DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

INTERACCIONES POR PUENTE DE HIDRÓGENO Y REACCIONES DE TRANSFERENCIA PROTÓNICA DE LA BETACARBOLINA, 9H-PIRIDO[3,4-B]INDOL, Y DE SUS DERIVADOS N-METILADOS CON 1,1,1,3,3,3-HEXAFLUORO-2-PROPANOL EN MEDIOS APRÓTICOS

ANTONIO SÁNCHEZ CORONILLA

SEVILLA, 2006

D. Alfredo Maestre Álvarez, Director del Departamento de Química Física de la Universidad de Sevilla

CERTIFICA: que la Tesis Doctoral titulada "Interacciones por puente de hidrógeno y reacciones de transferencia protónica de la betacarbolina, 9H-pirido[3,4-b]indol, y de sus derivados N-metilados con 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol en medios apróticos" ha sido realizada en los laboratorios del Departamento de Química Física y reúne todos los requisitos exigidos a los trabajos experimentales de investigación necesarios para la obtención del Título de Doctor.

Y para que conste, expido y firmo el presente certificado en Sevilla a 20 de Octubre de 2006.

Fdo.
Director del Departamento de
Química Física

Los Directores:

Dña. Carmen Carmona Guzmán
Profesora Titular del Dpto. de
Química Física de la Univ. de Sevilla

D. Manuel Balón Almeida
Catedrático del Dpto. de Química
Física de la Universidad de Sevilla

El alumno:

D. Antonio Sánchez Coronilla.

Agradecimientos

Parece que fue ayer cuando comenzó todo, en una conversación entre Encarnita y mi padre (quien se metía conmigo por gustarme la Química-Física). Gracias a ella conocí a Don Manuel y a todos los miembros del grupo de investigación del que hoy día formo parte. Por tanto, gracias Encarnita.

Durante este tiempo de duro trabajo, mis padres y mi hermano (cuando está) son los que me han tenido que saber llevar en casa, así que, gracias. Por otro lado, paralelamente, en el laboratorio también me han tenido que saber llevar, por lo que, gracias a: Pepe, Manuel, Paco, Inma, Modesto, Chelo, Pilar, Benito, Miguel, Javier, Carmen, Markus, Reyes, Cesar, mi compañero y amigo Emilio, y a mi querida Manuela, mi primera profesora de Química-Física.

En el Departamento, hay dos personas que no debo olvidar, a quienes yo estoy agradecido, por su amistad y buen hacer para conmigo, el equipo de secretaría, y cuya labor es fundamental para el Departamento, Manuel y Chelo.

También he de agradecer al Director del Departamento, D. Alfredo Maestre, y a la Secretaria, Dña. Pilar Guardado, lo bien que me han tratado siempre.

Por supuesto, muchos son los buenos momentos pasados. De ellos, no sólo son partícipes los ya mencionados, sino también mis compañeros: Javi, Fran, Jose Manuel, Chema, Sergio, Francisco José, Miguel A., Susana, Elisa I., Elisa, Nader, Laura, Mónica, Cristina, María José, Angel, Luis, Silvia, Enrique, Nacho, Raúl, Alvaro y Alberto, Virginia, Lourdes, Esther, Sergio A., Tornero, Jaime, Antonio, Bruno, Choquito, Sandra, Cristina, Norge, Miguel Angel, Mari Carmen J., Manolo A., Jesús, Guille, Juan, Victoria, y todos los miembros de Conserjería de Farmacia.

Agradezco al Ministerio de Educación y Ciencia, DGCYT, la concesión de una beca F.P.I. asignada al proyecto BQU2002-02217.

Muchísimas gracias a D. Enrique Sánchez Marcos, por lo atento que es siempre conmigo.

Muchísimas gracias a Don Manuel, Mela y María, a quienes he tenido la suerte de ir conociendo durante estos años. Mis tutores, D. Manuel y Mela, saben o al menos eso espero, lo que los estimo y lo profundamente agradecido que les estoy por todo.

Por último, en mi memoria quedará siempre, gratamente guardado, el recuerdo de mi primer Congreso, en Coimbra (Portugal), con D. Manuel, Pilar, María y Mela.

Interacciones por puente de hidrógeno y reacciones de transferencia protónica de la betacarbolina, 9H-pirido[3,4-b]indol, y de sus derivados N-metilados con 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol en medios apróticos.

ÍNDICE

Página

1.- Introducción y Objetivos. 1

2.- Antecedentes bibliográficos y estado actual del tema. 6

3.- Experimental: 24

3.1.- Materiales. 25

3.2.- Aparatos. 29

3.3.- Métodos. 31

3.3.1.- Determinación de constantes de equilibrio. 31

3.3.2.- Medidas de pK_a. 33

3.3.3.- Deconvolución de espectros. 34

3.3.4.- Ajuste de las curvas de decaimiento de fluorescencia. 35

4.- Resultados y Discusión. 39

4.1.- Anhidrobase de la betacarbolina, BCA. 40

4.1.1.- Propiedades espectrales y fotofísicas de la BCA. 40

4.1.2.- Interacciones por puente de hidrógeno de la BCA con 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol, HFIP, en ciclohexano y tolueno. 54

4.2.- Interacciones por puente de hidrógeno y reacciones de transferencia protónica fototoinducidas, ESPT, de la N_9-metilbetacarbolina, MBC, con HFIP en ciclohexano y en mezclas ciclohexano-tolueno. 71

4.3- Propiedades espectrales de la N,N-dimetil betacarbolina, DMBC, y de su derivado 6-sulfónico, BCSA, en disoluciones acuosas de ácido sulfúrico. *95*

4.4.- Interacciones por puente de hidrógeno y reacciones ESPT de la betacarbolina, BC, con HFIP en ciclohexano y tolueno. *109*

5.- Resumen y conclusiones. *123*

6.- Referencias. *132*

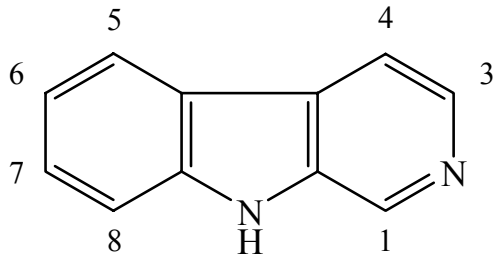
1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.

Las propiedades ácido-base de muchas moléculas orgánicas cambian drásticamente cuando se excitan por la acción de la luz. Cuando estos cambios se producen en moléculas con grupos ácidos y básicos, la combinación de las reacciones de transferencia protónica fotoinducidas puede dar lugar a fototautómeros que sólo tienen existencia en el estado excitado.

Los mecanismos de formación de fototautómeros son complejos y están controlados por diversos factores relacionados, tanto con la propia estructura de la molécula, como con las características del medio. Debido a su enorme importancia en Química y Biología, las reacciones de transferencia protónica en el estado excitado, ESPT, y el fototautomerismo son temas de gran interés y actualidad, ya

que juegan un papel muy importante en una variedad de procesos como, por ejemplo, los de mutagénesis celular inducidos por la luz solar *(Arnaut y Formosinho, 1993; Formosinho y Arnaut, 1993; Agmon, 2005; Raczynski y Kosinska, 2005)*.

La betacarbolina, 9H-pirido[3,4-b]indol, BC, es un prototipo de substrato ácido-base ambivalente. Esta molécula posee un átomo de nitrógeno piridínico y otro pirrólico, cuyas respectivas propiedades ácido-base se intensifican en varias unidades de pK_a cuando se excitan por la acción de la luz, *(Balón y col., 1993);* el nitrógeno pirrólico se hace mucho más ácido y el piridínico mucho más básico.



Esquema 1. Estructura del anillo de betacarbolina.

Hace más de veinte años, *Sakurovs y Ghiggino (1982)* atribuyeron la débil emisión de la betacarbolina por encima de 500 nm a un fototautómero de estructura zwiteriónica. Desde entonces, el fototautomerismo de las betacarbolinas ha sido profusamente estudiado. Según los distintos autores, el proceso de fototautomerización en medios acuosos es relativamente simple; las reacciones de transferencia protónica transcurren, de forma concertada o en etapas, sin que intervenga ningún intermediato. Por el contrario, en medios apróticos de baja

polaridad, las reacciones de transferencia protónica se producen gradualmente a través de distintos aductos y exciplejos.

Aunque ninguno de los mecanismos propuestos permiten explicar satisfactoriamente el proceso de fototautomerización, todos los autores coinciden en atribuir una estructura zwiteriónica a los fototautómeros de las betacarbolinas. De esta forma, a pesar de que no existe ningún tipo de evidencia experimental, la hipótesis de *Sakurovs y Ghiggino (1982)* sobre la naturaleza zwiteriónica de los fototautómeros no sólo no ha sido cuestionada, sino que constituye una especie de *dogma* en la fotofísica de las betacarbolinas.

No obstante, algunos resultados obtenidos recientemente por nuestro grupo de investigación nos han llevado a sugerir que los fototautómeros carbolínicos podrían tener una estructura tipo quinonoide *(Balón y col., 2004)*, diferente de la zwiteriónica. Esta hipótesis, de confirmarse, modificaría significativamente los modelos sobre la naturaleza y estructura de los aductos y exciplejos de la BC y, además, introduciría nuevas perspectivas que podrían contribuir a clarificar el mecanismo de fototautomerización.

Esta Tesis tiene, por tanto, un doble objetivo:

Primero, estudiar los mecanismos de las reacciones de transferencia protónica fotoinducidas de la BC en medios apróticos de baja polaridad y

Segundo, comprobar la validez de la hipótesis sobre la naturaleza quinonoide de los fototautómeros betacarbolínicos.

Con este propósito se han estudiado las propiedades fotofísicas y las reacciones de transferencia protónica de la betacarbolina, BC, sus derivados N_2- y N_9-monometilados y el N,N-dimetilado. Estos derivados, en los que se han bloqueado selectivamente los distintos centros de transferencia protónica del anillo, servirán como modelos para el estudio fotofísico de las diferentes formas prototrópicas de la BC. Así, la memoria está organizada en cuatro partes o capítulos:

El primer capítulo trata sobre las propiedades fotofísicas de la anhidrobase de la N_2-metilbetacarbolina, BCA, y sus interacciones por puente de hidrógeno con 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol, HFIP, en disolventes apróticos.

En el segundo capítulo se estudia la cinética y el mecanismo de la reacción de transferencia protónica fotoinducida desde el HFIP a la N_9-metilbetacarbolina, NMBC, en ciclohexano y en mezclas ciclohexano-tolueno.

En el tercer capítulo se analizan las propiedades espectrales de la N,N-dimetilbetacarbolina, DMBC, y de su derivado 6-sulfónico, BCSA, en disoluciones acuosas concentradas de ácido sulfúrico.

Finalmente, *el cuarto capítulo* está dedicado al estudio de las interacciones por puente de hidrógeno y las reacciones ESPT de la propia BC con HFIP en disolventes apróticos.

2.- ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS Y ESTADO ACTUAL DEL TEMA.

El anillo de betacarbolina, 9H–pirido[3,4-b]indol, BC, constituye la unidad estructural de una familia de alcaloides indólicos que poseen interesantes propiedades bioquímicas y fotofísicas (*Abramovitch y Spencer,1964; Balón y col., 1994).* Estos alcaloides, extensamente distribuidos en la naturaleza, se encuentran en una gran variedad de plantas (*Allen y Holmsted, 1980)*, animales marinos (*Alvarez y Salas, 1991)* e incluso se especula sobre su presencia en ciertos tejidos de los mamíferos, incluido el hombre *(Shoemaker y col., 1978; Rommelspacher y col., 1979; Barker y col., 1981; Beck y Ludman, 1983)*. Además, se ha detectado la presencia de betacarbolinas en el humo del tabaco, en ciertas bebidas alcohólicas, en el queso y en algunos alimentos pasados de cocción *(Airaksinan y Kari, 1981)*.

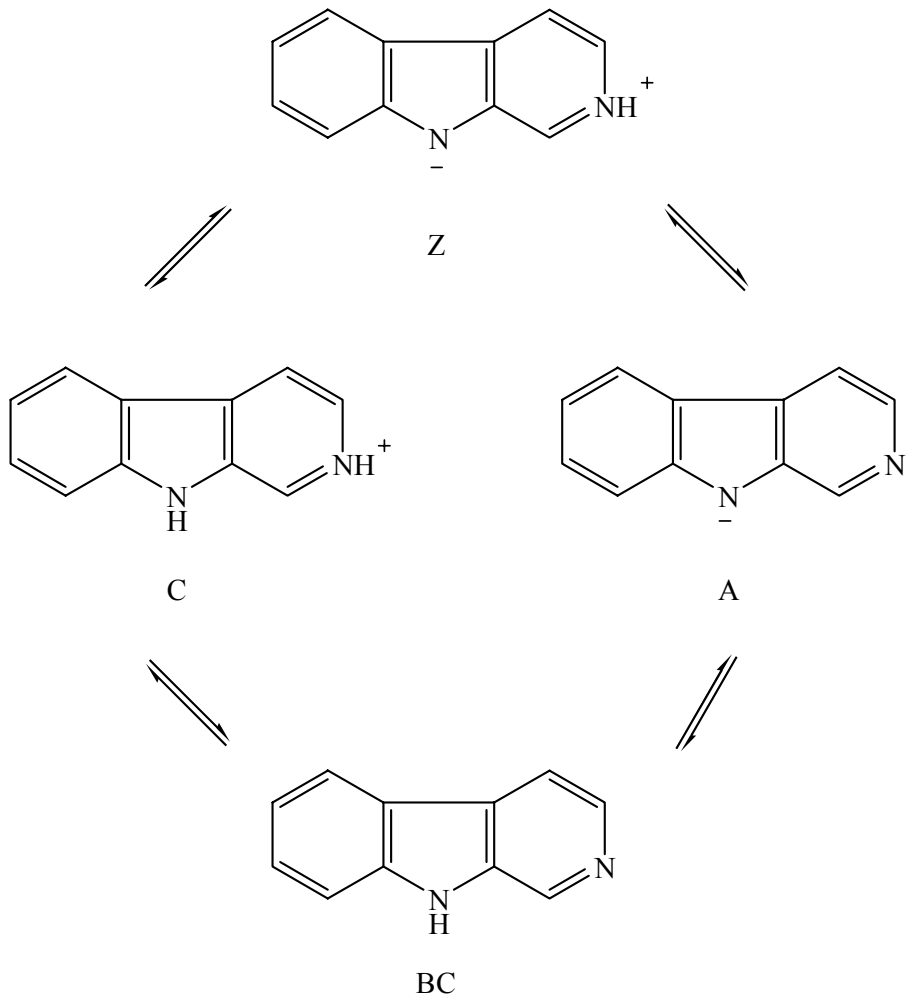
Entre sus propiedades bioquímicas y farmacológicas cabe destacar que estos alcaloides actúan sobre el sistema nervioso central, son potentes inhibidores de la MAO e interaccionan con los receptores de la benzodiazepina en el cerebro, aumentan el nivel de prolactina en el suero sanguíneo y tienen actividades antidopaminérgicas, antidepresivas y anticonvulsivas. Está demostrada, asimismo, la actividad cito- y fototóxica de muchas betacarbolinas *(Beljanski y Beljanski, 1982; Larson y col., 1988)*. Recientemente, la hipótesis sobre la posible implicación de estos alcaloides en la intoxicación alcohólica y en el tabaquismo ha generado una importante actividad investigadora *(Bloom y col., 1982; Herraiz y Chaparro, 2005)*.

Aunque se desconocen los mecanismos bioquímicos de actuación de las betacarbolinas, se sabe que interaccionan con las bases púricas y pirimidínicas *(Balón y col., 1999)*, el ADN *(Burns, 1974; Duportail, 1981),* proteínas *(Fenerty y Lindup, 1985; Queraltó y col., 1986)* y ácidos nucleicos *(Mahmood y Alvarado, 1977)*. En muchos casos, las interacciones de las betacarbolinas con sus receptores bioquímicos se han estudiado por técnicas de fluorescencia, ya que, como hemos mencionado, poseen interesantes propiedades fotofísicas.

La fluorescencia nativa de estos compuestos, conocida desde muy antiguo *(Manske y col. 1927; Hasenfratz, 1927, Udenfriend y col., 1957)*, se usa con fines analíticos en el método de *Denckla-Dewey (1967)* para la detección de triptófano y de triptamina. La sensibilidad de la fluorescencia de las betacarbolinas a la polaridad y propiedades ácido-base del medio, se ha utilizado en el diseño de indicadores fluorescentes de pH y de estándares para sondas de fluorescencia (*Wolfbeis y col., 1982; Ghiggino y col., 1985; Pardo y col., 1992)*.

La presencia en el anillo de betacarbolina de un átomo de nitrógeno piridínico y otro pirrólico confiere a sus derivados un carácter ácido-base ambivalente. Así, las betacarbolinas pueden experimentar diferentes equilibrios prototrópicos, tanto en el estado fundamental, como en el excitado *(Balón y col., 1993)*. En el estado fundamental, la especie neutra se protona en el nitrógeno piridínico en medios acuosos moderadamente ácidos y da lugar a especies

catiónicas, C, mientras que la desprotonación del nitrógeno pirrólico requiere medios fuertemente básicos (≈ 8M KOH) y genera especies aniónicas, A.



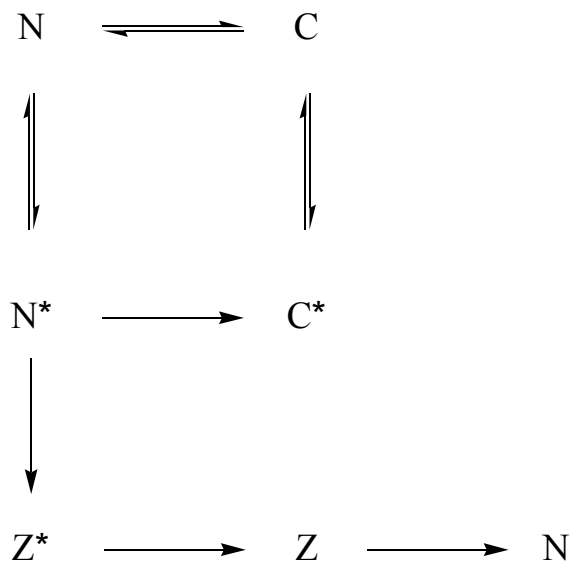
Esquema 2.- Equilibrios prototrópicos de la betacarbolina.

En el estado excitado, la migración de carga electrónica desde el nitrógeno pirrólico al piridínico hace que las respectivas propiedades ácido-base de estos centros se intensifiquen en varios órdenes de magnitud *(Dias y col., 1992; Balón y col., 1993)*. Así, en casi todo el rango de pH, los espectros de fluorescencia de las disoluciones acuosas de las betacarbolinas sólo muestran la intensa emisión del catión excitado, C*, $\lambda_{em} \approx 450$ nm. Para observar la emisión de los aniones, A*, $\lambda_{em} \approx 445$ nm, se requieren disoluciones fuertemente básicas fuera de la zona de pH *(Balón y col., 1987)*. La emisión de la forma neutra, N*, sobre 380 nm, es prácticamente imperceptible en medios acuosos. Además, en medios moderadamente básicos, bajo ciertas condiciones, se puede observar la débil emisión por encima de 500 nm atribuida a un fototautómero de estructura zwiteriónica, Z* *(Sakurovs y Ghiggino, 1982; Wolfbeis y col. 1982)*.

En disolventes no acuosos la contribución a la emisión de las diferentes formas prototrópicas del anillo de betacarbolina depende de la polaridad del medio y de las propiedades dadoras/aceptoras de puentes de hidrógeno del disolvente. Así, en disolventes próticos como metanol, además de la especie neutra, también emiten la especie catiónica, C*, y el fototautómero, Z* *(Dias y col., 1992)*. En disolventes apróticos de baja polaridad, tales como benceno o ciclohexano, sólo emite la especie neutra, N*. No obstante, en estos medios apróticos y en presencia de dadores/aceptores protónicos también emiten las especies catiónicas, C*, y las zwiteriónicas, Z* *(Reyman y col*., 1997).

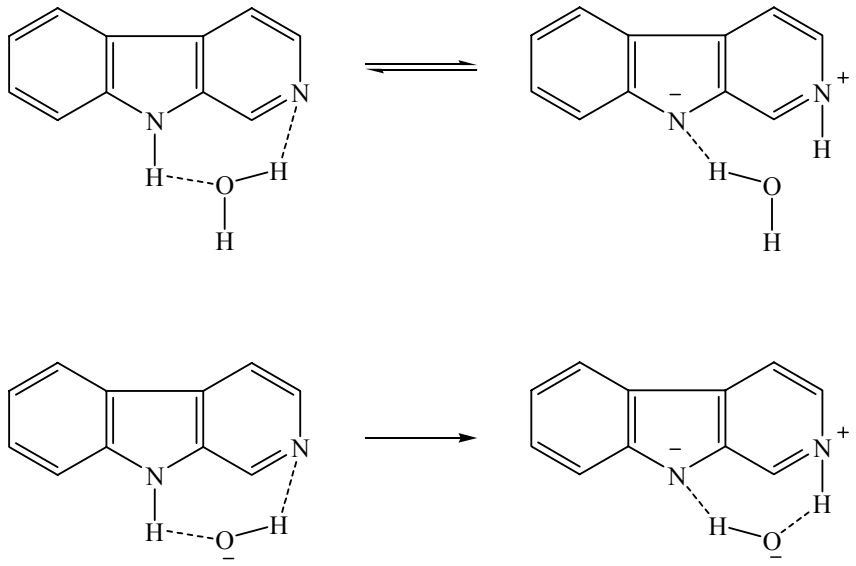
Los equilibrios prototrópicos y las reacciones ESPT de la betacarbolina han sido profusamente estudiados. Primero, en la década de los ochenta, con técnicas de fluorescencia estacionaria *(Wolfbeis y col., 1982; Tomas Vert y col., 1983; Pardo y col., 1988; Balón y col., 1993)* y, posteriormente, a partir de los noventa, con técnicas de fluorescencia con resolución temporal. En el primero de estos estudios de fluorescencia con resolución temporal, *Dias y col. (1992)* propusieron que los fototautómeros Z* se forman exclusivamente a partir de la molécula neutra durante su tiempo de vida en el estado excitado. Estos autores, no

obstante, dejaron abierta la cuestión sobre la naturaleza concertada o en etapas de la doble transferencia prótonica implicada en esta reacción.



Esquema 3.- Mecanismo de Dias y col.

