presenta unha constante de disociación ácida $K_a = 0.00888(26)$ M (**pK_a = 2,051(29)**).
- 2) En estado excitado, **CA*** presenta un **pK_a* = -11,7** (é unha especie moito máis ácida que CA), co que se disocia dando lugar a **N*** (única especie emisora).
- 3) A interacción cos protóns persiste, sen embargo, en estado excitado; a forma neutra da molécula de ABTC experimenta unha transferencia intramolecular de carga fotoinducida (ICT), que a leva a protonarse no átomo de N benzotiazólico, dando lugar á especie catiónica **CB*** (non emisora).
- 4) En estado excitado, os protóns presentes no medio actúan como quencher, dando lugar a un proceso de quenching dinámico (que ocorre simultaneamente ó

quenching estático) o que provoca un descenso significativo no sinal de fluorescencia, de acordo con unha constante $k_q = 4,49 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

- 5) En canto á interacción co medio, a especie **N** presenta unha elevada sensibilidade á polaridade dos disolventes nos que se atopa, como consecuencia do incremento de momento dipolar que experimenta en estado excitado.
- 6) Determínase que a molécula de ABTC presenta solvatocromismo positivo (batocromismo), ó desprazarse o espectro cara a lonxitudes de onda maiores en resposta a un aumento da polaridade. Tamén se confirma a formación de enlaces de H con disolventes próticos.
- 7) Finalmente, o seguimento do seu proceso de solvatación en 1-BuOH revela un modelo constituído por tres especies que evolucionan no tempo: **A** (molécula no momento inicial), **B** (molécula solvatada rotando na esfera de disolvente) e **C** (produto final, a molécula solvatada logo de ter establecido interaccións específicas de tipo enlace de H co disolvente).
- 8) A análise das constantes cinéticas que rexen o mecanismo evidencia que os procesos de evolución $A \rightarrow B$ y $B \rightarrow C$ son moito máis rápidos que os procesos de desactivación das propias especies, de acordo con tempos $\tau_A = 0,0977 \text{ ns}$ e $\tau_B = 0,4495 \text{ ns}$, mentres que a especie **C** ten un tempo de vida $\tau_C = 4,6379 \text{ ns}$.

In this work, the physiochemical behaviour of 6-amino-2-benzothiazolecarbonitrile (**ABTC**) has been studied in different solvents and pH conditions, by means of UV-Vis absorption and steady-state and time-resolved fluorescence spectroscopy measurements. Its interaction with protons and the dynamics of solvation processes it undergoes have also been studied thoroughly. Through the discussion of the results the following conclusions have been reached:

- 1) ABTC molecule remains in the neutral form (**N**) in excited state, in neutral aqueous solution and increasingly basic media. However, in acidic media, it undergoes protonation in the amino group, yielding the cationic form **CA**, which shows an acid dissociation constant $K_a = 0.00888(26) \text{ M}$ ($\text{p}K_a = 2,051(29)$).

- 2) In excited state **CA*** shows a $\text{pK}_a^* = -11,7$ (**CA*** is significantly more acidic than **CA**), and it dissociates, consequently, yielding **N*** (the only emitting species).
- 3) Nevertheless, **ABTC** still interacts with protons in excited state; neutral form of **ABTC**, **N**, goes through an intramolecular charge transfer (**ICT**) process, which allows its protonation on the benzothiazolic **N**, returning cationic species **CB*** (non-emitting).
- 4) Protons available in excited state act as a quencher, inducing a dynamic quenching process (which takes place simultaneously to a static quenching process). These conditions cause a significant decline in the fluorescence signal, according to a constant $k_q = 4,49 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.
- 5) In terms of the interactions with media, **ABTC** molecule shows a remarkable sensitivity towards solvents' polarity, as a consequence of the increase in the dipole moment it experiences in excited state.
- 6) Our studies reveal **ABTC** shows positive solvatochromism (batocromism), as the spectra is shifted towards higher wavelengths in response of an increase in polarity. H bonding with protic solvents is also observed.
- 7) Lastly, **ABTC**'s solvation process is followed using 1-BuOH as a solvent. This study reveals a model shaped by time evolution of three different species: **A** (**ABTC** in the initial moment), **B** (solvated molecule rotating in its solvation shell) and finally **C** (final product, solvated molecule having established specific interactions – H bonding – with solvent).
- 8) Further analysis of the kinetic constants that regulate this mechanism reveals that evolution processes from **A**→**B** and **B**→**C** are way faster than the species' itself deactivating processes, according to times $\tau_A = 0,0977 \text{ ns}$ and $\tau_B = 0,4495 \text{ ns}$. Meanwhile, **C** species shows a deactivation lifetime $\tau_C = 4,6379 \text{ ns}$.