De forma casi simultánea, *Draxler y Lippitsch (1993)* propusieron un mecanismo alternativo en el que todas las especies prototrópicas de la BC se encuentran acopladas en el estado excitado. Según estos autores, Z* se forma directamente a partir de N* mediante una doble transferencia protónica concertada en el complejo cíclico formado por una molécula de agua o de OH^- enlazada, simultáneamente, a los centros piridínico y pirrólico del anillo de betacarbolina, Esquema 4.

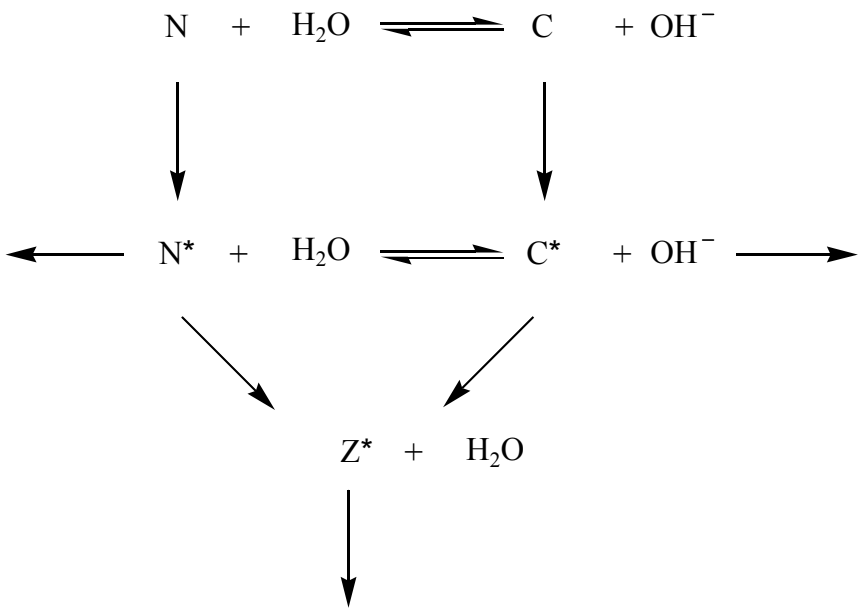


Esquema 4.- Mecanismo de Draxler y Lippitsch.

Dias y col. (1995), rechazaron este mecanismo y cuestionaron la validez de las constantes cinéticas obtenidas por estos autores. De hecho, los tiempos de vida asignados por estos autores a algunas de las especies prototrópicas de la BC difieren notablemente de los que típicamente se recogen en la bibliografía. Las discrepancias entre estos autores dieron lugar a un interesante debate *(Varela y col., 1995*; *Draxler y Lippitsch, 1995)*.

Algunos años más tarde, a raíz de un estudio sobre las reacciones ESPT de la harmina, 6-metoxi-1-metilbetacarbolina, en disoluciones acuosas, *Dias y col. (1996),* propusieron un nuevo mecanismo de fototautomerización. Según este mecanismo, el fototautómero Z* se puede formar por dos caminos paralelos. Por debajo de pH=9, Z* se forma exclusivamente a partir de N* mediante una doble

ESPT con moléculas de agua. A pHs suficientemente altos, Z* también se puede formar por la ESPT de C* con OH^-. En ambos casos, la formación de Z* es prácticamente irreversible, ya que las velocidades de los reacciones Z*→N* y Z*→C* se pueden considerar despreciables. A título de curiosidad, cabe citar que este mecanismo, conocido como triángulo fotocinético, fue uno de los primeros ejemplos que se recogen en la bibliografía, sobre la resolución temporal de un sistema constituido por tres especies excitadas que se interconvierten entre sí *(Seixas de Melo y Maçanita, 1993)*.



Esquema 5.- Mecanismo de Dias y col. para la fototautomerización de la harmina en disoluciones acuosas.

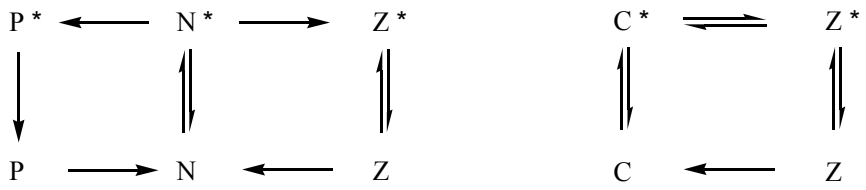
Uno de los grupos de investigación que más activamente ha estudiado las reacciones ESPT de las betacarbolinas es el de *Reyman y col*. de la Universidad

Autónoma de Madrid *(Reyman y col., 1994, 1997,1999a, 1999b; Tapia y col., 2002*). La sistemática empleada por estos autores consiste en añadir cantidades progresivas de un ácido orgánico, principalmente ácido acético, a las disoluciones de betacarbolina en disolventes orgánicos de baja polaridad y analizar espectroscópicamente los cambios que experimenta el sistema.

Entre los resultados más notables de los primeros estudios de *Reyman y col. (1994),* está la detección, en el sistema BC-diclorometano-ácido acético, de un fototautómero P*, que emite $\lambda_{em} \sim 400$ nm. Así, de acuerdo con sus resultados experimentales, al excitar la especie neutra se observa la emisión de tres especies, la propia forma neutra, N*, y los fototautómeros P* y Z*. Estos autores propusieron, inicialmente, que la especie P* es un exciplejo en el que el grupo C-H del diclorometano se enlaza por un puente de hidrógeno, en el estado excitado, al nitrógeno piridínico de la betacarbolina.

De acuerdo con sus resultados de fluorescencia resuelta en el tiempo, Z* no se forma a partir de P*, por lo que el mecanismo que proponen para la formación de Z* es el que se muestra en el Esquema 6 (izquierda). Además, cuando se fotoseleccionan las especies catiónicas, se observa la emisión tanto de C* como de Z*. Es decir, Z* se puede formar también a partir de una especie distinta de la neutra, como se muestra en el Esquema 6 (derecha).

Según estos autores *(Reyman y col., 1997, 1999)*, los resultados de fluorescencia con resolución temporal indican que este segundo mecanismo es complejo, ya que los precursores de Z* no son los propios C*, sino ciertos cationes de tiempos de vida muy cortos, ≈ 1 ns, cuyas esferas de solvatación en el estado fundamental ya están preparadas para dar, en el momento de la excitación, los fototautómeros Z*. No obstante, en medios más polares, cuando la constante dieléctrica del disolvente es suficientemente alta, el enriquecimiento de la esfera de solvatación bloquea el anillo indólico y previene la formación de otras especies diferentes de C*. Por tanto, los fototautómeros Z* sólo se pueden observar en disolventes de baja polaridad y baja constante dieléctrica.

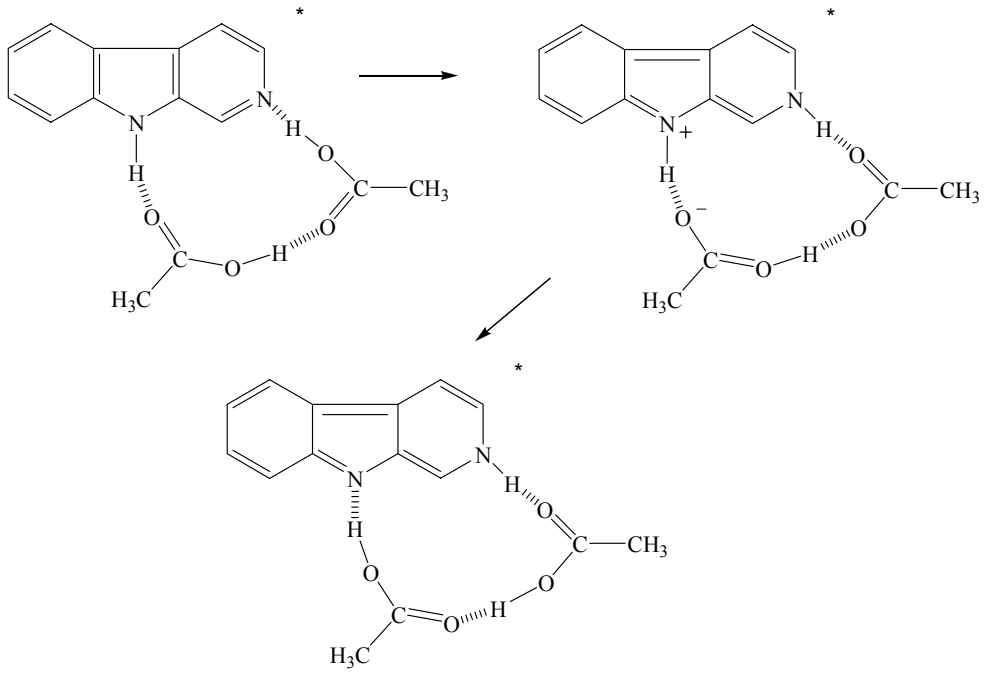


Esquema 6.- Mecanismo de Reyman y col.

Últimamente, *Reyman y col. (2002),* han desarrollado un modelo basado en las siguientes proposiciones. En el estado fundamental, la betacarbolina y el ácido acético forman un complejo de estequiometría 1:1, mientras que en el estado excitado se pueden detectar tres complejos diferentes; dos complejos de estequiometría 1:1 y un complejo no cíclico de estequiometría 1:2. Los complejos 1:1 representan la interacción por puente de hidrógeno con cada uno de los centros activos del anillo de betacarbolina. En el complejo doble, cada una de las moléculas de ácido acético se enlaza a uno de estos centros activos. Los últimos complejos sólo se pueden formar a partir de los complejos 1:1. Estos complejos tienen una estructura quinonoide y son los responsables de la emisión a 500 nm. En general, los diferentes complejos ácido acético-betacarbolina son poco estables en disolventes polares. En estos medios las especies más estables son los cationes, C*. En el estado fundamental sólo son estables los complejos pirrólicos.

Recientemente, *Pi-Tai Chou y col. (2001)* han estudiado el sistema BC-ácido acético en ciclohexano. Estos autores proponen que las reacciones de transferencia protónica que dan lugar a Z* se producen concertadamente en un complejo cíclico 1:2 formado por la BC y dos moléculas de ácido acético unidas entre sí y a los

átomos de nitrógeno pirrólico y piridínico, respectivamente. Así, tras la excitación por la luz, se produce la relajación de los puentes de hidrógeno y la formación de Z*. Como apoyo a este mecanismo, *Pi-Tai Chou y col*. comprobaron que, en el caso de la 1-metilbetacarbolina o harmano, HN, debido al impedimento estérico del grupo metilo, se necesita mucha mayor cantidad de dador para observar la emisión del zwiterión. En este caso, la presencia de un grupo metilo en la posición 1 del anillo de betacarbolina dificulta la formación del complejo cíclico y por tanto la formación del fototautómero Z*. Cabe señalar que el mecanismo propuesto por *Pi-Tai Chou y col.* es muy similar al debatido mecanismo de fototautomerización del 7-azaindol *(Waluk, 2000)*.



Esquema 7.- Mecanismo de Pi-Tai Chou y col.

Desde hace más de diez años, nuestro grupo viene desarrollando una línea de investigación dedicada al estudio de las interacciones por puente de hidrógeno y reacciones ESPT de las betacarbolinas *(Balón y col., 1996 y 1998; Carmona y col., 2000, 2001, 2002)*. Nuestra primera aproximación al tema fue el estudio de las propiedades dadoras/aceptoras de puentes de hidrógeno de la 1-metilbetacarbolina o harmano, HN, y la caracterización espectroscópica de sus complejos enlazados por puente de hidrógeno.

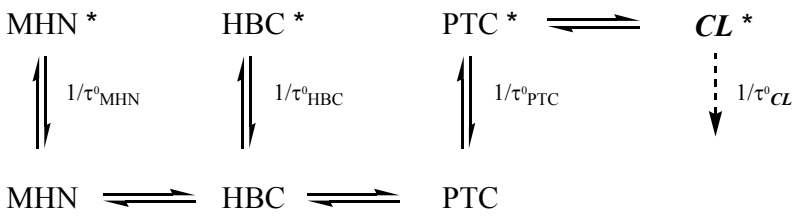
Estos estudios demostraron que, en medios de baja polaridad, tales como ciclohexano o mezclas tolueno-ciclohexano, la interacción en el estado fundamental del grupo pirrólico del HN con aceptores protónicos da lugar a un único tipo de complejo fluorescente de estequiometría 1:1. Estos complejos no experimentan, en ningún caso, reacciones de fototautomerización. Por el contrario, la interacción del nitrógeno piridínico del HN con dadores protónicos puede dar lugar, dependiendo de la fuerza del dador, a dos tipos de complejos fluorescentes, HBC y PTC, con estequiometrías 1:1 y 1:2, respectivamente. Estos complejos se encuentran en equilibrio en el estado fundamental, pero no interaccionan entre sí durante su tiempo de vida en el estado excitado.

Los complejos HBC y PTC se interpretaron, según el modelo clásico de interacción por puente de hidrógeno, suponiendo la existencia de dos mínimos en la superficie de energía potencial del enlace de hidrógeno. En uno de estos mínimos, HBC, el protón está próximo al átomo de oxígeno del alcohol y en el otro, PTC, próximo al átomo de nitrógeno piridínico de la betacarbolina. Esta situación se puede representar como un equilibrio tautomérico entre el complejo covalente enlazado por puente de hidrógeno, $OH^{\cdots}N$ o HBC, y su par iónico o complejo de transferencia protónica, $O^{-\cdots}H^{+}N$ o PTC. De acuerdo con este modelo, para estabilizar el PTC en estos medios apróticos de baja polaridad se requiere, al menos, que una segunda molécula de dador solvate la carga negativa del par iónico.

Según los resultados de este estudio, todos los dadores empleados formaban con el HN complejos de tipo HBC en el estado fundamental. Por el contrario, los complejos tipo PTC sólo los formaban aquellos dadores fuertes que,

como el HFIP, trifluoroetanol o 2-cloroetanol, eran capaces de dar, en el estado excitado, fototautómeros Z*.

Aunque estos resultados parecían indicar que los PTC* eran los precursores directos de Z*, estudios posteriores *(Balón y col., 2000*; *Carmona y col., 2001),* demostraron que la situación era bastante más compleja. De hecho, los PTC del N_9-metilharmano, MHN, que no pueden evolucionar hacia Z* por tener bloqueado el átomo de nitrógeno pirrólico, reaccionan en el estado excitado con una nueva molécula de HFIP para dar, en ciclohexano, un exciplejo de características similares a las del fototautómero P* de *Reyman y col. (1994)*. Estos exciplejos denominados *"cation like",* CL*, por su parecido con los cationes C*, emiten alrededor de 410 nm, con un tiempo de vida próximo a 16 ns.

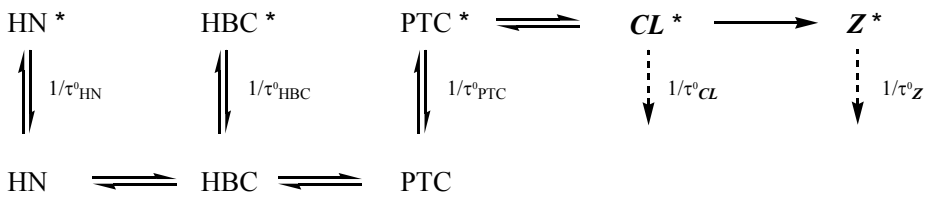


Esquema 8.- Mecanismo de interacción entre el MHN y el HFIP.

La formación de exciplejos CL* no es una propiedad exclusiva del derivado metilado, ya que el propio HN también los forma. No obstante, para que se formen los CL* del HN se requieren concentraciones de HFIP mucho más altas que en el caso del MHN. Por esta razón, los CL* del HN no se forman en ciclohexano, donde la solubilidad del HFIP es bastante limitada, pero sí se forman en otros medios en los que se pueden solubilizar mayores cantidades de HFIP. Así, nuestro estudio de fluorescencia estática y con resolución temporal del sistema HN-HFIP, en una

mezcla al 10% v/v de tolueno-ciclohexano, demostró que los exciplejos PTC*, CL* y Z* coexisten en el estado excitado *(Carmona y col., 2002)*.

Los resultados de este estudio indicaban, por otra parte, que la fototautomerización del HN es un proceso complejo, tal como se muestra en el mecanismo del Esquema 9. En este mecanismo se establece que las especies intermediarias del proceso de fototautomerización son los distintos aductos y exciplejos enlazados por puente de hidrógeno que forma el HN con HFIP. Dichos complejos modulan las reacciones de transferencia protónica ya que a través de ellos se gradúa secuencialmente el proceso de separación de carga.



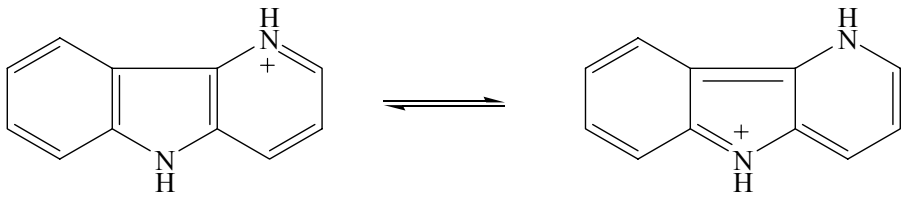
Esquema 9.- Mecanismo de interacción entre el HN y el HFIP.

Según este mecanismo, los precursores directos de Z* son los CL*. Desgraciadamente, la información que se puede obtener a partir de nuestros resultados experimentales sobre la naturaleza y estructura de los exciplejos CL* es muy escasa. Básicamente, se puede decir que su estequiometría debe ser 1:3 como mínimo, pues se forman por reacción del PTC* con una molécula de HFIP, y que, dada su similitud con los C*, deben tener una alta densidad de carga positiva sobre su átomo de nitrógeno piridínico.

Recientemente, nuestros estudios fotofísicos sobre un isómero de la BC, la 5H-pirido[3,2-b]indol o δ-carbolina, DC, *(Balón y col., 2002, 2004a, 2004b)* han aportado un conjunto de interesantes resultados que podrían ayudar a clarificar la

fotofísica de la BC y su fototautomerismo. Sorprendentemente, el cambio de la posición relativa de los átomos de nitrógeno pirrólico y piridínico en el anillo hace que el comportamiento fotofísico de la DC sea diferente y mucho más complejo que el de la BC *(Balón y col. 2002)*. Así, en lo que se refiere a sus equilibrios prototrópicos en medios acuosos, se pueden citar dos notables diferencias entre la DC y la BC.

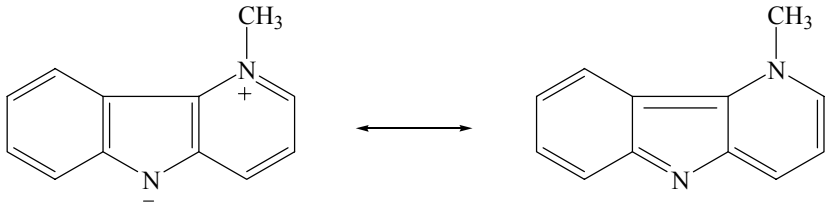
En primer lugar, nuestros resultados experimentales proporcionan fundadas evidencias sobre la existencia de dos cationes isómeros de la DC. En el catión "normal", la carga positiva se encuentra localizada sobre el átomo de nitrógeno piridínico, mientras que en su isómero lo está sobre el átomo de nitrógeno pirrólico, Esquema 10.



Esquema 10.- Cationes isómeros de la DC.

En segundo lugar, a diferencia de lo que ocurre con la BC, cuando se excita la DC en medios básicos no se observa la emisión de sus correspondientes Z*. Sin embargo, estas emisiones zwiteriónicas por encima de 500 nm, son claramente perceptibles en los espectros de fluorescencia de la anhidrobase de su derivado N_{pirido} metilado, DCA, *(Balón y col., 2004b)*. El nombre de anhidrobase se emplea típicamente para denominar a las formas neutras de los derivados N_{pirido} metilados de las carbolinas. Este nombre hace referencia a que dichas formas neutras son las especies que resultan cuando los hidróxidos cuaternarios de los cationes

carbolínicos pierden una molécula de agua. Como se muestra en el Esquema 11 para la DCA, estas especies neutras se representan clásicamente mediante un equilibrio resonante entre sus formas zwiteriónica, Z, y quinonoide, Q.

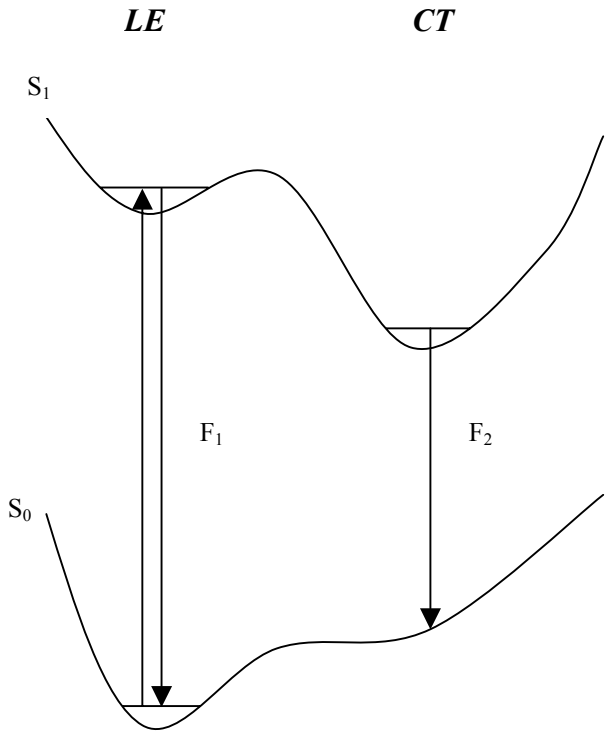


Z **Q**

Esquema 11.- Estructuras resonantes de la DCA.

La DCA presenta además otras interesantes propiedades fotofísicas que no sólo la diferencian de la DC, sino que además podrían ser muy relevantes para la interpretación del fototautomerismo de las carbolinas. Así, los espectros de absorción de la DCA en disolventes apróticos presentan una débil banda de absorción muy desplazada al rojo. Esta banda, ausente en el espectro de la DC, es típica de un proceso de transferencia de carga. Por otra parte, a diferencia de lo que ocurre en la DC, las interacciones por puente de hidrógeno y el aumento de la polaridad del disolvente provocan el desplazamiento al azul del espectro de absorción de la DCA. Por último, los espectros de fluorescencia de la DCA en medios apróticos presentan doble emisión con una banda estructurada, F_1, a bajas longitudes de onda y otra mucho más débil, F_2, a más largas longitudes de onda, que recuerda a la emisión zwiteriónica.

Nuestro intento de explicar las peculiares propiedades fotofísicas de la DCA nos llevó a proponer el diagrama fotofísico que se muestra en el Esquema 12.



Esquema 12.- Diagrama fotofísico de la DCA.

En este modelo se asume que la mezcla de los estados excitados nπ* y ππ* de más baja energía de la DCA da lugar a una superficie de energía potencial, S_1, con dos mínimos de energía. El primero de ellos es el estado localmente excitado, LE, y el segundo, CT, es el estado que resulta de la transferencia de carga intramolecular, ICT, en el estado excitado entre los átomos de nitrógeno pirrólico y piridínico del anillo de la DCA. De acuerdo con este modelo, tras la población "instantánea" del estado LE mediante una transición vertical Franck-Condon, las moléculas excitadas emiten desde dicho estado, o se mueven sobre la superficie

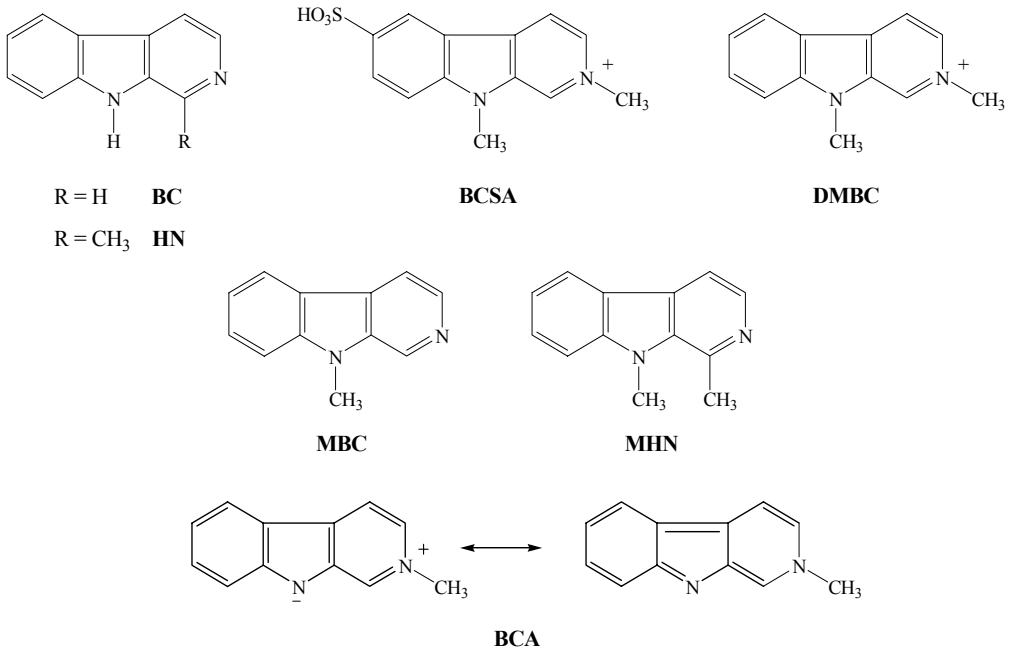
de energía potencial y emiten desde el estado CT. Nuestro modelo asume, además, que al pasar del estado LE al CT de la DCA las contribuciones de las estructuras resonantes Z y Q se invierten. De esta forma, tras el proceso ICT, la estructura zwiteriónica del estado LE se transforma en una estructura quinonoide en el estado CT.

Así pues, nuestros estudios sobre la fotofísica de la DC y sus derivados metilados ponen de manifiesto que en el anillo de carbolina pueden darse una serie de fenómenos tales como; el isomerismo en el estado fundamental, la doble emisión de fluorescencia y los procesos ICT, que hasta ahora apenas han sido explorados. Estas propiedades plantean, asimismo, una serie de hipótesis que abren nuevas perspectivas en el estudio e interpretación de las propiedades fotofísicas de los piridoindoles o carbolinas en general y, en particular, de las del miembro más representativo de la serie, la BC.

3.- EXPERIMENTAL: MATERIALES, APARATOS Y MÉTODOS.

3.1. Materiales

Se han empleado los siguientes derivados betacarbolínicos: norharmano o betacarbolina, 9H-pirido[3,4-b]indol, BC; harmano o 1-metil-9H-pirido[3,4-b]indol, HN, N_2-metilbetacarbolina o betacarbolina anhidrobase, BCA; N_9-metilbetacarbolina, MBC; N,N-dimetilbetacarbolina, DMBC, y el ácido N,N-dimetil-9H-pirido[3,4-b]indol-6-sulfónico, BCSA.



Esquema 13.- Estructuras de los derivados de la BC empleados en este estudio.

La BC, el HN y el BCSA fueron productos comerciales de elevada pureza (Aldrich >99%). Los derivados N-mono y N,N-dimetilados se sintetizaron a partir de BC mediante procedimientos descritos en la bibliografía *(Doig y col., 1952),* aunque se realizaron ligeras modificaciones que, junto con la descripción global del método, se exponen a continuación:

Al producto de partida, BC, disuelto en la mínima cantidad de tolueno y filtrado, se le añade sulfato de dimetilo (>99%, Merck) en leve exceso,

precipitando el metosulfato de la N_{pirido}-metilbetacarbolina. La disolución se mantiene agitando en caliente durante varias horas, se deja reposar unas horas y, una vez filtrado, se seca el precipitado con éter dietílico.

Este derivado monometilado, de color amarillo–limón, se disuelve en caliente en la mínima cantidad de agua y se filtra. Al filtrado se le añaden, en caliente y con agitación, unos mililitros de sosa 10 M hasta que precipita un sólido de color amarillo fuerte. Se deja reposar unas horas el precipitado tras lo cual se filtra y se seca al aire. El sólido resultante, de color amarillo–pálido, es la anhidrobase de la betacarbolina, BCA.

La anhidrobase se disuelve en caliente en la mínima cantidad de tolueno y se filtra. Una vez filtrada se le añade yoduro de metilo (99.5%, Aldrich) en exceso, precipitando casi de inmediato el derivado N,N-dimetilado de color amarillento, DMBC. Finalmente, cuando se sublima la DMBC a presión reducida se obtiene, por pirólisis, la N_{pirrol}-metil betacarbolina, MBC. Todos los compuestos sintetizados se purificaron por recristalización y se identificaron por sus puntos de fusión, análisis elemental y espectros de resonancia magnética nuclear, RMN, de ^{1}H y ^{13}C registrados en un espectrómetro Bruker Avance 500 (frecuencia de ^{1}H 500 MHz y de ^{13}C 125.7 MHz).

Los disolventes empleados: n-hexano (Merck UniSolv); tolueno (>99%, Aldrich); ciclohexano (Riedel-de Haën), cloroformo (Chromasolv Riedel-de Häen), diclorometano (Chromasolv Riedel-de Häen), N.N-dimetilformamida (>99%, Aldrich), DMF; y 1,1,2,2-tetracloroetano (≥98%, Fluka), fueron productos comerciales de calidad para espectroscopía y se secaron y conservaron según se especifica en la bibliografía *(Perrin y Amarego, 1988)*. Periódicamente, se inspeccionaron sus espectros de absorción y de emisión a fin de detectar la posible presencia de impurezas.

El agente dador de puente de hidrógeno empleado fue el: 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (≥99%, Fluka), HFIP. Las disoluciones acuosas de ácido sulfúrico se prepararon a partir de disoluciones comerciales concentradas de ácido

sulfúrico (95-97%, Merck) y de ácido sulfúrico-d_2, (99.5%D, Aldrich), y se valoraron con hidróxido sódico previamente titulado (Panreac). Para el estudio del efecto isotópico se empleó agua deuterada 99.9% D (Aldrich).

Las concentraciones de las disoluciones de las betacarbolinas empleadas en las medidas de fluorescencia se mantuvieron lo suficientemente bajas, $\sim 10^{-4}$-10^{-5} M, a fin de evitar efectos de filtro interno y de reabsorción. Asimismo, se trabajó con disoluciones sin desoxigenar ya que, en experiencias anteriores efectuadas en nuestro laboratorio, se comprobó que la posible desactivación de la fluorescencia provocada por el oxígeno era despreciable *(Carmona y col., 2002)*.

3.2.- Aparatos

Los espectros de absorción se midieron en un espectrofotómetro Perkin–Elmer Lambda-5 y los de emisión en un espectrofluorímetro Hitachi F-2500. En ambos aparatos se utilizaron portacubetas termostatizables para el control de la temperatura (±0.1ºC). Tanto en las medidas de absorción como en las de fluorescencia se emplearon cubetas de cuarzo suprasil de 1 cm de paso de luz (Starna). Los espectros de excitación se registraron en un espectrofluorímetro Perkin- Elmer 650-40 equipado con un procesador de datos 650-0178 de la misma casa comercial. Los espectros se corrigieron midiendo la respuesta de excitación con rodamina B y la de emisión con una célula difusora.

Los estudios de fluorescencia con resolución temporal se realizaron en un espectrofluorímetro FL-900CD Edinburgh Analytical Instrument. Como fuente de excitación se utilizó una lámpara de pulso de nanosegundos, nF900. Habitualmente, la lampará funcionó con H_2 gaseoso a la presión de 0.4 bar, trabajando a 40 kHz con 6 kV aplicados a los electrodos donde se produce el destello. La separación entre los electrodos fue de 1 mm. Ocasionalmente, para el estudio de muestras muy poco fluorescentes, se empleó nitrógeno a la presión de 1.5 bar, trabajando a 20-25 kHz con 7 kV aplicados a los electrodos, separados éstos 0.25 mm.

El funcionamiento de este aparato está basado en la Técnica de Conteo de Fotones Individuales Correlacionados en el Tiempo *(Demas, 1983; O'Connor y Phillips, 1984)*. Esta técnica se basa en los siguientes principios: La muestra del fluoróforo se excita con un intenso y estrecho pulso de luz. Cada pulso es seguido y amplificado por un fotodiodo de alta velocidad o un fotomultiplicador. El disparo de la lámpara inicia la carga de un condensador, que se detiene cuando se detecta un fotón procedente de la emisión de la muestra. El voltaje generado en el condensador, proporcional al tiempo de respuesta, se transforma a una escala de tiempo mediante un convertidor tiempo-amplitud, TAC y, finalmente, un analizador multicanal, MA, almacena este dato en forma de cuenta (*una cuenta, un fotón*).

El conteo se continúa hasta alcanzar el número de cuentas que previamente se ha fijado al comienzo del experimento. La función de distribución cuentas/canal representa la curva de decaimiento de fluorescencia. El número de cuentas necesario para construir fiablemente la curva de decaimiento depende de la complejidad e intensidad de la señal. En nuestros experimentos, las curvas de decaimiento se obtuvieron generalmente fijando en 10.000 el número de cuentas en el máximo de la curva. No obstante, este número se aumentó o disminuyó cuando la complejidad o la baja intensidad de la señal así lo aconsejaba.

3.3.- Métodos

3.3.1.- Determinación de constantes de equilibrio.

La BC y sus derivados metilados forman con HFIP distintos tipos de complejos enlazados por puente de hidrógeno. Las modificaciones espectrales que generalmente acompañan a la formación de estos complejos permiten obtener información sobre sus estequiometrías y constantes de formación.

Supongamos que el substrato betacarbolínico, B, interacciona con HFIP para dar, en el estado fundamental, un complejo C de estequiometría 1:1:

$$B + HFIP \leftrightarrow C \qquad (1)$$

Su constante de formación, K_G, vendrá dada por:

$$K_G = \frac{[C]}{[B][HFIP]} = \frac{[C]}{([B]_0 - [C])\,([HFIP]_0 - [C])} \qquad (2)$$

donde $[B]_0$ y $[HFIP]_0$ representan las concentraciones iniciales de B y HFIP.

Si se ajustan las condiciones experimentales de forma que $[HFIP]_0 >> [B]_0$ y [C], la ecuación (2) se puede reorganizar para obtener:

$$\frac{1}{[C]} = \frac{1}{K_G [B]_0 [HFIP]_0} + \frac{1}{[B]_0} \qquad (3)$$

Por otra parte, si las medidas de absorbancia se realizan a una longitud de onda a la que sólo absorben B y C, las absorbancias, A, de las disoluciones B-HFIP medidas en una cubeta de 1 cm de paso de luz, vendrían dadas por:

$$A = \varepsilon_B [B] + \varepsilon_C [C] \qquad (4)$$

donde ε_B y ε_C son los respectivos coeficientes de absorción molar de B y C a la longitud de onda seleccionada.

Asimismo, las absorbancias de las disoluciones en ausencia de HFIP, A_0, y cuando B se ha transformado completamente en C, A_∞, vendrían dadas por:

$$A_0 = \varepsilon_B [B]_0 \qquad (5)$$

$$A_\infty = \varepsilon_C [B]_0 \qquad (6)$$

Finalmente, combinando las ecuaciones (4), (5) y (6), con la (3), se obtiene la ecuación (7), que se conoce como ecuación de Benesi-Hildebrand:

$$\frac{1}{A - A_0} = \frac{1}{A_\infty - A_0} + \frac{1}{A_\infty - A_0} \cdot \frac{1}{K_G} \cdot \frac{1}{[HFIP]} \qquad (7)$$

La ecuación de Benesi-Hildebrand predice que, para un complejo de estequiometría 1:1, la representación de $1/(A-A_0)$ frente a 1/[HFIP] debe dar una línea recta, de cuya pendiente y ordenada en el origen se puede obtener el valor de K_G.

Las representaciones de Benesi-Hildebrand se pueden construir también con datos de fluorescencia, siempre que B y C se comporten como fluoróforos independientes, es decir, que no interaccionen entre sí en el estado excitado. En este

caso, para un complejo de estequiometría 1:1, bastaría substituir en la ecuación (7) los datos de absorbancia por los de fluorescencia para obtener:

$$\frac{1}{F - F_0} = \frac{1}{F_\infty - F_0} + \frac{1}{F_\infty - F_0} \cdot \frac{1}{K_G} \cdot \frac{1}{[HFIP]} \qquad (8)$$

En esta ecuación F puede representar la intensidad de emisión a una determinada longitud de onda o el área bajo el espectro de emisión.

3.3.2.- Medidas de pK_{as}

En medios fuertemente ácidos, fuera de la región 0-14 de pH, los cationes del BCSA experimentan sucesivos equilibrios de protonación para dar especies di- y tricatiónicas. Los pK_as de estos procesos de protonación se determinaron usando el método de la Acidez de Exceso, EAM, (*Marziano y col., 1981; Bagno y col., 1987)*. Este método se basa en suponer que existe proporcionalidad entre la relación de coeficientes de actividad, *f*, de distintos indicadores o parejas ácido-base conjugadas. Ello permite definir una única función de acidez general, denominada función de Acidez de Exceso, X_p:

$$\log \frac{f_B \cdot f_{H^+}}{f_{BH^+}} = m^* . \log \frac{f^*_B \cdot f^*_{H^+}}{f^*_{BH^+}} = m^* \cdot X_p \qquad (9)$$

La función de Acidez de Exceso, X_p representa la diferencia entre la acidez actual del sistema y la que tendría si su comportamiento fuese ideal:

$$\log I - \log [H^+] = m^*_p \cdot X_p + pK_a \qquad (10)$$

En nuestros experimentos, los valores de I, relación de concentraciones de equilibrio de las formas ácida y básica conjugadas, se obtuvieron espectrofotométricamente.

De acuerdo con la ecuación (10), la acidez de una substancia se define en función de dos parámetros, su pK_a, y el coeficiente de proporcionalidad m* que se puede relacionar cualitativamente con la contribución de la solvatación en el proceso de ionización. Los valores de m* son característicos para cada centro de protonación, lo que permite dilucidar el sitio de protonación en aquellas moléculas que poseen

varios centros. Actualmente, la escala de Acidez de Exceso constituye el modelo más próximo al concepto ideal de una escala de acidez universal.

3.3.2.- Deconvolución de espectros

Muchos de los espectros experimentales obtenidos en nuestro trabajo son el resultado de la superposición o mezcla de espectros de distintas especies. En algunos casos, resulta conveniente descomponer o deconvolucionar los espectros experimentales en cada uno de los espectros individuales de que constan.

Para la deconvolución de los espectros de fluorescencia se ha utilizado el programa informático AutoFit Peaks II Second Derivative que se incluye en el programa informático Peak Fit© de Jandel Scientific. En este método los "*picos ocultos*" son detectados por un mínimo en la segunda derivada. El programa define un "*pico oculto*" como aquél que no es directamente responsable del máximo de una banda. Esta opción emplea el algoritmo de Savitzky-Golay para el tratamiento de las bandas.

Tras realizar las pruebas pertinentes con diferentes tipos de funciones gaussianas, lorentzianas, etc, se comprobó que la curva teórica que mejor reproduce las bandas de fluorescencia fue la Asimétrica Logística:

$$y = a_0\left[1+\exp\left(-\frac{x+a_2\cdot\ln(a_3)-a_1}{a_2}\right)\right]^{-a_3-1} a_3^{-a_3}(a_3+1)^{a_3+1}\exp\left(-\frac{x+a_2\cdot\ln(a_3)-a_1}{a_2}\right) \qquad (11)$$

en la que la intensidad, centro, anchura y asimetría de la banda se definen mediante los parámetros a_0, a_1, a_2 y a_3.

Para la deconvolución de una serie de espectros experimentalmente relacionados, se fijaron los centros de las bandas a deconvolucionar y se dejaron como parámetros ajustables sus intensidades, anchuras y asimetrías. Como línea base, se usó la correspondiente al cero de intensidad de fluorescencia. Para el ajuste de las curvas el programa emplea una versión del algoritmo de minimización no lineal de Marquardt-Levenburg. La bondad del ajuste se puede estimar mediante el coeficiente de regresión no lineal de mínimos cuadrados, r^2, y el análisis visual de la curva residual.

3.3.3.- Ajuste de las curvas de decaimiento de fluorescencia

El análisis de las curvas de decaimiento es uno de los aspectos cruciales en la Técnica del Conteo de Fotones Individuales Correlacionados en el Tiempo. En este análisis se fija, *a priori,* la función matemática modelo que supuestamente representa el decaimiento de fluorescencia del sistema y se compara con la experimental. En la práctica, el análisis de las curvas de decaimiento implica:

1º La eliminación de las deformaciones debidas a la duración finita del pulso de excitación y a la respuesta del sistema de detección.

2º La evaluación de los parámetros de la función de decaimiento que se preselecciona como modelo.

Para llevar a cabo ambos procesos se usa la integral de convolución:

$$F(t) = \int_0^t I(t-t')D(t)dt' \qquad (12)$$

que relaciona la funcion de decaimiento modelo, D(t), con la señal de emisión experimental, F(t), mediante la función de respuesta instrumental, I(t). Esta última función I(t) se suele denominar como *perfil de la lámpara* y representa la respuesta del instrumento cuando $\tau \rightarrow 0$. La función I(t) se mide habitualmente substituyendo la muestra por una disolución dispersora de la luz colocando la emisión a la misma longitud de onda de excitación a la que se mide la muestra. La validez del proceso de convolución requiere que F(t) e I(t) se midan bajo las mismas condiciones experimentales.

Para el ajuste de la curva de decaimiento se reconvoluciona la curva modelo, D(t), con la función de respuesta del instrumento, I(t). La función así obtenida, Y(t), se compara por el método de mínimos cuadrados con la experimental F(t). La bondad del ajuste se mide mediante el parámetro estadístico χ^2:

$$\chi^2 = \sum_i \left[\frac{Y(t) - F(t)}{\sigma(t)} \right]^2 \qquad (13)$$

donde $\sigma(t)$ es la incertidumbre estadística de los puntos Y(t), es decir

$$\chi^2 = \sum_i \left[\frac{desviación\ observada}{desviación\ esperada} \right]^2 \qquad (14)$$

el procedimiento se repite hasta obtener la curva D(t) que de el menor valor posible de χ^2.

La bondad del ajuste puede estimarse también mediante el análisis de la función residual R(t):

$$R(t) = \frac{Y(t) - F(t)}{\sigma(t)} \qquad (15)$$

que se relaciona con χ^2 mediante:

$$\chi^2 = \sum_i [R(t)]^2 \qquad (16)$$

Habitualmente, las curvas de decaimiento de fluorescencia experimentales se ajustaron por reconvolución iterativa con la de la lámpara a una expresión exponencial del tipo:

$$F(t) = \sum_i \alpha_i \exp(-t/\tau_i) \qquad (17)$$

en la que α_i son las amplitudes o contribuciones relativas de cada especie a la señal de emisión, y τ_i los tiempos de vida. La calidad de los ajustes se analizó mediante el parámetro estadístico χ^2 y la inspección visual de los residuos. Cada curva se repitió al menos dos veces.

A modo de ejemplo, en la Figura 1 se muestran los ajustes a funciones mono-, Figura 1a, y biexponencial, Figura 1b, del decaimiento de la fluorescencia de una disolución de MBC (~ 10^{-5} M) y HFIP (4.8 10^{-3} M) en una mezcla al 20% v/v de tolueno-ciclohexano (λ_{exc} = 325 nm; λ_{em} = 450 nm). La curva experimental se muestra en trazo rojo, la lámpara en azul y la función residual en verde. La línea teórica resultante del ajuste es la de trazo continuo. La inspección visual de la curva residual indica claramente que el ajuste mejora sensiblemente al pasar de la función mono- (χ^2 = 5.043) a la biexponencial (χ^2 = 1.088).