7. BIBLIOGRAFÍA

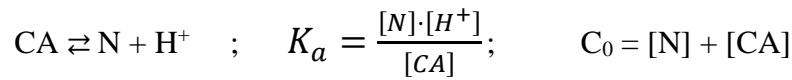
1. Valeur, B.; Berberan-Santos, M. N. 2012. *Molecular Fluorescence. Principles and Applications*. 2^a ed., Wiley-Vch, Alemania.
2. Lakowicz, J.R. 2006. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 3^a ed., Springer. USA.
3. Schäferling, M. 2012. The art of fluorescence imaging with chemical sensors. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **51**, 3532–54.
4. Pérez-Lustres, J. L. et al. 2007. Ultrafast proton transfer to solvent: molecularity and intermediates from solvation and diffusion-controlled regimes. *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 5408–5418.
5. Kumpulainen, T.; Lang, B.; Rosspeintner, A.; Vauthey, E. 2017. Ultrafast Elementary Photochemical Processes of Organic Molecules in Liquid Solution. *Chem. Rev.*, **117(16)**, 10826-10939.
6. Lippert, E. 1955. Dipolmoment Und Elektronenstruktur Von Angeregten Molekullen. *Zeitschrift für Naturforschung A.*, **10(7)**, 541–545.
7. Mataga, N.; Kaifu, Y.; Koizumi M. 1956. Solvent Effects upon Fluorescence Spectra and the Dipole moments of Excited Molecules. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, **29(4)**, 465-470.
8. Cheng, Y.; Pu, S.; Hsu, C.; Lai, C.; Chou, P. 2006. Femtosecond dynamics on 2-(2'-hydroxy-4'-diethylaminophenyl) benzothiazole: Solvent polarity in the excited-state proton transfer. *ChemPhysChem*, **7(6)**, 1372-1381.
9. Cao, K. J. et al. 2018. Solvation-guided design of fluorescent probes for discrimination of amyloids. *Scientific Reports*, **8(1)**. Publicado online: May 3, 2018. (Consulta: Jun 24, 2019). DOI: 10.1038/s41598-018-25131-2.
10. Mishra, A. K.; Dogra, S. K. 1983. Effect of solvents and pH on the absorption and fluorescence spectra of 2-phenylbenzimidazole. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy*, **39(7)**, 609-611.
11. Liu, Z.; Zhang, C.; He, W.; Qian, F.; Yang, X.; Gao, X.; Guo, Z. 2010. A charge transfer type pH responsive fluorescent probe and its intracellular application. *New Journal of Chemistry*, **34(4)**, 656-660.
12. Yang, G.; Li, S.; Wang, S.; Hu, R.; Feng, J.; Li, Y.; Qian, Y. 2013. Novel fluorescent probes based on intramolecular charge- and proton-transfer compounds. *Pure and Applied Chemistry*, **85(7)**, 1465-1478.
13. Ríos Vázquez, S.; Pérez Lustres, J. L.; Rodríguez-Prieto, F.; Mosquera, M.; Ríos Rodríguez, M. C. 2014. Excited-State Proton and Charge Transfer in Protonated Amino and Methylated Derivatives of 2-(2'-Hydroxyphenyl) benzimidazole. *The Journal of Physical Chemistry B*, **119(6)**, 2475-2489.