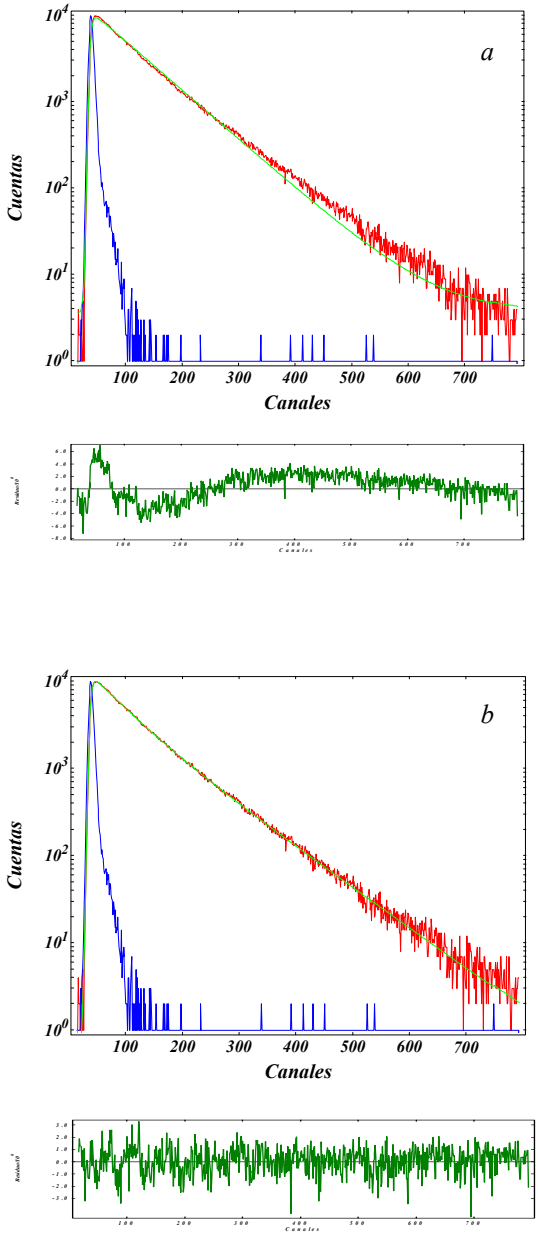


Figura 1.- Ajustes mono- (a) y biexponencial (b) del decaimiento de fluorescencia de una disolución de MBC (~ 10^{-5} M) y HFIP (4.8 10^{-3} M) en una mezcla al 20% v/v de tolueno-ciclohexano (λ_{exc} = 325 nm; λ_{em} = 450 nm).

Puesto que los parámetros α_i y τ_i están correlacionados, a medida que aumenta el número i de componentes se hace cada vez más imprecisa su determinación y, por tanto, la resolución de la curva de decaimiento. El ajuste se complica aún más cuando los tiempos de vida τ_i de los componentes del ajuste son muy parecidos o sus contribuciones son muy diferentes. En algunos casos, se puede mejorar el ajuste mediante el *análisis global* (*Lakowicz, 1991 y 1999*) de un conjunto de curvas de decaimiento correspondientes a varias medidas experimentales relacionadas. Los parámetros ajustables del análisis global pueden ser diferentes o estar vinculados en todas las medidas. El análisis global, además de mejorar la resolución del ajuste, tiene en cuenta implícitamente la correlación existente entre los parámetros obtenidos y la de éstos con los datos experimentales. En nuestros experimentos, cuando fue necesario realizar análisis globales de las curvas de decaimiento, se utilizó el programa estándar Level 2 de Edinburgh Analytical Instrument.

4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.1.- Anhidrobase de la betacarbolina, BCA.

4.1.1- Propiedades espectrales y fotofísicas de la BCA.

La BCA presenta un solvatocromismo tan acentuado que se puede observar a simple vista. Así, el color amarillo pálido de las disoluciones de BCA en disolventes tan poco polares como n-hexano o ciclohexano, cambia bruscamente a amarillo-anaranjado en disolventes algo más polares como tolueno. En la Figura 2 se muestran los espectros de absorción de la BCA en disolventes apróticos de diferente polaridad. Estos espectros sólo tienen un valor cualitativo ya que, dada la escasa solubilidad de la BCA, se refieren a disoluciones casi saturadas de concentraciones desconocidas.

Los espectros de absorción de la BCA en estos disolventes apróticos muestran una primera banda, A_1, de intensidad media centrada a 290 nm y una segunda banda, A_2, mucho más débil y estructurada, en la región de 330-350 nm. A medida que aumenta la polaridad del disolvente se hace claramente perceptible una tercera banda, A_3, a 450 nm, que por su posición y débil intensidad podría tener su origen en un proceso ICT.

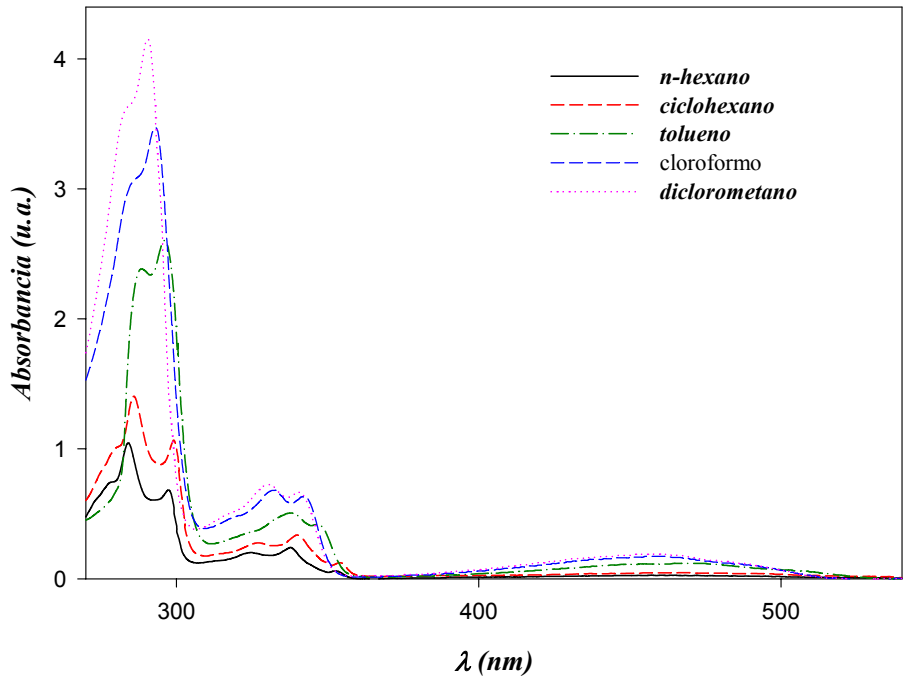


Figura 2.- Espectros de absorción UV-Vis de la BCA en diferentes disolventes.

La inspección detallada de estos espectros pone de relieve la profunda y desconcertante influencia que ejerce la polaridad del disolvente sobre el espectro de absorción de la BCA. Así, al pasar de n-hexano a ciclohexano, las bandas de absorción se desplazan ligeramente al rojo sin que cambien significativamente sus

estructuras. Por el contrario, cuando se pasa de ciclohexano a tolueno o a otros disolventes más polares cambian las estructuras de las bandas de absorción y se desplazan al azul.

Con objeto de observar con mayor detalle estos cambios espectrales, se registraron los espectros de absorción de disoluciones de concentración fija de BCA en n-hexano conteniendo diferentes proporciones de tolueno. Como se muestra en la Figura 3, al aumentar la proporción de tolueno cambian completamente los perfiles de las bandas de absorción y se desplazan al azul. Estos resultados parecen indicar que se produce un cambio en la estructura de la BCA cuando aumenta la polaridad del medio.

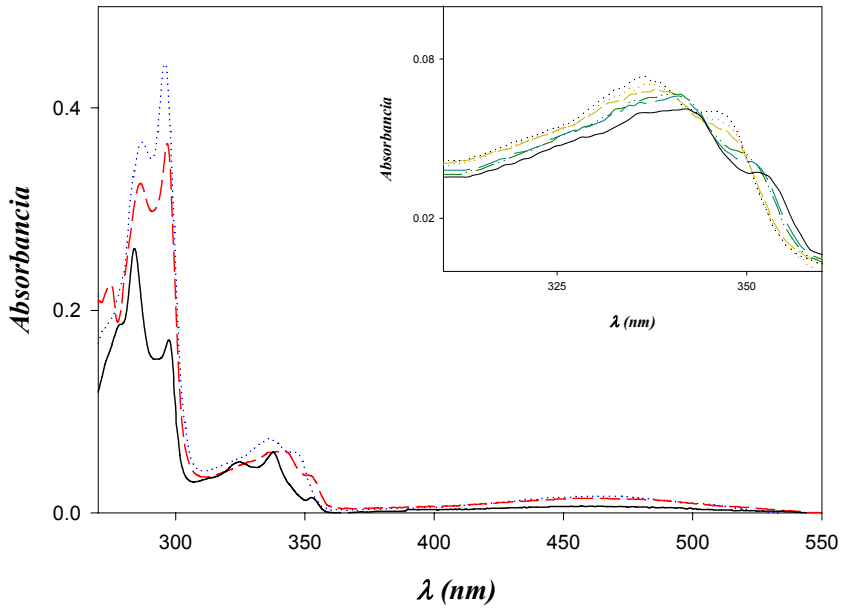


Figura 3.- Espectros de absorción UV-Vis de la BCA en mezclas n-hexano-tolueno con diferentes proporciones de tolueno: (—) 0% v/v, (- -) 50% v/v y (····) 100% v/v. En el interior, influencia de la proporción de tolueno desde 10% (—) a 100% (····) en la banda de absorción A_2.

Esta hipótesis cobra mayor sustento cuando se comprueba, Figura 4, que las interacciones por puente de hidrógeno de la BCA con HFIP desplazan el espectro de absorción de la BCA al rojo en ciclohexano y al azul en tolueno. Este resultado demuestra claramente que en el estado fundamental de la BCA debe establecerse un equilibrio entre dos especies isómeras cuyas proporciones relativas cambian con la polaridad del medio.

Por otra parte, la presencia de puntos isosbésticos en los espectros de la Figura 4 indica que cada uno de los supuestos isómeros de la BCA forma sus propios complejos de puente de hidrógeno con HFIP. Estos complejos se estudiarán en el siguiente apartado de este capítulo.

Otro aspecto muy notable de la fotofísica de la BCA es que su fluorescencia en disolventes apróticos muestra doble emisión, Figura 5, con una banda a longitudes de onda cortas, F_1, estructurada y moderadamente intensa, y otra, a longitudes de onda mucho más largas, F_2, ancha y muy débil. Las intensidades, perfiles y posiciones de estas bandas de emisión cambian con la longitud de onda de excitación y con la polaridad del disolvente. Estos resultados apuntan, de nuevo, a la existencia de una heterogeneidad en el estado fundamental de la BCA. Es importante señalar que cuando se excita la banda A_3 del espectro de absorción sólo se observa en el espectro de emisión la banda F_2.

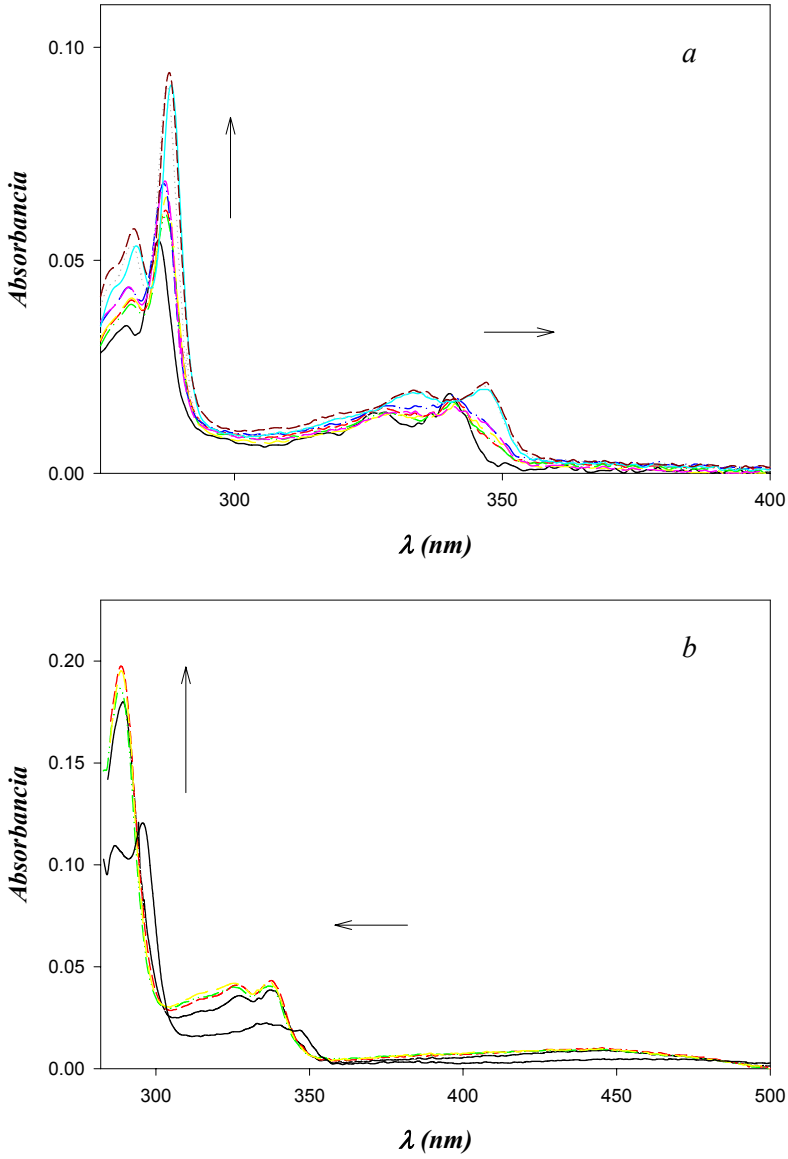


Figura 4.- Espectro de absorción UV-Vis del sistema BCA-HFIP (0-10^{-3} M) en (a) ciclohexano y (b) tolueno. Las flechas indican los desplazamientos espectrales con el aumento de la concentración de HFIP.

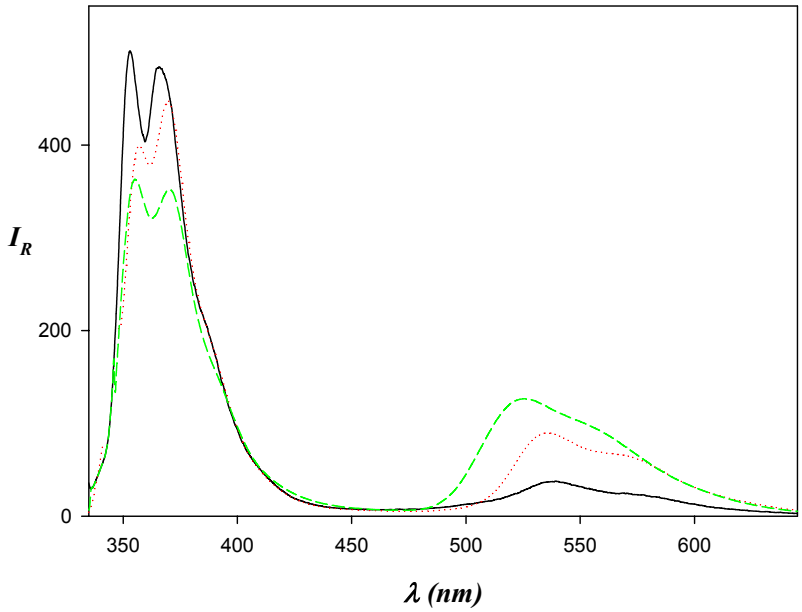


Figura 5.- Espectros de fluorescencia, λ_{exc} = 335 nm, de la BCA en n-hexano (---), tolueno (····) y N,N-dimetilformamida (- - -).

Los espectros de excitación proporcionan la prueba experimental que confirma definitivamente la heterogeneidad de la BCA en su estado fundamental. Así, los resultados experimentales indican que el espectro de excitación de la BCA cambia con la polaridad del medio y con la longitud de onda de emisión, Figuras 6 y 7. Cabe destacar que los espectros de excitación obtenidos en los bordes azul y rojo de las bandas de emisión F_1 y F_2 son diferentes, Figura 7, lo que indica que se trata de bandas compuestas, resultantes del solapamiento de otras emisiones más simples.

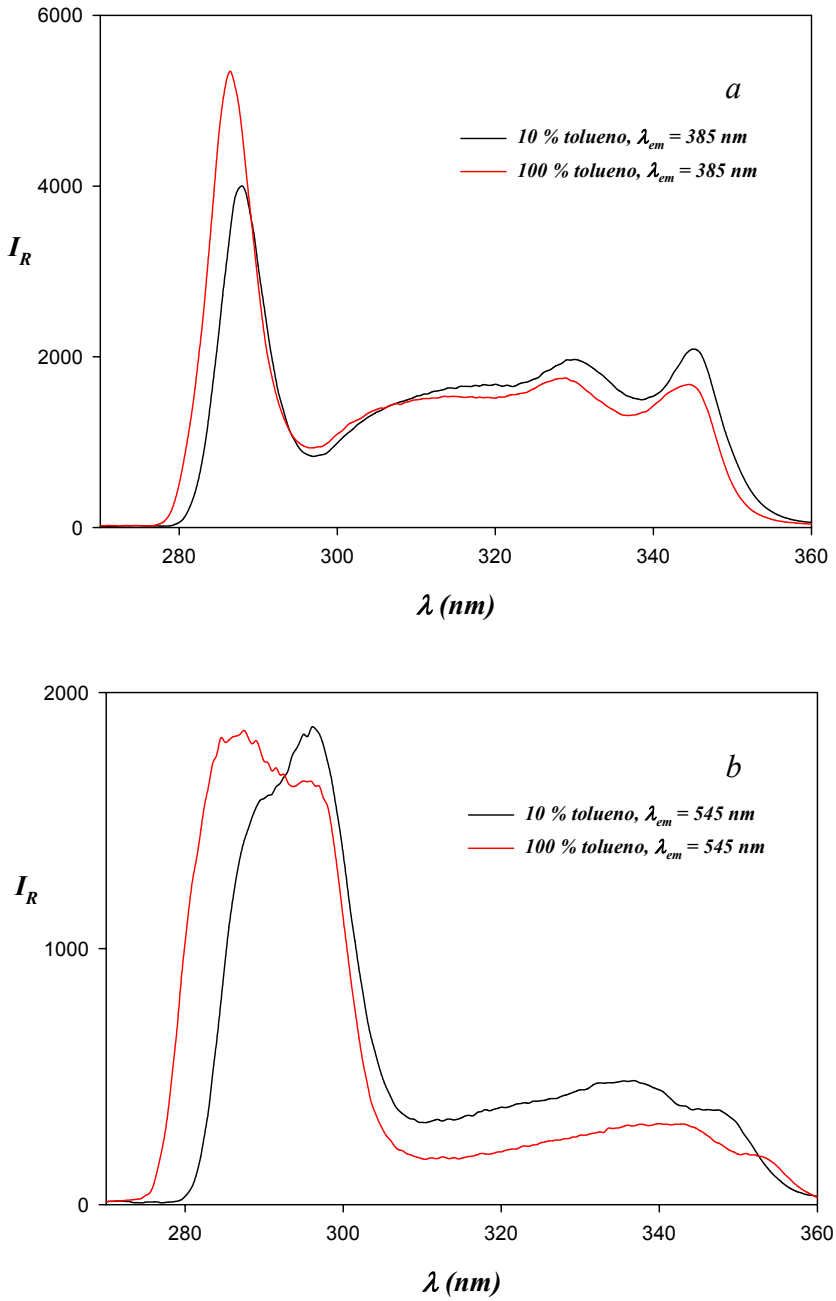


Figura 6.- Espectros de excitación de la BCA en mezclas n-hexano-tolueno.

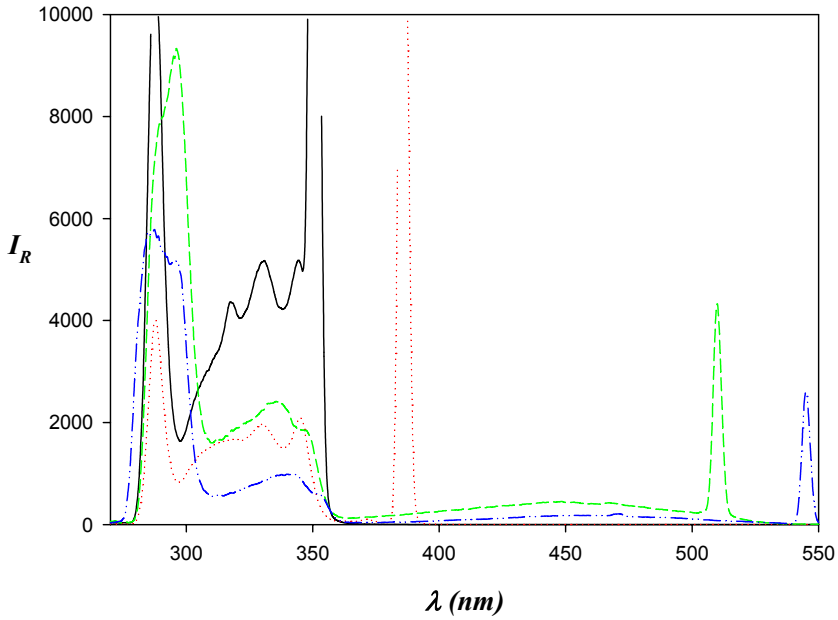


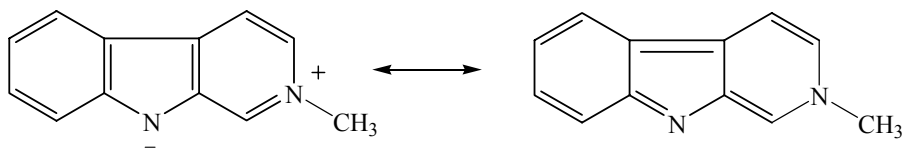
Figura 7.- Espectros de excitación de la BCA en mezclas n-hexano-tolueno al 90% v/v en tolueno medidos a las longitudes de onda de emisión: 350 nm (—), 385 nm (···), 510 nm (---) (I_Rx5) y 545 nm (-··-) (I_Rx5).

Dada la escasa solubilidad y el bajísimo rendimiento cuántico de la BCA en las mezclas n-hexano-tolueno, no se han podido estudiar con la profundidad deseada los decaimientos de fluorescencia de la BCA en estos medios. No obstante, los escasos resultados obtenidos indican que, en n-hexano y tolueno, la fluorescencia de la banda F_1 de la BCA decae biexponencialmente con tiempos de vida en torno a 1 ns y 3 ns, respectivamente. La contribución relativa del componente con tiempo de vida más corto disminuye al pasar de n-hexano a

tolueno, mientras que la del tiempo de vida más largo aumenta. Desgraciadamente, no se han podido obtener datos fiables del decaimiento de la fluorescencia en la banda F_2.

Nuestros resultados experimentales ponen claramente de manifiesto que la BCA posee un complejo comportamiento fotofísico. Por una parte, estos resultados demuestran concluyentemente que, en el estado fundamental de la BCA, se establece un equilibrio entre dos especies isómeras y, por otra, que cada isómero emite doble fluorescencia con bandas a cortas, F_1, y largas, F_2 longitudes de onda.

Armit y Robinson (1925) sugirieron, hace ya mucho tiempo, que las anhidrobases de las carbolinas deberían representarse, tal como se muestra en el Esquema 14, mediante el equilibrio de dos híbridos de resonancia con estructuras quinonoide, Q, y zwiteriónica, Z. El peso relativo de cada forma resonante sería un índice de la tendencia que tiene la anhidrobase para mantener el sexteto aromático o para neutralizar las cargas eléctricas en la molécula.



Z Q

Esquema 14.- Estructuras zwiteriónica, Z, y quinonoide, Q, de la BCA.

Antes de relacionar este equilibrio de resonancia con el experimental, conviene recordar que los híbridos de resonancia son artificios conceptuales que, al carecer de realidad física, no son experimentalmente observables. En la teoría cuántica de Enlace-Valencia, el concepto de híbrido de resonancia está asociado con la función de onda molecular que da la distribución promedia de la carga electrónica de la molécula. Según este modelo teórico, las diferentes estructuras

resonantes de una molécula tienen las mismas configuraciones electrónicas y nucleares, el mismo número de electrones desapareados y energías muy parecidas.

No obstante, como resulta prácticamente imposible explicar razonablemente las características espectroscópicas de la BCA sin recurrir a estructuras de tipo quinonoide y zwiteriónica, se hace necesario admitir la existencia real de dichas especies. Es decir, postularemos que estas especies Q y Z no son híbridos de resonancia, sino formas isómeras de la BCA, físicamente observables, con diferentes configuraciones electrónicas y nucleares y, por tanto, con diferentes energías. Lógicamente, estas diferencias tendrían su origen en los cambios electrónicos que experimentan los átomos de nitrógeno pirrólico y piridínico al pasar de la forma Q a la Z. Además, como el anillo π de la BCA está constituido por 13 átomos y 14 electrones, cabría la posibilidad de que los isómeros Q y Z tuviesen diferente número de electrones desapareados. De hecho, el abrupto cambio de color que se produce al pasar de Q a Z se podría relacionar con el que típicamente tiene lugar en una reacción birradical-zwiterión.

Dadas las distintas geometrías y configuraciones electrónicas de los isómeros Q y Z, cabe esperar que sus momentos dipolares sean muy diferentes. Por tanto, sus estabilidades y proporciones relativas en el estado fundamental se verán afectadas al cambiar la polaridad del medio. De esta forma, el isómero Z, de mayor momento dipolar, será la especie predominante en los disolventes más polares y el Q, de menor momento dipolar, en los de menor polaridad.

Los cambios de polaridad del medio y las interacciones por puente de hidrógeno provocarán, además, diferentes desplazamientos solvatocrómicos en los espectros de cada isómero. Estos desplazamientos estarán relacionados con las variaciones que experimenten sus momentos dipolares en el proceso de excitación. Así, el desplazamiento al rojo que se observa en el espectro de absorción del isómero Q cuando interacciona por puente de hidrógeno con HFIP, indica que su momento dipolar es mayor en el estado excitado que en el fundamental. Por el contrario, el desplazamiento al azul del espectro del isómero Z indica que su momento dipolar disminuye tras el proceso de excitación. En este

punto, conviene recordar que los desplazamientos al rojo y al azul suelen atribuirse típicamente a transiciones ππ* y nπ*, respectivamente *(Mataga y Kubota, 1970)*.

La doble fluorescencia de los isómeros de la BCA sugiere que cada una de estas especies emite desde dos estados excitados diferentes. En este sentido, es interesante comprobar que, como se muestra en la Figura 8, las bandas de emisión F_1 de los isómeros experimentan pequeños desplazamientos Stokes y son imágenes especulares de sus correspondientes bandas de absorción A_2. Esto implica que, tras la excitación a este estado F_1, las geometrías de las moléculas no cambian significativamente. Por el contrario, los grandes desplazamientos Stokes de las bandas F_2 hacen suponer que en este estado excitado se ha producido un importante cambio en las estructuras geométricas de las moléculas.

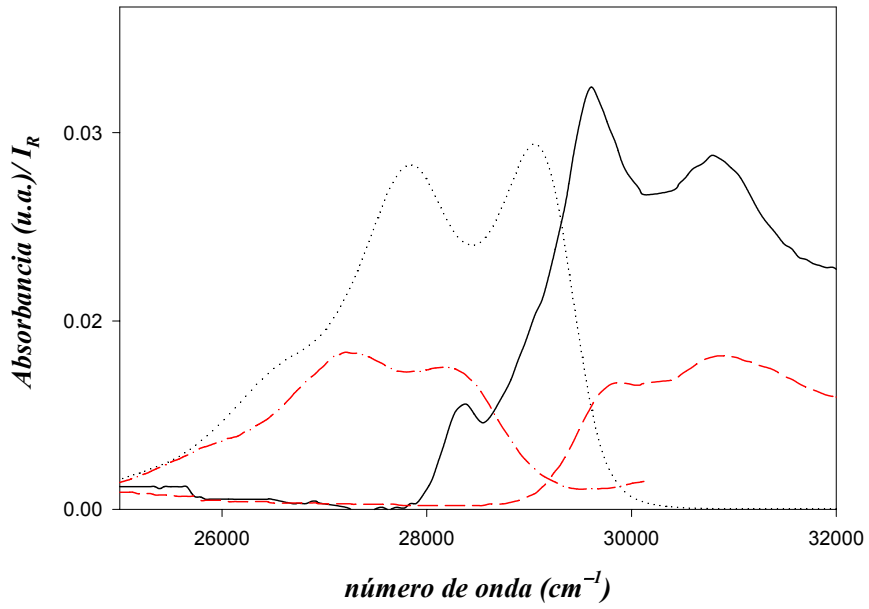


Figura 8.- Desplazamientos Stokes de los espectros de la BCA en n-hexano (absorción (—), emisión (····)) y en tolueno (absorción (- -), emisión (-··-)).

Desde los pioneros estudios de *Lippert y col. (1961, 1962)* sobre la anómala fluorescencia del 4-(N,N-dimetilamino)-benzonitrilo, el fenómeno de doble emisión se suele asociar a procesos ICT en el estado excitado. Los cambios que producen estos procesos en las estructuras electrónicas de las moléculas suelen ir acompañados generalmente de importantes modificaciones geométricas *(Grabowski y col., 2003)*. Según ésto, las dobles emisiones de los isómeros de la BCA se podrían atribuir a procesos ICT en el estado excitado entre sus átomos de nitrógeno pirrólico y piridínico. Lógicamente, en el isómero Q la ICT se produciría del nitrógeno piridínico al pirrólico y en el Z en sentido contrario. Estos procesos ICT permitirían explicar además las débiles bandas que aparecen en los espectros de absorción de estos isómeros a largas longitudes de onda.

Como se mencionó en la Introducción, en nuestro reciente estudio de la anhidrobase de la δ-carbolina, DCA, otra molécula que también presenta doble emisión de fluorescencia y desplazamientos al azul de su espectro de absorción al aumentar la polaridad del disolvente *(Balón y col., 2004),* propusimos un modelo fotofísico, Esquema 12, en el que los procesos ICT jugaban un papel muy importante. Según este modelo, que es una adaptación del propuesto previamente para la δ-carbolina, DC, *(Balón y col., 2002),* el acoplamiento de los estados excitados L_a y L_b de más baja energía de la DCA daba lugar a una superficie de energía potencial con dos mínimos: uno localmente excitado, LE, y otro de transferencia de carga, CT.

Si asumimos que este modelo se puede aplicar también a los isómeros de la BCA, la absorción de un pulso de luz promovería a Q o a Z desde su estado fundamental hasta su estado localmente excitado, LE, via una transición vertical de Franck-Condon. Tras la excitación, la rápida redistribución de carga que origina el proceso ICT entre los átomos de nitrógeno pirrólico y piridínico desplaza la configuración nuclear de la molécula hacia el estado CT. De esta forma, las moléculas excitadas emiten fluorescencia F_1 desde el estado LE, o se desplazan sobre la superficie de energía potencial para emitir fluorescencia F_2 desde la nueva posición de equilibrio CT.

De acuerdo con este modelo, las débiles bandas de absorción, A_3, desplazadas al rojo en los espectros de absorción de la BCA serían debidas a las moléculas vibrónicamente "calientes" que experimentan ICT en el estado fundamental y que, por tanto, tienen la geometría adecuada para alcanzar por excitación directa el estado excitado CT. De hecho, como indican los resultados experimentales, la excitación de esta banda sólo da lugar a emisión F_2.

Aunque, en principio, este modelo sería aplicable tanto al isómero Q como al Z, dadas las diferencias fotofísicas entre ambos isómeros, es evidente que el origen y la naturaleza de sus estados excitados LE y CT debe ser muy diferente. Así, los desplazamientos al rojo y al azul de los espectros de absorción de Q y Z, respectivamente, inducen a pensar que mientras que el estado LE del isómero Q tiene su origen en una transición $\pi\pi^*$ el del isómero Z procede de una transición $n\pi^*$. Lógicamente, en esta transición $n\pi^*$ estaría involucrado el par de electrones solitario del nitrógeno pirrólico. Así pues, mientras que la superficie de energía potencial S_1 del isómero Q sería similar a la de la DC *(Balón y col, 2002),* la del isómero Z se parecería a la de la DCA *(Balón y col., 2004b)*.

Según ésto, los cambios de polaridad del disolvente y las interacciones por puente de hidrógeno afectarán de forma diferente a las superficies de energía potencial de los estados S_0 y S_1 de cada isómero. Es decir, mientras que, en el caso del isómero Q, el aumento de la polaridad del disolvente y los puentes de hidrógeno estabilizarán preferentemente al estado S_1 frente al S_0, produciendo un desplazamiento al rojo en la transición S_0-S_1, en el caso del isómero Z sucederá justamente lo contrario. Por otra parte, los cambios de polaridad del disolvente y los puentes de hidrógeno modificarán la barrera de energía entre los estados LE y CT, cambiando sus poblaciones relativas y modificando las intensidades de sus respectivas emisiones de fluorescencia.

En nuestro estudio sobre la DCA propusimos que la relajación geométrica LE→CT transformaba la estructura zwiteriónica totalmente aromática del estado LE en otra quinonoide parcialmente aromática del estado CT. Esta hipótesis se justificaba suponiendo que, durante el proceso ICT, el átomo de nitrógeno

piridínico cambia su estado de hibridación sp^2 a sp^3 a fin de acomodar mejor el aumento de su densidad de carga electrónica. Lógicamente, esta rehibridación daría lugar a la consiguiente salida del plano de dicho átomo de nitrógeno. Algo parecido sucede en la piridina, cuyo estado excitado $S_1(n\pi^*)$ tiene una geometría tipo "bote" no plana *(Chachisvilis y Zewail, 1999)*.

Como las emisiones F_2 de ambos isómeros de la BCA son muy parecidas, sería razonable pensar que la relajación del estado excitado LE del isómero Q también rompe la aromaticidad y planaridad del anillo de la BCA. Siguiendo de nuevo el modelo de la piridina, el estado LE del isómero Q de la BCA podría seguir una dinámica similar a la del estado excitado S_2 ($\pi\pi^*$) de la piridina para dar fotoproductos prefulvénicos de geometría no plana (*Chachisvilis y Zewail, 1999; Cai y Reimers, 2002).* La comparación entre los estados excitados del anillo de betacarbolina y de piridina no carece de fundamento, ya que, como se demostró en anteriores trabajos de nuestro grupo de investigación, las mitades indólica y piridínica retienen, en gran medida, sus características individuales en el anillo de betacarbolina *(Balón y col., 1993)*.

4.1.2.- Interacciones por puente de hidrógeno de la BCA con 1,1,1, 3,3,3-hexafluoro-2-propanol, HFIP, en ciclohexano y tolueno.

Como se ha indicado anteriormente, la adición de HFIP produce importantes modificaciones en los espectros de absorción de la BCA. La desaparición de ciertas bandas, la formación de otras nuevas y la existencia de puntos isosbésticos en los espectros, indican que los isómeros de la BCA y el HFIP forman diferentes tipos de complejos enlazados por puente de hidrógeno. Las diferencias entre los espectros medidos en ciclohexano y en tolueno, Figura 4, indican que cada isómero de la BCA forma sus propios tipos de complejos con HFIP.

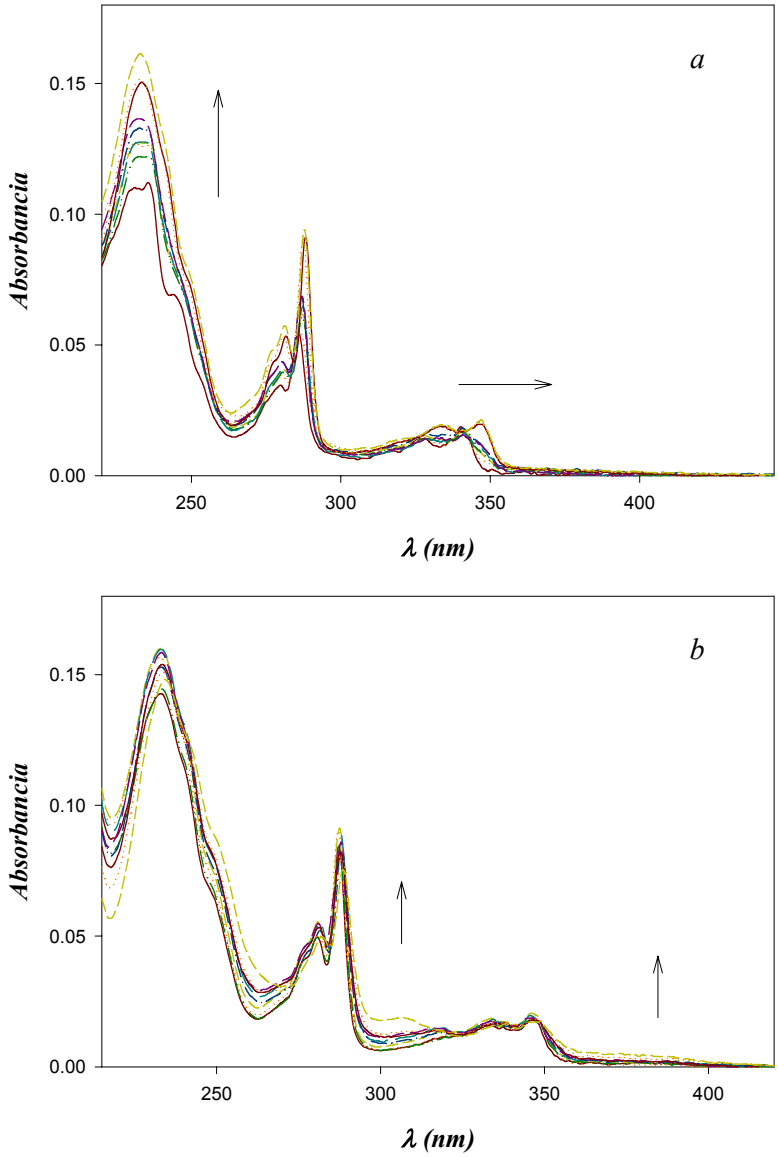


Figura 9.- Espectros de absorción del sistema BCA-HFIP en ciclohexano en los rangos bajo (0- 9.6 10^{-3} M) (a) y alto (9.6 10^{-3}- 8.6 10^{-2} M) (b) de concentraciones de HFIP.

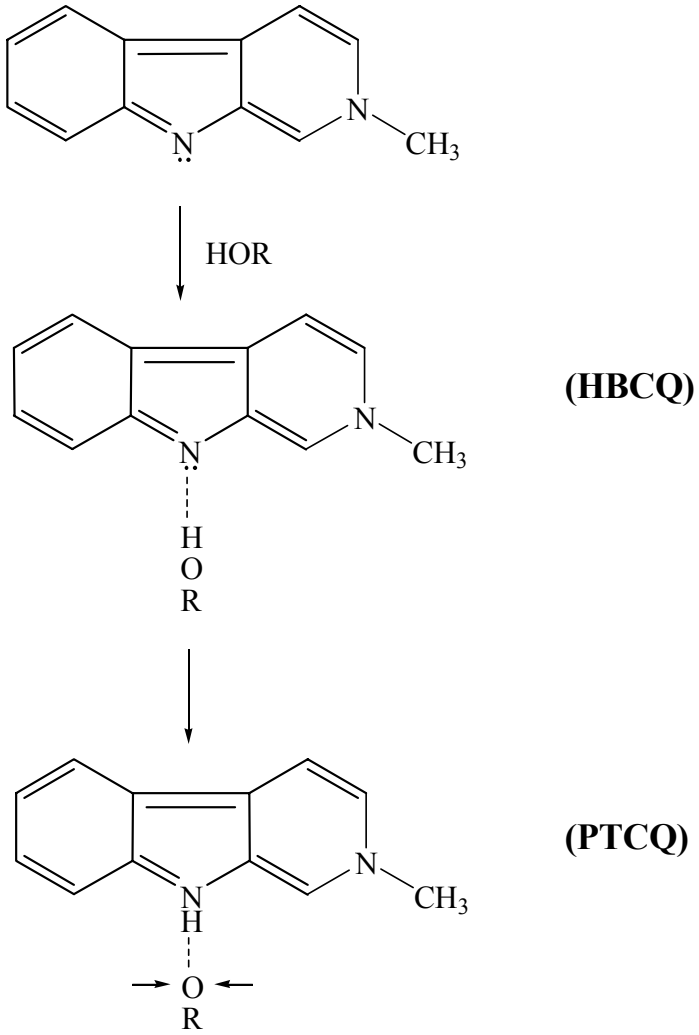
De la inspección de los espectros de absorción de la BCA en ciclohexano, Figura 9, se deduce que el isómero Q de la BCA, la especie predominante en este disolvente, forma dos complejos con HFIP. El primero, a bajas concentraciones de HFIP, aumenta la intensidad de las bandas a menores longitudes de onda de la BCA y desplaza al rojo la banda a mayores longitudes de onda. El segundo, a más altas concentraciones de HFIP, disminuye ligeramente la intensidad de la banda a más cortas longitudes de onda, aumenta la absorbancia a 300 nm, desplaza batocrómicamente la banda a mayores longitudes de onda y da lugar a una cola de absorción a largas longitudes de onda.

Según el modelo clásico de interacción por puente de hidrógeno *(Barrow, 1960; Jeffrey y Saenger, 1991; Szafran, 1996)*, el que se forme un complejo a bajas y otro a altas concentraciones de dador, se podría explicar asumiendo que existen dos mínimos en la superficie de energía potencial del enlace de hidrógeno entre el grupo OH del alcohol y el par de electrones solitarios del átomo de nitrógeno pirrólico de la BCA. En uno de estos mínimos, el protón estaría próximo al átomo de oxígeno del alcohol, y en el otro, al átomo de nitrógeno pirrólico de la BCA. Estos complejos, que llamaremos HBC y PTC, respectivamente, representarían las formas límites, covalente $N^{\cdots}HO$, HBC, e iónica $NH^{+\cdots}O^{-}$, PTC, del puente de hidrógeno. La adición de una nueva molécula de dador contribuiría a estabilizar por solvatación la estructura de par iónico del PTC, Esquema 15.

Los valores de las constantes de formación de los complejos HBCQ y PTCQ obtenidos de las representaciones Benesi-Hildebrand de los datos de absorbancia a bajas y altas concentraciones de HFIP, Figura 10, son >3000 M^{-1} y 12±1 M^{-1}, respectivamente.

Como cabe esperar, la formación de estos complejos HBCQ y PTCQ produce importantes modificaciones en el espectro de emisión de la BCA, Figura 11. Así, el HBCQ aumenta la intensidad y desplaza al rojo la banda F_1 del espectro de emisión, mientras que el PTCQ amortigua la intensidad de

fluorescencia F_1 e intensifica la F_2. Como se muestra en el interior de la Figura 11b, la banda F_1 del PTCQ está ligeramente desplazada al rojo con respecto a la del HBCQ.



Esquema 15.- Interacciones por puente de hidrógeno del isómero Q de la BCA con HFIP.

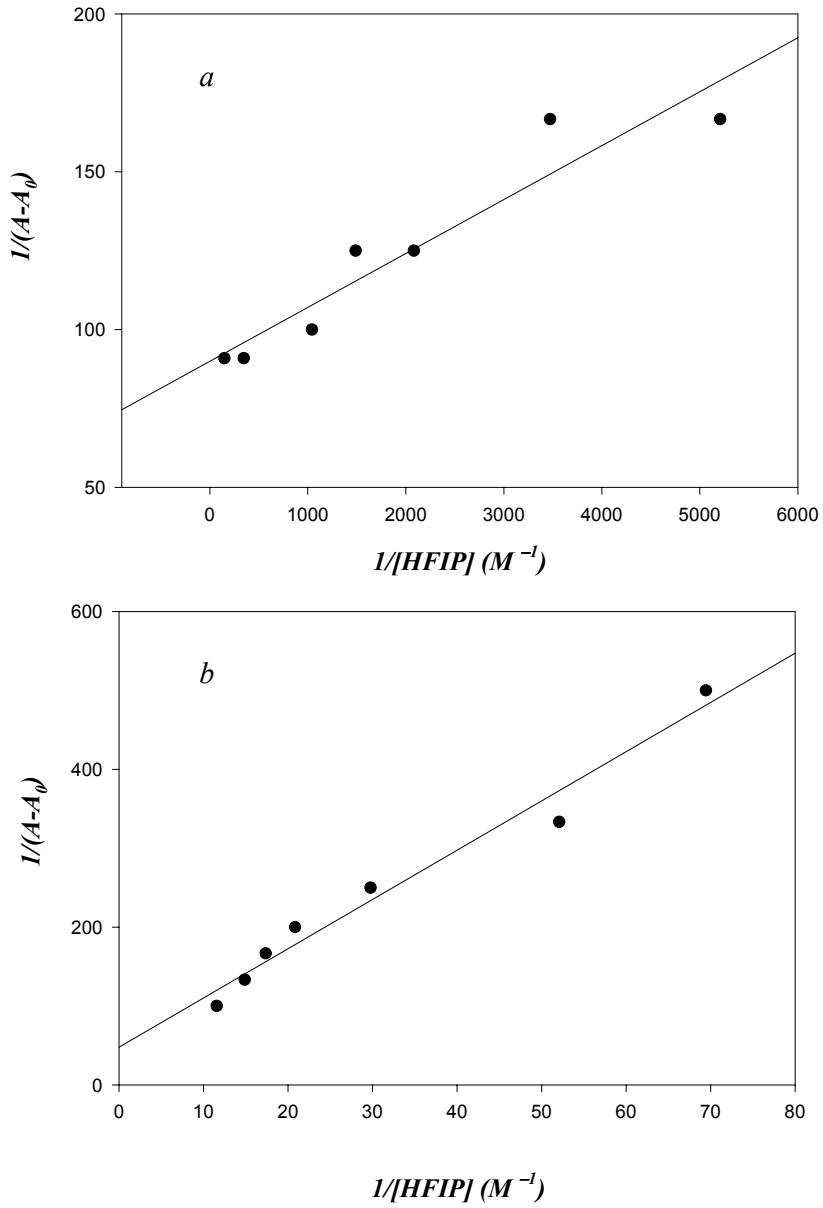


Figura 10.- Representaciones Benesi-Hildebrand de los datos de absorbancia del sistema BCA-HFIP en ciclohexano en los rangos: bajo (a) y alto (b) de concentraciones de HFIP.