14. Chipem, F. A.; Mishra, A.; Krishnamoorthy, G. 2012. The role of hydrogen bonding in excited state intramolecular charge transfer. *Physical Chemistry Chemical Physics*, **14(25)**, 8775-8790.
15. Mishra A.; Chaterjee S.; Krishnamoorthy G. 2013. Intramolecular charge transfer emission of trans-2-[4'-(dimethylamino)styryl]benzimidazole: Effect of solvent and pH. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, **260**, 50-58.
16. Loudet, A.; Burgess, K. 2007. BODIPY dyes and their derivatives: syntheses and spectroscopic properties. *Chemical reviews*, **107(11)**, 4891-4932.
17. Dsouza, R. N.; Pischel, U.; Nau, W. M. 2011. Fluorescent dyes and their supramolecular host/guest complexes with macrocycles in aqueous solution. *Chemical reviews*, **111(12)**, 7941-7980.
18. Khattab, T. A.; Allam, A. A.; Othman, S. I.; Bin-Jumah, M.; Al-Harbi, H. M.; Fouda, M. M. G. 2019. Synthesis, solvatochromic performance, pH sensing, dyeing ability, and antimicrobial activity of novel hydrazone dyestuffs. *Journal of Chemistry*. Publicado online: Feb 5, 2019. (Consulta: Jun 5, 2019). DOI: 10.1155/2019/7814179.
19. Suwattanamala, A.; Ruangpornvisuti, V. 2009. Isomeric structures of benzimidazole, benzoxazole, and benthioazole derivatives, their electronic properties and transformations. *Struct. Chem.*, **20**, 619-631.
20. Rodríguez, F.; Penedo, J. C.; Mosquera, M. 1998. Solvent control of molecular structure and excited-state proton-transfer processes of 1-methyl-2-(2'-hydroxyphenyl)-benzimidazole. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, **94**, 2775-2782.
21. Rodríguez, F.; Ríos, M. C.; Mosquera, M.; Ríos, M. A. 1994. Ground- and Excited-State Tautomerism in 2-(3'-Hydroxy-2'-pyridyl)benzimidazole. *J. Phys. Chem.*, **98**, 8666-8672.
22. Mosquera, M.; Ríos, M. C.; Rodríguez, F. 1997. Competition between Protonation and Deprotonation in the First Excited Singlet State of 2-(3'-Hydroxy-2'-pyridyl)benzimidazole in Acidic Solutions. *J. Phys. Chem.*, **101**, 2766-2772.
23. Sinha, H. K.; Dogra, S. K. 1986. Ground and excited state prototropic reactions in 2-(o-hydroxyphenyl) benzimidazole. *Chemical physics*, **102(3)**, 337-347.
24. Banwell, C. N. 1972. *Fundamentals of Molecular Spectroscopy*. 3^a ed., McGraw-Hill. London.
25. Varian. 1994. *Cary spectrophotometer systems. For the Cary 1 & Cary 3. Operation manual* (Manual de instrucciones). California.
26. Spex Industries, Inc. *Operation & maintenance instructions. Fluorolog-2* (Manual de instrucciones).
27. García, I. 2009. *Equilibrios tautoméricos e procesos de transferencia protónica fotoinducida no 2-(6'-hidroxi-2'-piridil)bencimidazol* (Tesis doctoral). Universidade de Santiago de Compostela. España.