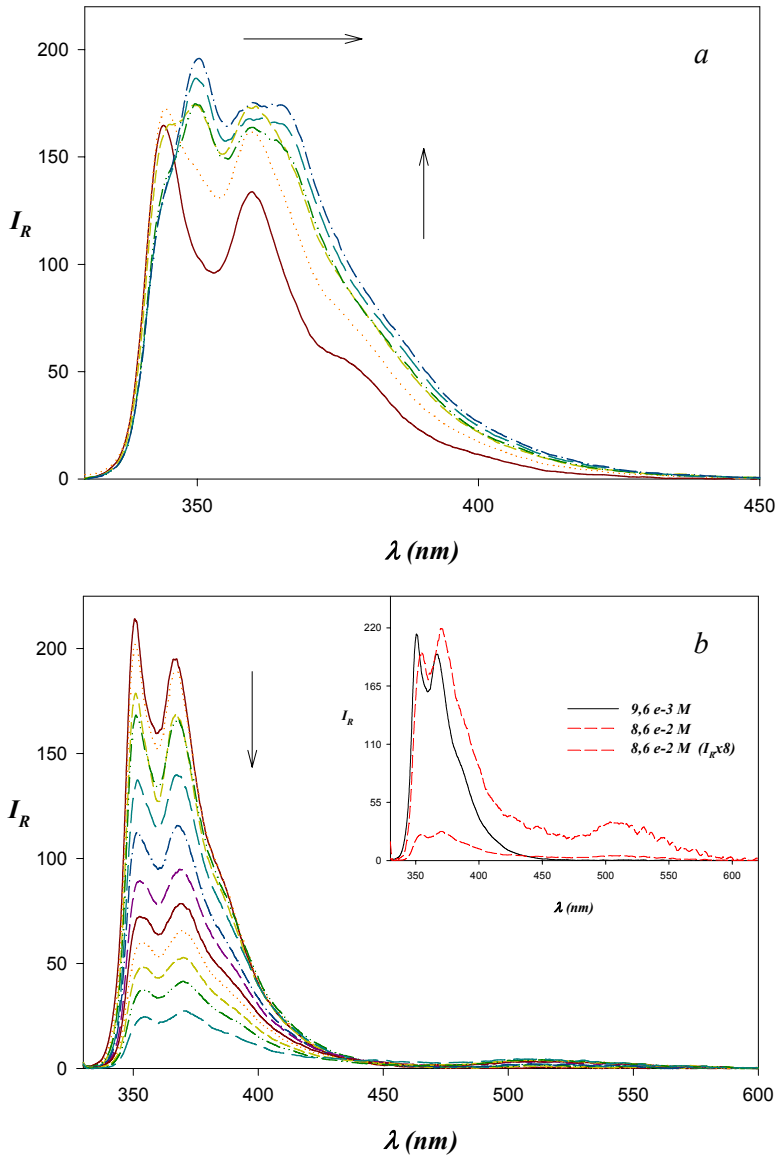


Figura 11.- Espectros de emisión del sistema BCA-HFIP en ciclohexano en los rangos de concentración de HFIP bajo (0- 4.8.10^{-4} M) (a) y alto (4.8 10^{-3}- 8.6 10^{-2} M) (b). En el interior de la Figura (b): Comparación de los espectros de emisión de la BCA antes (--) y después (----)del proceso de amortiguación.

Como se muestra típicamente para la banda F_1 en la Figura 12, las representaciones Benesi-Hildebrand construidas a partir de las áreas bajo las bandas F_1 y F_2, en el rango alto de concentraciones de HFIP, dan líneas rectas. Las constantes de formación que se obtienen a partir de estas representaciones, 15±1 M^{-1} y 17±2 M^{-1}, respectivamente, son del mismo orden de magnitud que la obtenida a partir de los datos de absorción. De estos resultados se puede concluir, por una parte, que el proceso de amortiguación de la fluorescencia tiene un carácter estático y, por otra, que las variaciones de las bandas F_1 y F_2 están acopladas, es decir, que corresponden a la misma especie.

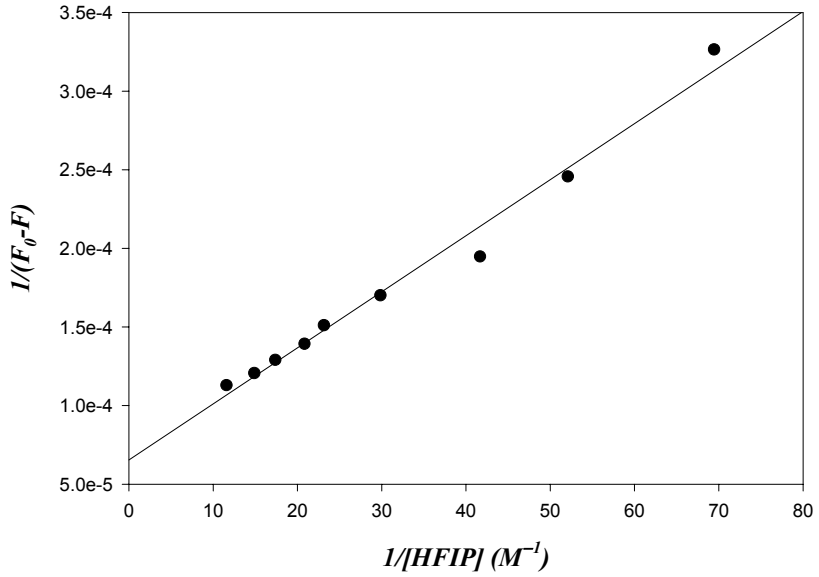


Figura 12.- Representación Benesi-Hildebrand de los datos de emisión de la banda F_1 del sistema BCA-HFIP en ciclohexano a altas concentraciones de HFIP.

El aumento de intensidad que experimenta la banda de emisión F_2 cuando se forma el PTCQ se puede tomar como una indicación de que el proceso ICT desde el nitrógeno piridínico al pirrólico debe estar muy favorecido en este complejo. Es decir, que la formación del PTCQ favorece el proceso de relajación LE→CT. Como veremos a continuación, los resultados de fluorescencia con resolución temporal apoyan esta suposición.

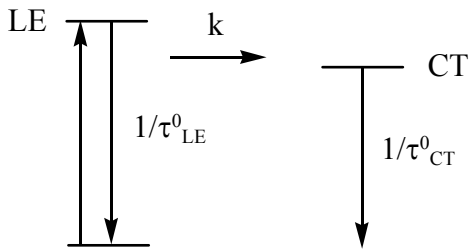
Así, a las altas concentraciones de HFIP en las que el complejo PTCQ es la especie mayoritaria en el estado fundamental, la fluorescencia de la banda F_2, medida a λ_{em} de 520 nm, decae biexponencialmente con un tiempo, τ_1, que disminuye al aumentar la concentración de HFIP, y otro, τ_2, de 4.2 ns que permanece constante, Tabla 1. Los factores preexponenciales de estos tiempos son iguales y de signo contrario.

TABLA 1.- Ajustes biexponenciales de las curvas de decaimiento del sistema BCA-HFIP en ciclohexano, λ_{exc}= 340 nm, λ_{em}= 520 nm.

10^2 [HFIP]/ M	τ_1/ns	τ_2/ns
2.88	1.99(-0.108)	4.09(0.127)
3.84	1.60(-0.087)	4.30(0.107)
4.80	1.34(-0.094)	4.03(0.104)
5.50	1.21(-0.098)	4.10(0.101)

De acuerdo con nuestro modelo, el que τ_1 aparezca con factor preexponencial negativo indica que el estado CT no se alcanza directamente desde el estado fundamental por absorción de luz, sino que su precursor es el estado excitado LE. Además, como el tiempo de 4.2 ns se mantiene constante al variar la

concentración de HFIP podemos concluir que, como se muestra en el Esquema 16, la etapa LE→CT es irreversible



Esquema 16.- Modelo cinético para la transformación LE→CT.

Según el mecanismo del Esquema 16, las inversas de los tiempos de vida experimentales, λ_1 y λ_2, se relacionarían con los tiempos de vida de los estados LE, τ^0_{LE}, y CT, τ^0_{CT}, mediante las ecuaciones:

$$\lambda_1 = \frac{1}{\tau^0_{LE}} + k\left[HFIP\right] \qquad (18)$$

$$\lambda_2 = \frac{1}{\tau^0_{CT}} \qquad (19)$$

donde k es la constante bimolecular de la transformación LE→CT. De acuerdo con la predicción teórica, los valores experimentales de λ_1 varían linealmente con la concentración de HFIP, Figura 13. De la pendiente de esta representación se obtiene un valor para k de (1.24±0.02) 10^{10} M^{-1} s^{-1} y de la ordenada en el origen τ^0_{LE} = 6.2 ns. Finalmente, conviene resaltar que el valor medido para el tiempo de vida τ^0_{CT} de la especie que emite sobre 500 nm, 4.2 ns, concuerda, de forma excelente, con el valor publicado por otros autores para la especie zwiteriónica de la betacarbolina.

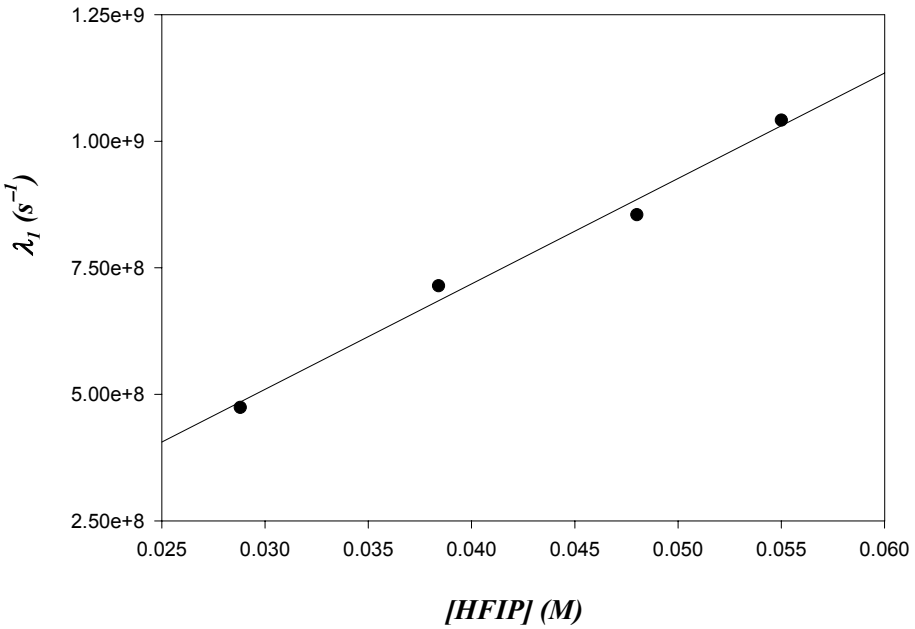


Figura 13.- Representación de λ_1 vs [HFIP] para el sistema BCA-HFIP en ciclohexano.

Cualitativamente, los cambios espectrales del sistema BCA-HFIP en tolueno son completamente diferentes a los que se observan en ciclohexano. En este disolvente, donde la BCA se encuentra predominantemente en su forma isómera Z, la adición de pequeñas cantidades de HFIP, $0\text{-}10^{-4}$ M, produce un efecto hipercrómico en las principales bandas de absorción y desaparece la estructura de la banda en torno a 290 nm, Figura 14a. Posteriormente, a concentraciones de HFIP más altas, desaparecen las bandas a 340 nm y 450 nm y se forman, simultáneamente, nuevas bandas a 310 nm y 380 nm, Figura 14b. El espectro de la mezcla final es típico del catión de la BC.

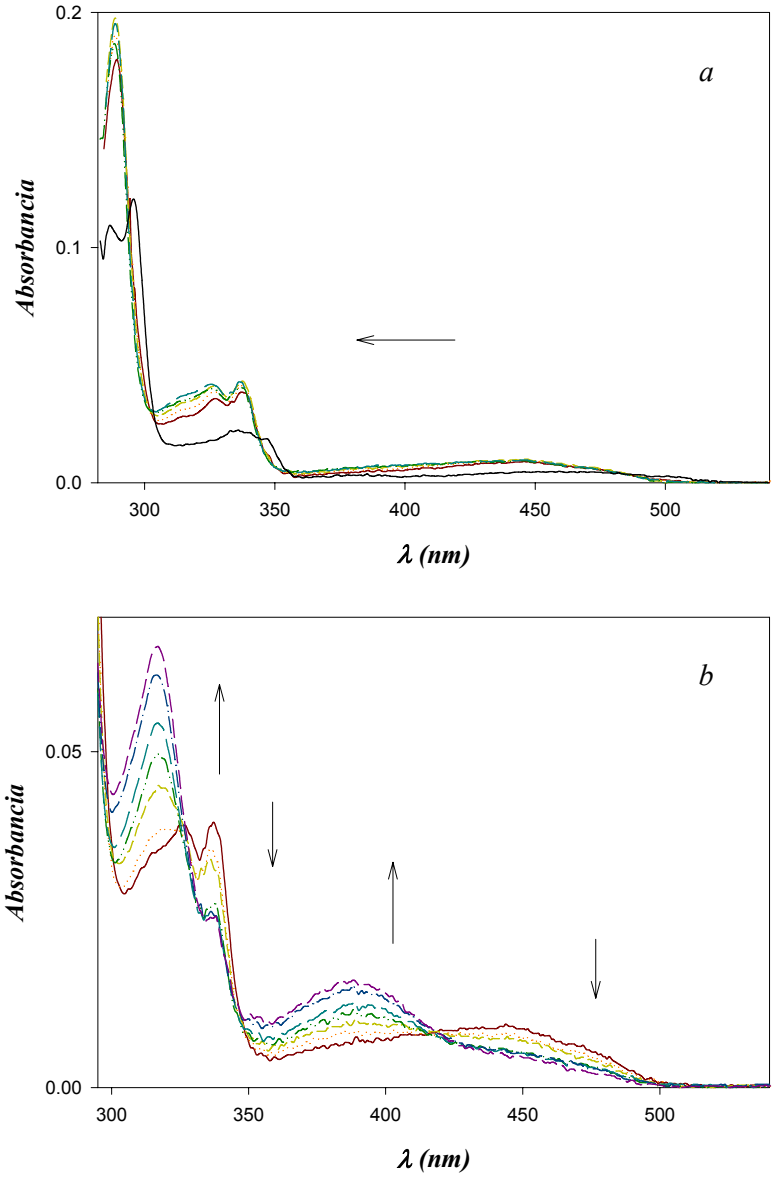
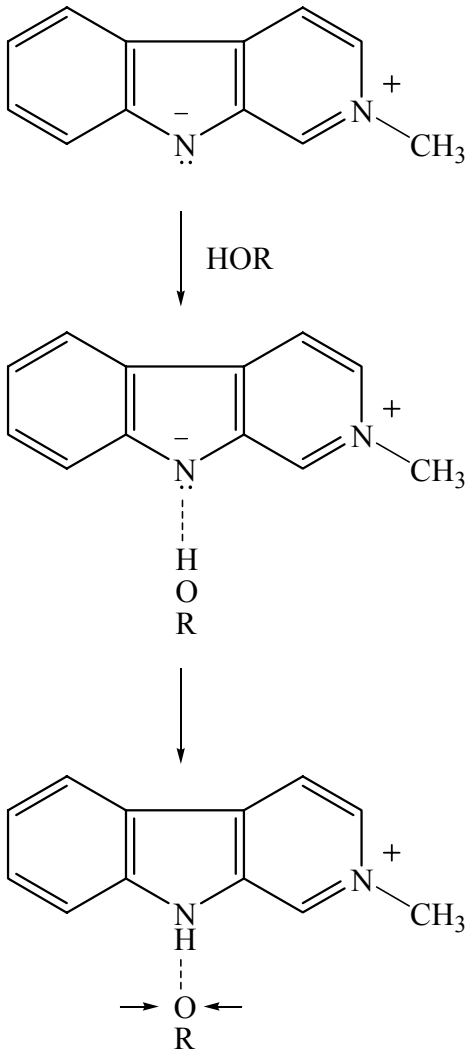


Figura 14.- Espectros de absorción del sistema BCA-HFIP en tolueno en los rangos bajo (0-7.68 10^{-4} M) (a) y alto (7.68 10^{-4}-7.68 10^{-3} M) (b) de concentración de HFIP.

Como en el caso del isómero Q, estos resultados experimentales se pueden interpretar asumiendo que la interacción del isómero Z de la BCA con HFIP da lugar a los complejos tipo HBCZ y PTCZ resultantes de la interacción por puente de hidrógeno del grupo OH del alcohol con el nitrógeno pirrólico de Z.



Esquema 17.- Interacciones por puente de hidrógeno del isómero Z de la BCA con HFIP.

Las representaciones Benesi-Hildebrand de los datos de absorbancia obtenidos a bajas y altas concentraciones de HFIP permiten estimar unos valores de > 4000 M^{-1} y 31±1 M^{-1} para las constantes de formación de los complejos HBCZ y PTCZ, respectivamente. Dicha representación se muestra, a modo de ejemplo, para la formación del complejo PTCZ en la Figura 15. Como cabe esperar de las estructuras electrónicas de los isómeros de la BCA, el átomo de nitrógeno pirrólico del isómero Z tiene mejores propiedades aceptoras de puentes de hidrógeno que el del isómero Q. Por tanto, los complejos HBC y PTC del isómero Z tienen mayores constantes de formación y aparecen a concentraciones de HFIP más bajas que los del isómero Q.

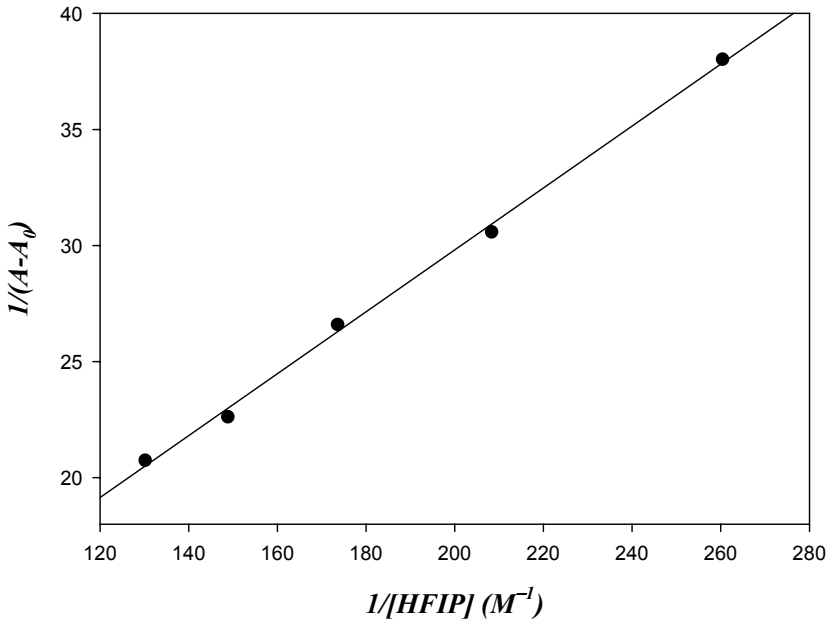


Figura 15.- Representación Benesi-Hildebrand de los datos de absorbancia del sistema BCA-HFIP en tolueno.

En las Figuras 16 y 17 se muestran los espectros de emisión y excitación del sistema BCA-HFIP en tolueno. Como se puede observar, los complejos HBCZ y PTCZ se pueden fotoseleccionar modificando la longitud de onda de excitación o de emisión. De la inspección de los espectros de emisión se pueden sacar dos interesantes conclusiones. La primera es que, a tenor de los aumentos y disminuciones de intensidad que ese observan en la banda F_2, los diferentes complejos del isómero Z experimentan procesos ICT en sus estados excitados. La segunda es que, a concentraciones suficientemente altas de HFIP, se forman especies de naturaleza catiónica, como lo demuestra la formación de una débil banda de emisión alrededor de 450nm.

Por todo ello, el comportamiento dinámico de este sistema es, como cabría esperar, bastante complejo. Así, las curvas de decaimiento de la fluorescencia son, al menos, triexponenciales a lo largo de la mayor parte del espectro de emisión. Los dos componentes mayoritarios de estos ajustes triexponenciales, un tiempo corto alrededor de 1 ns y un tiempo medio próximo a 5 ns, son similares a los que aparecen en los decaimientos biexponenciales del sistema BCA-HFIP en ciclohexano. Por tanto, siguiendo el modelo propuesto para este sistema, dichos tiempos estarían relacionados con la dinámica de los estados excitados LE y CT del complejo PTCZ. Desgraciadamente, debido al carácter triexponencial de estos ajustes y al bajo rendimiento cuántico de la fluorescencia, no se ha podido llevar a cabo el estudio dinámico de este sistema. No obstante, el tiempo de 5 ns que correspondería, según dicho modelo, a τ^0_{CT} está en excelente acuerdo con el de 4.2 ns obtenido para τ^0_{CT} del isómero Q.

El tercer componente de los decaimientos de fluorescencia es un tiempo largo de alrededor de 19 ns similar, aunque algo menor, al tiempo de vida de los cationes de la BC, 23-24 ns. La contribución de este componente es minoritaria.

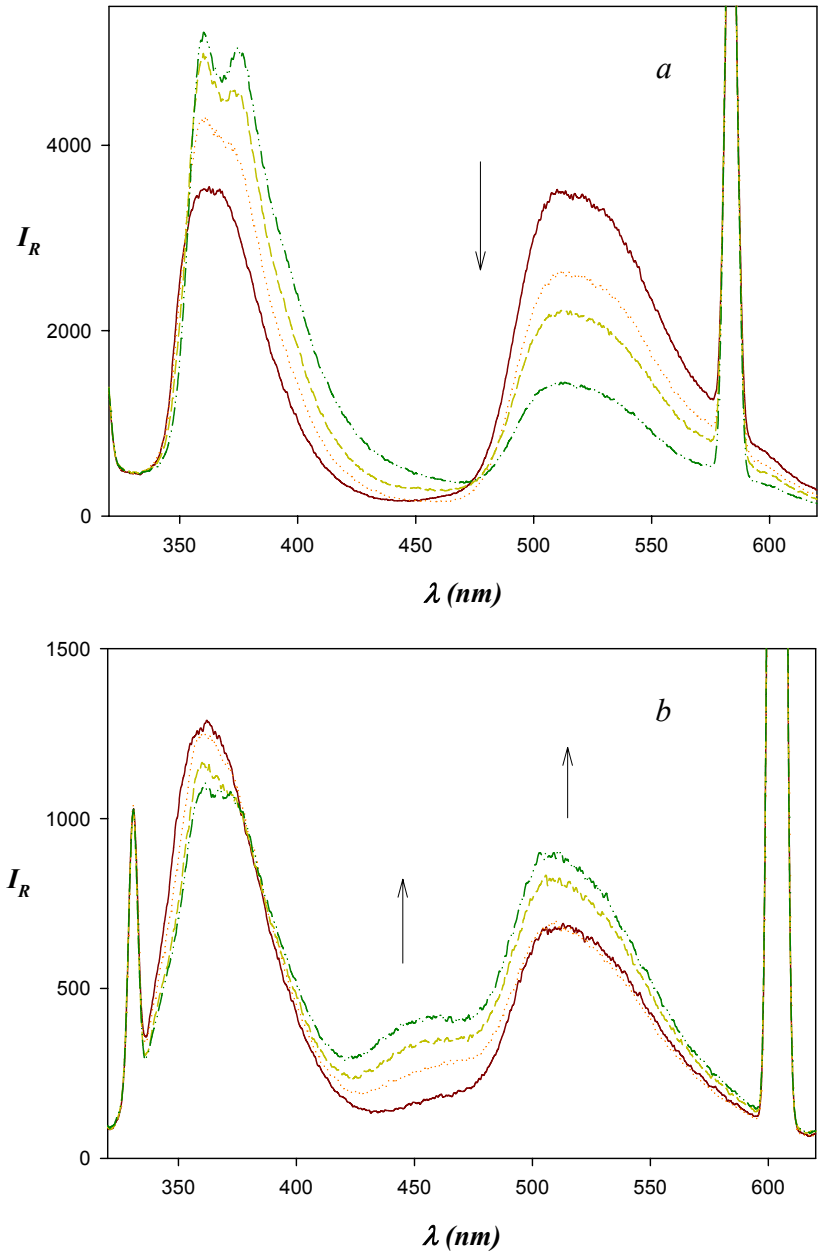


Figura 16.- Espectros de emisión del sistema BCA-HFIP (9.6 10^{-4}-1 10^{-2} M) excitando a 290 nm (a) y a 300 nm (b).

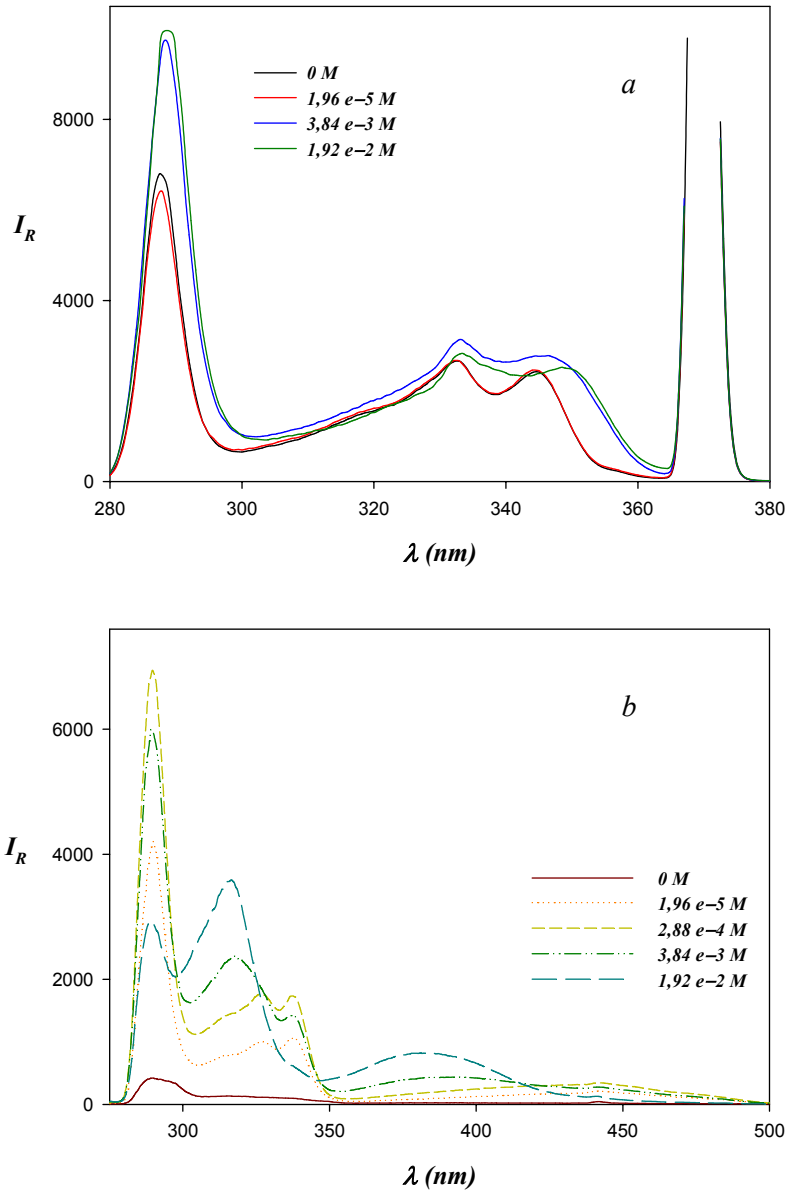


Figura 17.- Espectros de excitación del sistema BCA-HFIP; λ_{em} 370 nm (a) y 510 nm (b) a varias concentraciones de HFIP.

En conclusión, los espectros de absorción, emisión y excitación del sistema BCA-HFIP demuestran concluyentemente que ambos isómeros Q y Z de la BCA forman, a bajas concentraciones de HFIP, un complejo tipo HBC y a altas otro tipo PTC. Los complejos HBC producen efectos hipercrómicos en el espectro de absorción de la BCA pero apenas modifican su estructura. Los complejos PTC producen cambios más significativos en la estructura el espectro de absorción: el PTCQ desplaza al rojo el espectro de absorción de la BCA y el PTCZ lo transforma en un espectro de tipo catiónico.

Por otra parte, la estructura electrónica del PTCQ favorece la ICT del proceso LE$\rightarrow$CT en el estado excitado y, por tanto, aumenta la intensidad de la emisión F_2. Por el contrario, la del PTCZ desfavorece la ICT y disminuye la intensidad de la banda de emisión F_2. Nuestros resultados experimentales indican además que el PTCZ reacciona en su estado excitado LE, con nuevas moléculas de HFIP para formar especies de naturaleza catiónica. Como veremos en el capítulo siguiente, la formación de cationes a partir de especies tipo PTC en el estado excitado transcurre por un mecanismo complejo en el que intervienen nuevos exciplejos.

4.2.- Interacciones por puente de hidrógeno y reacciones de transferencia protónica fototoinducidas, ESPT, de la N_9-metil betacarbolina, MBC, con HFIP en ciclohexano y en mezclas ciclohexano-tolueno.

Los espectros de absorción y de emisión de la MBC en ciclohexano experimentan diferentes cambios a medida que se aumenta la concentración de HFIP. A continuación, para mayor claridad, analizaremos separadamente dichos cambios espectrales distinguiendo tres rangos diferentes para la concentración de dador: rango bajo (10^{-5} - 10^{-4} M), medio (10^{-4} - 10^{-2} M) y alto (>10^{-2} M).

En el rango bajo, la adición de dador produce un ligero efecto hipercrómico que apenas modifica los perfiles de los espectros de absorción y emisión de la MBC, Figura 18. Como estos cambios son similares a los observados previamente en la formación del complejo HBC del sistema MHN-HFIP en ciclohexano *(Carmona y col., 2000)*, supondremos igualmente que la MBC también forma, en este rango de dador, un complejo 1:1 tipo HBC con el HFIP. Desgraciadamente, la pequeña magnitud de los cambios de absorbancia que

acompañan a la formación de este complejo, hace que sea prácticamente imposible determinar su constante de formación.

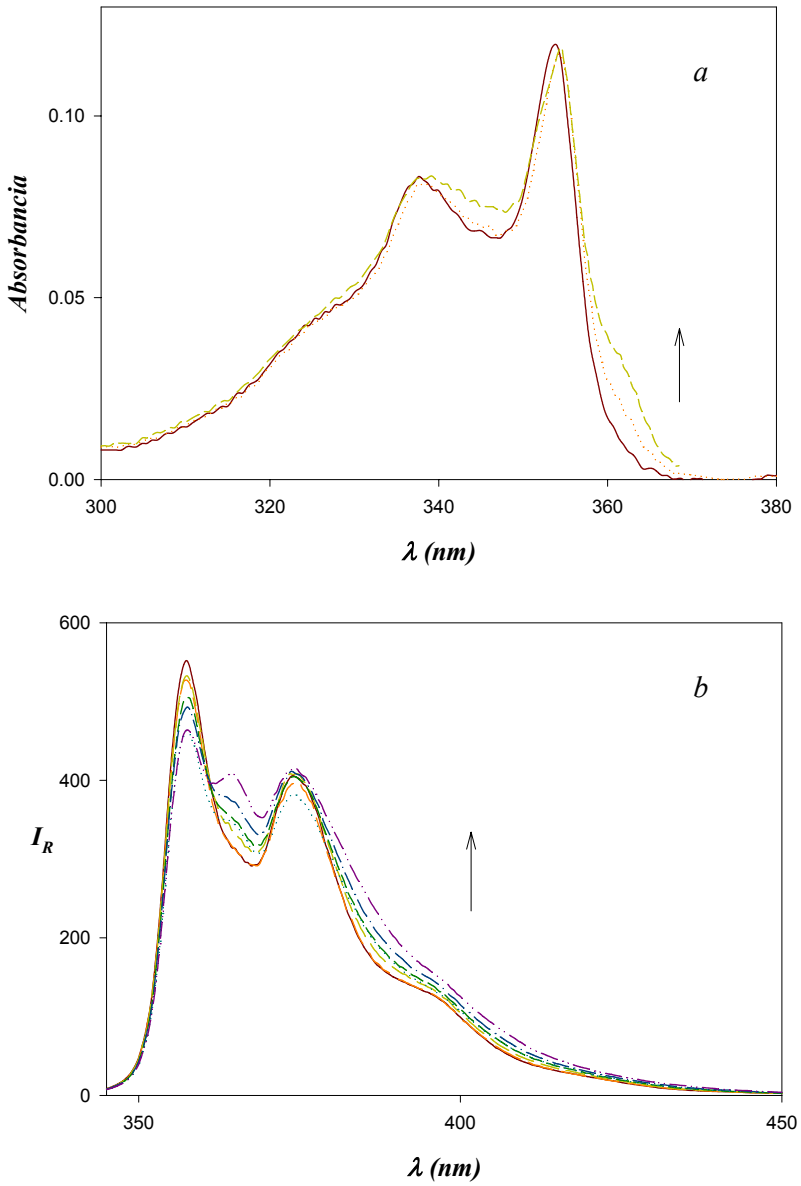


Figura 18.- Espectros de absorción (a) y emisión (b) del sistema MBC-HFIP en ciclohexano en el rango bajo de concentraciones de HFIP (0 – 10^{-4} M).

Las curvas de decaimiento de fluorescencia en este rango de concentraciones de HFIP son biexponenciales con tiempos de vida próximos a 2.5 y 5.0 ns que no varían con la concentración de HFIP. Como el tiempo de vida corto, 2.5 ns, coincide con el de la MBC libre en ciclohexano, el tiempo largo de 5.0 ns debe corresponder al complejo HBC. El ajuste global de las curvas de decaimiento, Tabla 2, indica que los valores de los factores preexponenciales α_1 y α_2 cambian en sentido contrario a medida que aumenta la concentración de HFIP: el de la MBC, α_1, disminuye, el del HBC, α_2, aumenta.

Tabla 2.- Análisis global de las curvas de decaimiento biexponenciales (τ_1 y τ_2 fijados a 2.5 y 5.0 ns, respectivamente, χ^2_g = 1.126, λ_{exc} = 345 nm y λ_{em} = 375 nm) del sistema MBC/HFIP en ciclohexano, a baja concentración de dador.

10^5 [HFIP] / M	α_1	α_2	χ^2
0.48	0.046	0.001	1.022
0.96	0.045	0.002	1.080
1.44	0.045	0.002	1.109
1.92	0.044	0.003	1.080
2.40	0.043	0.004	1.105
2.88	0.043	0.004	1.273
3.84	0.041	0.005	1.135
5.76	0.039	0.007	1.074
8.64	0.037	0.008	1.165
9.60	0.035	0.010	1.176
19.20	0.028	0.016	1.167

A partir de estos resultados se puede concluir que la MBC y su HBC se comportan como fluoróforos independientes; esto es, se encuentran en equilibrio en el estado fundamental pero no interaccionan en el estado excitado. En este caso, la intensidad de fluorescencia, I(t), de la mezcla MBC-HBC a un tiempo t después del pulso de excitación vendría dada por:

$$I(t) = B\,(k_{r1}\,[(MBC)^*]_t + k_{r2}\,[(HBC)^*]_t) =$$
$$= B\,(k_{r1}\,[(MBC)^*]_{t=0}\exp(-t/\tau_1) + k_{r2}\,[(HBC)^*]_{t=0}\exp(-t/\tau_2)) = \quad (20)$$
$$= B'\,(\delta I_1 k_{r1}\ \exp(-t/\tau_1) + \delta I_2 k_{r2}\ \exp(-t/\tau_2))$$

donde B y B' son constantes que dependen de las condiciones experimentales, δI_1 y δI_2 las fracciones de luz absorbidas por la MBC libre y el HBC, respectivamente, y k_{r1} y k_{r2} sus respectivas constantes radiativas. Según esta ecuación, la relación de factores preexponenciales, α_2/α_1, vendría dada por:

$$\frac{\alpha_2}{\alpha_1} = \frac{\varepsilon_2 k_{r2}\,[HBC]}{\varepsilon_1 k_{r1}\,[MBC]} \quad (21)$$

en la que ε_1 y ε_2 representan los coeficientes de extinción molar de HBC y MBC, respectivamente.

Como MBC y HBC se encuentran en equilibrio en el estado fundamental, si suponemos que sus coeficientes de extinción molar son muy parecidos y expresamos las constantes radiativas en función de los rendimientos cuánticos de fluorescencia, φ, y de los tiempos de vida, $k_{ri} = \varphi_i / \tau_i$, la ecuación (21) se transforma en:

$$\frac{\alpha_2}{\alpha_1} = \frac{\varphi_2}{\varphi_1}\frac{\tau_1}{\tau_2} K_1\,[HFIP]_o \quad (22)$$

A partir de esta ecuación, teniendo en cuenta que φ_2/φ_1, la relación de las áreas bajo los espectros de emisión, es prácticamente igual a la unidad, se puede estimar que la constante de formación del complejo HBC es del orden de ~ 8.000 M^{-1}, a 298 K.

Una vez formado el HBC, la adición de cantidades crecientes de HFIP provoca nuevos cambios en los espectros de absorción y emisión del sistema MBC-HFIP. De acuerdo con nuestro modelo de interacción por puentes de hidrógeno, estos cambios espectrales estarían relacionados con la transformación del complejo HBC en otro de tipo PTC. Como se muestra en la Figura 19, la formación del PTC produce un desplazamiento batocrómico en los espectros de absorción y de emisión de la MBC. La presencia de puntos isosbésticos e

isoemisivos en estos espectros sugiere, por otra parte, que el equilibrio entre los complejos HBC y PTC se establece únicamente en el estado fundamental y que, por tanto, no interaccionan en el estado excitado.

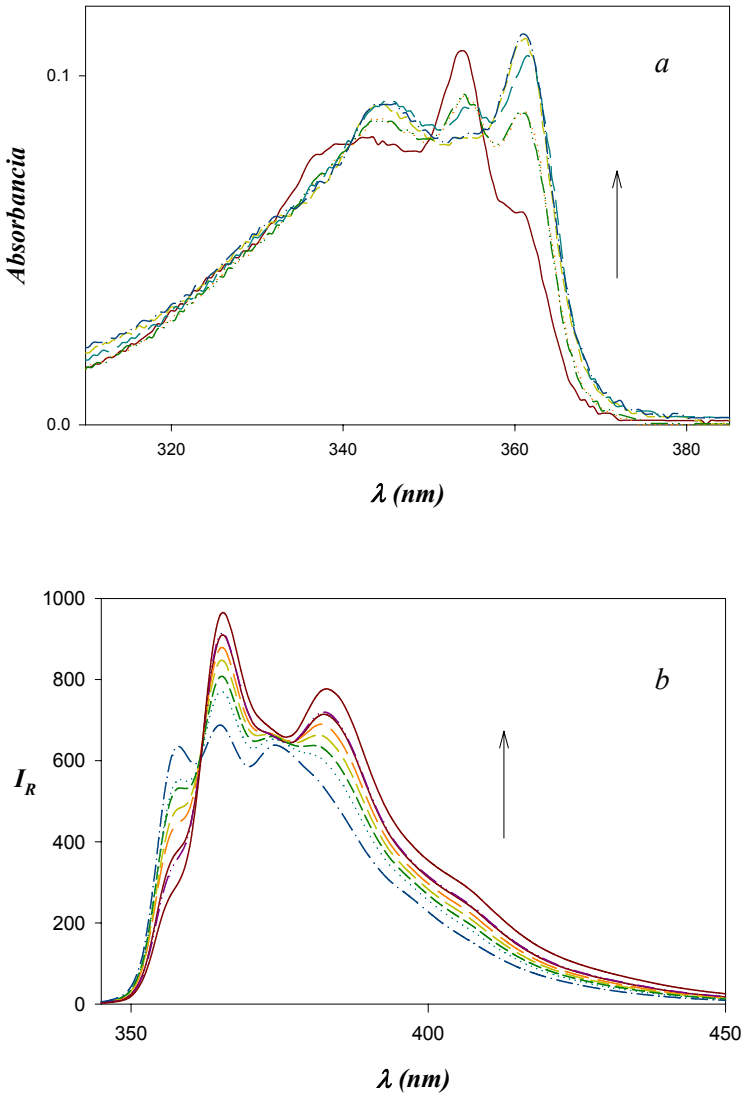


Figura 19.- Espectros de absorción (a) y emisión (b) del sistema MBC-HFIP en ciclohexano en el rango medio de concentraciones de HFIP.

Los valores de las constantes del equilibrio HBC↔PTC, K, obtenidas a partir de las representaciones de Benesi-Hildebrand de los datos de absorbancia a diferentes temperaturas se recogen en la Tabla 3. Los parámetros termodinámicos incluidos en esta Tabla se calcularon de la forma habitual, a partir de la influencia de la temperatura en la constante de equilibrio mediante la ecuación de van't Hoff, Figura 20. En esta Tabla se incluyen también, para su comparación, los parámetros correspondientes al sistema MHN-HFIP en ciclohexano *(Carmona y col., 2000)*.

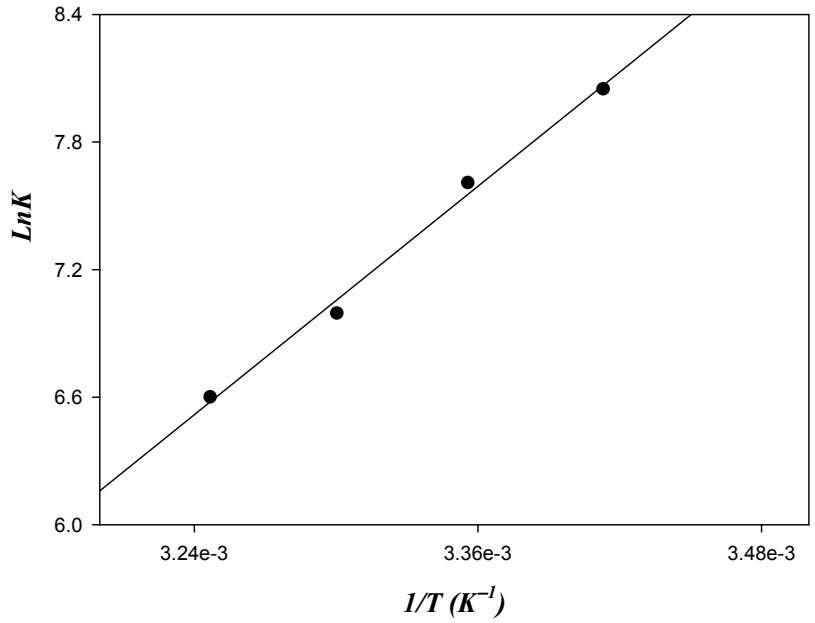


Figura 20.- Representación de ln K frente a 1/T.

Tabla 3.- Constantes y parámetros termodinámicos del equilibrio HBC↔PTC del sistema MBC-HFIP.

	MBC			**MHN**		
	HBC	***PTC***	***C***	***HBC***	***PTC***	***C***
			ciclohexano			
K_{20} / M^{-1}		3134	24		3533	
K_{25} / M^{-1}	~ 8000	2016	32	~ 4000	2488	
K_{30} / M^{-1}		1092	61		1866	
K_{35} / M^{-1}		736	100		1265	
K_{40} / M^{-1}			125		1073	
ΔH^0/kJmol^{-1}		-74	68		-47	
ΔS^0/Jmol^{-1}K^{-1}		-187	258		-92	
			Tolueno-ciclohexano (20% v/v)			
K_{25} / M^{-1}		1760	0.78		1873	0.84

A diferencia de lo que ocurre en el sistema MHN-HFIP en ciclohexano, a altas concentraciones de HFIP, una vez formado el PTC de la MBC, se produce un ligero aumento de la absorbancia a las longitudes de onda más largas del espectro de absorción, Figura 21a. Para estudiar con mayor detalle estos cambios espectrales creímos oportuno cambiar de disolvente y utilizar una mezcla al 20% v/v de tolueno-ciclohexano en la que se pudiera disolver una mayor proporción de HFIP. Lógicamente, se comprobó previamente que los espectros de absorción en dicha mezcla reflejan también la formación de complejos HBC y PTC.