28. Dey, J.; Dogra, S. K. 1994. Dual fluorescence of 2-[4-(dimethylamino) phenyl] benzothiazole and its benzimidazole analog: effect of solvent and pH on electronic spectra. *The Journal of Physical Chemistry*, **98(14)**, 3638-3644.
29. Lednev, I. K.; Hester, R. E.; Moore, J. N. 1997. A cation-specific, light-controlled transient chromoionophore based on a benzothiazolium styryl azacrown ether dye. *Journal of the American Chemical Society*, **119(15)**, 3456-3461.
30. Thipperudrappa, J.; Biradar, D. S.; Hanagodimath, S. M. 2007. Simultaneous presence of static and dynamic component in the fluorescence quenching of bis-MSB by CCl₄ and aniline. *Journal of Luminescence*, **124(1)**, 45-50.
31. Behera, P. K.; Mukherjee, T.; Mishra, A. K. 1995. Simultaneous presence of static and dynamic component in the fluorescence quenching for substituted naphthalene-CCl₄ system. *Journal of Luminescence*, **65(3)**, 131-136.
32. Evale B.G.; Hanagodimath S.M. 2010. Static and dynamic quenching of biologically active coumarin derivative by aniline in benzene-acetonitrile mixtures. *Journal of Luminescence*, **130(8)**, 1330-1337.
33. Airinei, A.; Tigoianu, R. I.; Rusu, E.; Dorohoi, D. O. 2011. Fluorescence quenching of anthracene by nitroaromatic compounds. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, **6(3)**, 1265-1272.
34. Horng, M. L.; Gardecki, J. A.; Papazyan, A.; Maroncelli, M. 1995. Subpicosecond measurements of polar solvation dynamics: Coumarin 153 revisited. *Journal of Physical Chemistry*, **99(48)**, 17311-17337.

ANEXOS

- *Cálculo de la constante de disociación ácida (K_a) para el catión aminio con datos de la serie de acidificación pH 4-1:*



$$[CA] = \frac{K_a \cdot C_0}{K_a + [H^+]} \quad ; \quad [N] = \frac{[H^+] \cdot C_0}{K_a + [H^+]}$$

$$A(\lambda) = \varepsilon_\lambda \cdot b \cdot c \quad ; \quad A = A(N) + A(CA)$$

$$A(\lambda, H^+) = \varepsilon_N(\lambda) \cdot b \cdot \frac{[H^+]}{K_a + [H^+]} + \varepsilon_{CA}(\lambda) \cdot b \cdot \frac{K_a}{K_a + [H^+]}$$

$$A(\lambda, H^+) = A_1(\lambda) \cdot \frac{[H^+]}{K_a + [H^+]} + A_2(\lambda) \cdot \frac{K_a}{K_a + [H^+]}$$

- *Cálculo del término de quenching estático para la molécula de ABTC:*

En el momento inicial $[N] = C_0$; a medida que avanza la protonación va disminuyendo. La intensidad de fluorescencia, F , es directamente proporcional a la concentración de N^* en estado estacionario, que viene dada por

$$[N^*]_{ss} = \frac{I_a}{k_r + k_{nr}}$$

donde la intensidad de luz absorbida (I_a) es directamente proporcional a $[N]$, por lo que el cociente entre la intensidad de fluorescencia en ausencia de H^+ (F_0), y en presencia de H^+ (F) vendrá dada por

$$\frac{F_0}{F} = \frac{C_0}{[N]} = 1 + \frac{1}{K_a} \cdot [H^+]$$

Incluyendo el término de quenching dinámico

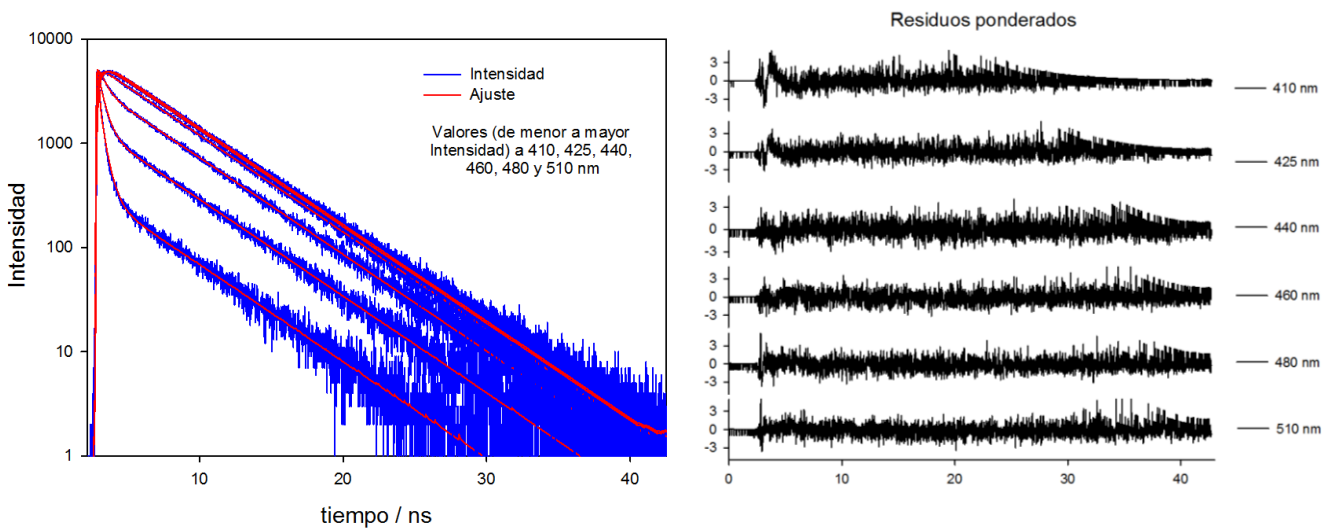
$$[N^*]_{ss} = \frac{I_a}{k_r + k_{nr} + k_q \cdot [H^+]}$$

Con lo que la expresión resulta $\frac{F_0}{F} = \frac{k_r + k_{nr} + k_q \cdot [H^+]}{k_r + k_{nr}}$

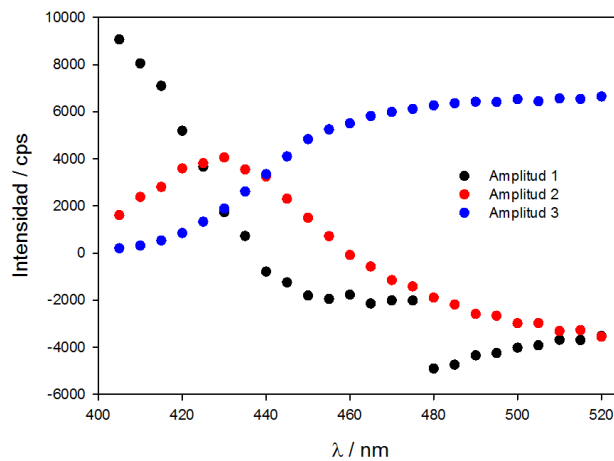
Lo que operado es igual a

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q \cdot \tau \cdot [H^+]$$

- Detalle de los residuos ponderados para decaimiento de la fluorescencia:



- Valores de la amplitud de las funciones exponenciales para la molécula de ABTC:



(Los valores representados se encuentran recogidos en la tabla siguiente)

Un análisis detallado pone de manifiesto que la contribución de la primera exponencial (e_1), que en el momento inicial era la más significativa, disminuye a medida que aumenta la longitud de onda. Por el contrario, la segunda exponencial (e_2) tiene relevancia en un intervalo intermedio de longitudes de onda, mientras que la contribución de la tercera exponencial (e_3) se postula como significativa a longitudes de onda mayores.

λ / nm	Amplitud 1	Amplitud 2	Amplitud 3
405	9060,835	1609,19	202,4983
410	8046,247	2378,386	312,144
415	7094,228	2802,708	531,4331
420	5189,553	3587,428	843,4327
425	3660,086	3808,157	1327,744
430	1735,017	4055,701	1883,427
435	722,4833	3544,38	2611,677
440	-790,232	3246,832	3347,103
445	-1248,12	2303,893	4100,052
450	-1805,19	1492,123	4830,919
455	-1948,23	715,3691	5245,123
460	-1771	-86,8679	5499,122
465	-2145,01	-574,15	5812,585
470	-2013,63	-1150,66	5984,927
475	-2019,05	-1420,43	6116,005
480	-4904,58	-1898,08	6261,536
485	-4742,85	-2185,9	6359,451
490	-4345,28	-2588,72	6421,667
495	-4252,03	-2662,82	6409,021
500	-4018,71	-2984,99	6530,557
505	-3922,38	-2978,21	6440,907
510	-3685,4	-3310,89	6562,723
515	-3695,81	-3276,62	6538,806
520	-3522,37	-3553,69	6642,786

- *Detalle de los residuos ponderados para el modelo de especies:*