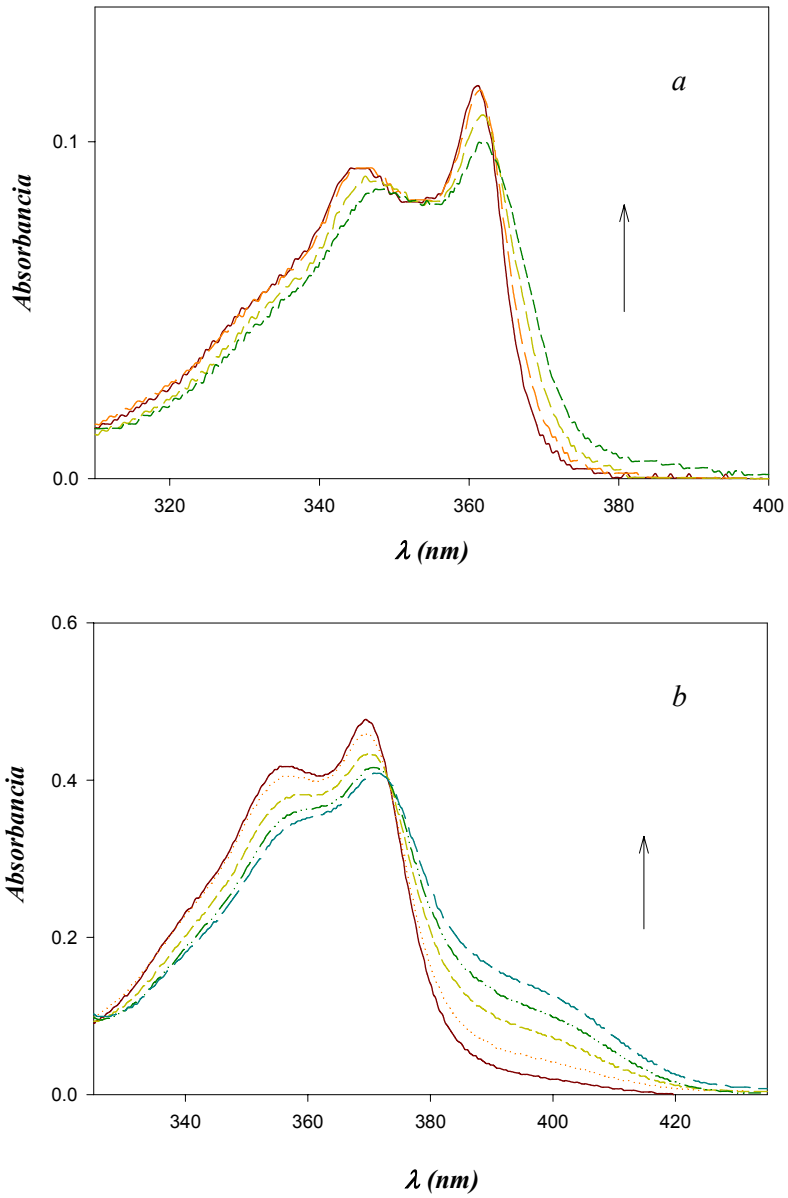


Figura 21.- Cambios en los espectros de absorción del sistema MBC-HFIP en el rango de concentración alto de [HFIP] (10^{-2}- 9 10^{-2} M) en ciclohexano (a) y (0.19 – 0.86 M) en 20% v/v tolueno-ciclohexano (b).

En la mezcla al 20% v/v de tolueno-ciclohexano se observan con mucha mayor claridad los nuevos cambios en el espectro de absorción, Figura 21b, a los que hacíamos referencia anteriormente. Ahora, a altas concentraciones de HFIP, tanto para la MBC como para el MHN, puede apreciarse con toda claridad la formación de una nueva banda de absorción, centrada alrededor de 390 nm, cuya intensidad crece conforme aumenta la concentración de dador. Esta banda es característica de los cationes, C, de la betacarbolina. Las constantes del equilibrio PTC↔C obtenidas a diferentes temperaturas a partir de las correspondientes representaciones de Benesi-Hildebrand se recogen en la Tabla 3. Como muestran los datos termodinámicos recogidos en esta Tabla, la transformación PTC↔C, al ser un proceso endotérmico, está controlada por el término entrópico.

En la Figura 22 se muestran los cambios que experimenta el espectro de emisión de la MBC en ciclohexano en los distintos rangos de concentraciones de HFIP. Los espectros de emisión obtenidos a concentraciones de HFIP en las que en el estado fundamental aún se está formando el PTC, Figura 22a, muestran un punto isoemisivo y un hombro alrededor de 410 nm.

Cuando se ha formado el PTC pero aún no se detecta en el espectro de absorción la formación de C, Figura 22b, los espectros de emisión muestran un claro punto isoemisivo y una nueva banda en la región de 420-430 nm. Esta banda es similar a la del exciplejo CL* que se forma en el sistema MHN-HFIP en ciclohexano puro y en mezclas al 10% v/v de tolueno-ciclohexano *(Carmona y col., 2002)*. Finalmente, en el rango de concentraciones de HFIP en el que ya se aprecia en el espectro de absorción la formación de C en el estado fundamental, los espectros de emisión, Figura 22c, muestran claramente la banda alrededor de 450 nm típica de las especies catiónicas.

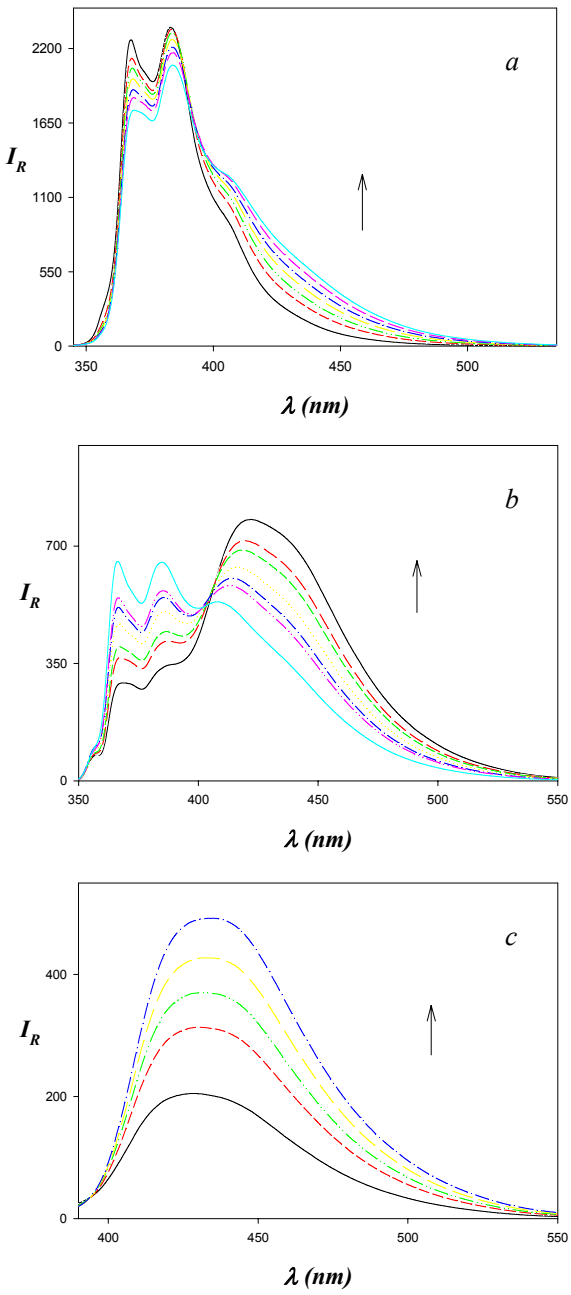


Figura 22.- Espectros de emisión de la MBC en ciclohexano: (a) [HFIP] = 1.9 10^{-3}- 8.6 10^{-3} M, λ_{exc} = 355 nm; (b) [HFIP] = 9.6 10^{-3}- 3.8 10^{-2} M, λ_{exc} = 355 nm; (c) [HFIP] = 3.8 10^{-2}- 8.6 10^{-2} M, λ_{exc} = 380 nm.

En estos rangos medio y alto de concentraciones de HFIP, las curvas de decaimiento de la fluorescencia del sistema MBC-HFIP en ciclohexano también muestran un comportamiento diferente al observado en trabajos previos para el sistema MHN-HFIP en ciclohexano puro y en mezclas al 10% v/v de tolueno-ciclohexano. Así, mientras que para el MHN las curvas de decaimiento se ajustaban a funciones biexponenciales, en el sistema MBC-HFIP se requieren funciones triexponenciales, Tablas 4 y 5. En este caso, solamente se obtienen ajustes biexponenciales cuando se seleccionan cuidadosamente tanto la concentración de HFIP como las longitudes de onda de excitación y emisión.

Como es bien conocido, el ajuste multiexponencial de las curvas de decaimiento se hace más difícil conforme crece el número de parámetros a ajustar. Una manera de mejorar la resolución es realizar medidas a diferentes longitudes de onda y hacer un análisis global de los resultados. Por esta razón, las medidas del sistema MBC-HFIP para las diferentes concentraciones de HFIP se han llevado a cabo a diferentes longitudes de onda de emisión y excitación.

Los datos obtenidos indican, sin lugar a dudas, la existencia de tres tiempos de vida. No obstante, tanto sus valores, τ_i, como sus factores preexponenciales, α_i, se ven afectados de una gran imprecisión. La incertidumbre en los tiempos de vida es tanto más grande, cuanto más próximos entre sí son sus valores. De todas formas, aunque los resultados obtenidos resultan intratables desde un punto de vista cuantitativo, nos proporcionan una información cualitativa que puede ayudar a esclarecer y comprender mejor el mecanismo de los procesos que ocurren en el estado excitado.

Así, como muestra la Tabla 4, a una concentración de HFIP $\approx 2\ 10^{-3}$ M, a la que en el estado fundamental todavía se está formando el PTC, se pueden determinar tres tiempos de vida, uno corto alrededor de 3 ns, uno intermedio de 6-7 ns y otro largo alrededor de 15-16 ns. Tomando como base resultados anteriores, el tiempo de vida corto se puede asignar al HBC, el medio al PTC y el

largo al exciplejo CL*. Recuérdese que, como se mencionó en la Introducción, el CL* del MHN tiene un tiempo de vida de 16 ns *(Carmona y col., 2002)*.

Tabla 4.- Tiempos de vida y factores preexponenciales (entre paréntesis) obtenidos del análisis global de los decaimientos de fluorescencia a diferentes longitudes de onda de emisión, para el sistema MBC-HFIP en 20% v/v tolueno-ciclohexano, [HFIP] = 1.92 x 10^{-3} M, λ_{exc} = 325 nm, χ^2_g = 1.093.

λ_{em} / nm	τ_1 / ns	τ_2 / ns	τ_3 / ns
420[a]	15±3 (0.009)	7.2±0.6 (0.216)	3.7±0.7 (0.211)
420[b]	15±2 (0.007)	6.5±0.9 (0.087)	3±1 (0.054)
430[b]	17±2 (0.009)	6.8±0.9 (0.098)	2±1 (0.043)
440[b]	15±2 (0.019)	6±1 (0.096)	2±1 (0.032)
450[b]	16±2 (0.022)	7±1 (0.095)	2±2 (0.024)

[a] 3 10^4 cuentas en el máximo.
[b] 1 10^4 cuentas en el máximo.

Es interesante señalar que, a esta concentración de HFIP y a las longitudes de onda de emisión más cortas a las que emiten principalmente los complejos HBC* y PTC*, 360-380 nm, no se observa el componente con tiempo de vida largo. A estas longitudes de onda de emisión, los decaimientos siguen una función biexponencial, con tiempos de vida alrededor de 3 ns (α_1= 0.057) y 6 ns (α_2=0.034). Del mismo modo, a las longitudes de onda de emisión más largas, λ_{em} > 460 nm, las curvas de decaimiento son también biexponenciales. En este caso no aparece el tiempo corto, pero sí el largo, con un valor alrededor de 16 ns (α_1 = 0.150). El tiempo intermedio 6 ns, común a ambos tipos de curvas biexponenciales, aparece ahora con un factor preexponencial negativo (α_2 = -0.051), lo que indica que corresponde a una especie que es precursora de otra en el estado excitado.

Tabla 5.- Tiempos de vida y factores preexponenciales (entre paréntesis) obtenidos del análisis global de los decaimientos de fluorescencia a diferentes longitudes de onda de excitación y emisión para el sistema MBC-HFIP en ciclohexano puro, [HFIP] = 0.0864 M, χ^2_g = 1.198.

λ_{exc} / nm	λ_{em} / nm	τ_1 / ns	τ_2 / ns	τ_3 / ns
350	420	18.1±0.5	2.4±0.9	0.6±0.5
		(0.091)	(0.075)	(-0.052)
325	430	18.0±0.4	3±1	0.6±0.4
		(0.111)	(0.047)	(-0.073)
360	430	18.1±0.4	2.0±0.9	0.9±0.6
		(0.114)	(0.070)	(-0.088)
350	430	17.9±0.4	3±1	1±1
		(0.110)	(0.037)	(-0.031)
350	450	18.0±0.4	2±3	1.2±0.8
		(0.132)	(0.023)	(-0.066)
350	470	18.1±0.3	3±2	1.1±0.7
		(0.145)	(0.015)	(-0.053)

Estos datos demuestran que el HBC se comporta como un fluoróforo independiente y que el exciplejo CL* se forma en el estado excitado. Desgraciadamente, la pequeña intensidad de la emisión a las longitudes de onda largas, impide cualquier medida cuantitativa que se desee realizar para el estudio de esta transformación.

Como se puede ver en la Tabla 5, una vez formado el PTC, al aumentar la concentración de HFIP, los ajustes se hacen definitivamente triexponenciales, independientemente de la longitud de onda de emisión o excitación escogida. Bajo esas condiciones, aparecen dos tiempos de vida cortos, que cambian un tanto aleatoriamente con la concentración de HFIP, y un tiempo de vida largo. El componente de tiempo de vida más corto aparece con factor preexponencial negativo, y el del tiempo de vida más largo aumenta conforme lo hace la concentración de HFIP.

Finalmente, a muy altas concentraciones de HFIP en las mezclas al 20% v/v de tolueno-ciclohexano, las medidas de tiempo de vida dan ajustes biexponenciales, tal y como se indica en las Tablas 6 y 7. El componente con tiempo de vida largo alcanza para la MBC un valor de 21 ns, próximo al del catión de la betacarbolina, ≈ 25 ns.

Tabla 6.- Tiempos de vida y factores preexponenciales (entre paréntesis) obtenidos del análisis global de los decaimientos de fluorescencia a diferentes longitudes de onda de excitación y emisión para el sistema MBC-HFIP en 20% v/v tolueno-ciclohexano, [HFIP] = 0.864 M, χ^2_g = 1.200.

λ_{exc} / nm	λ_{em} / nm	τ_1 / ns	τ_2 / ns
300	430	21.4 ± 0.4 (0.113)	2 ± 2 (0.026)
300	450	21.4 ± 0.5 (0.116)	3 ± 3 (0.012)
300	470	21.5 ± 0.5 (0.118)	3 ± 2 (0.008)
375	440	21.5 ± 0.4 (0.115)	2 ± 2 (0.023)

Tabla 7.- Tiempos de vida y factores preexponenciales (entre paréntesis) obtenidos del análisis global de los decaimientos de fluorescencia a diferentes longitudes de onda de excitación y emisión para el sistema MHN/HFIP en 20% v/v tolueno-ciclohexano, [HFIP] = 0.864 M, χ^2_g = 1.177.

λ_{exc} / nm	λ_{em} / nm	τ_1 / ns	τ_2 / ns
340	415	18.9±0.4 (0.122)	1.1±0.9 (0.049)
360	415	18.9±0.5 (0.116)	1.2±0.8 (0.062)
370	415	19.0±0.5 (0.122)	0.9±0.6 (0.063)
340	420	18.9±0.4 (0.123)	1±1 (0.046)
360	430	19.0±0.4 (0.130)	2±2 (0.020)
340	430	18.8±0.4 (0.126)	3±3 (0.018)
360	440	19.0±0.4 (0.132)	2±2 (0.016)

Los resultados de nuestro estudio ponen claramente de manifiesto que el mecanismo de la reacción de transferencia protónica fotoinducida N*↔C* de la MBC en medios apróticos no es directo, sino que participan diferentes especies intermediarias. Según nuestro modelo, a bajas concentraciones de HFIP, la MBC forma en su estado fundamental los complejos HBC y PTC. Dichos complejos representan la estructuras covalente, $OH^{\cdots}N$, y de transferencia protónica, $O^{-}{}^{\cdots}H^{+}N$, del puente de hidrógeno entre el grupo OH del alcohol y el nitrógeno piridínico de la MBC. Estos complejos se encuentran en equilibrio en el estado fundamental pero no interaccionan entre sí en el estado excitado. No obstante, el PTC reacciona en su estado excitado con una molécula de HFIP para dar el exciplejo CL* que, a su vez, reacciona con otra molécula de HFIP para dar C*. A muy altas concentraciones de HFIP, las especies catiónicas, C, también se forman en el estado fundamental.

Como se muestra en la Figura 23, los espectros experimentales de emisión de la MBC en el rango medio y alto de concentraciones de HFIP se pueden reproducir excelentemente combinando adecuadamente las bandas del PTC*, CL* y C*. El espectro del PTC* se ha representado mediante un sistema de tres bandas a longitudes de onda de ~ 360, ~ 385 y ~ 400 nm (color azul), el del CL* con una banda alrededor de ~ 418 nm (color verde) y el catión con una banda a ~ 450 nm (color rojo). En este análisis se ha supuesto que a estas concentraciones de HFIP la emisión del HBC es prácticamente despreciable.

De acuerdo con nuestro modelo, a las concentraciones de HFIP a las que se está formando el PTC en el estado fundamental, los espectros de emisión se pueden deconvolucionar excelentemente en las bandas del PTC* y CL*, Figura 23a. A concentraciones más altas de HFIP, cuando todavía no se ha formado C en el estado fundamental, pero se está formando en el estado excitado, el perfil experimental del espectro se reproduce fielmente combinando las bandas del PTC*, CL* y C*, Figura 23b.

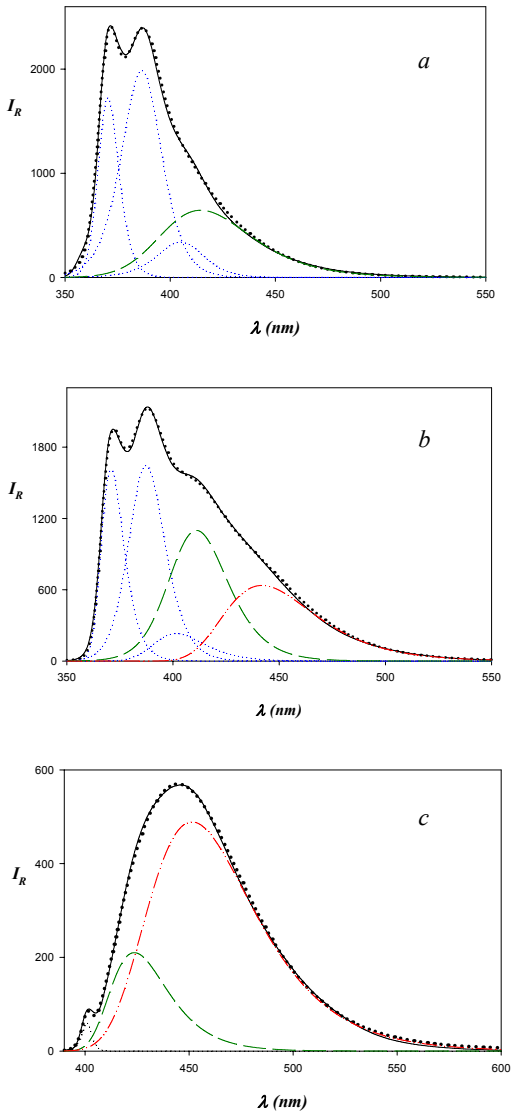
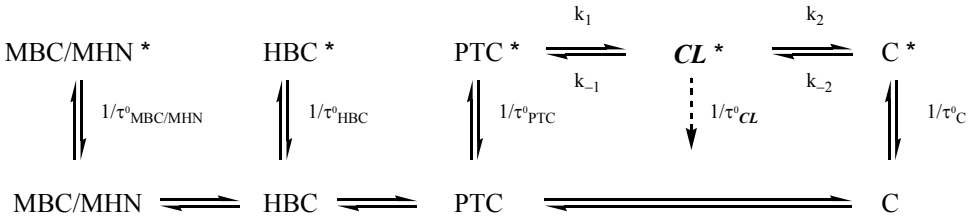


Figura 23.- Deconvolución de los espectros de emisión del sistema MBC-HFIP en ciclohexano.

Finalmente, en la Figura 23c se ilustra la deconvolución de los espectros correspondientes al rango de concentración de HFIP más elevado. El espectro de esta gráfica se ha realizado excitando la disolución a 400 nm, longitud de onda a la que la única especie que absorbe en el estado fundamental es el catión. Como se puede apreciar, en este caso, el espectro de emisión se reproduce con las bandas a 418 y 450 nm correspondientes a CL* y C*.

El que C* aparezca en el estado excitado a concentraciones de HFIP a las que aún no se ha formado en el estado fundamental, Figura 23b, y que aparezca CL* cuando se excita C en el estado fundamental, Figura 23c, indica que ambas especies, CL* y C*, se encuentran en equilibrio en el estado excitado. La existencia de dicho equilibrio viene apoyada por los resultados del análisis de las curvas de decaimiento de la fluorescencia.

Conviene resaltar que, para todo el rango de concentración de HFIP, en los espectros deconvolucionados se mantienen tanto la posición de los máximos, como las formas de las bandas del PTC*, CL* y C*. Este hecho demuestra, por una parte, la fiabilidad del procedimiento de ajuste, y, por otra, nuestra hipótesis de que dichas especies son las responsables de los cambios que se observan en los espectros de emisión. Así pues, nuestros resultados experimentales se pueden resumir mediante el siguiente esquema cinético:



Esquema 18.- Mecanismo de formación de los aductos y exciplejos del sistema MBC-HFIP.

En este Esquema, τ^0_{MBC}, τ^0_{MHN}, τ^0_{HBC}, τ^0_{PTC}, τ^0_{CL} y τ^0_{C} son los tiempos de vida de la MBC*, MHN*, HBC*, PTC*, CL* y C*, respectivamente; k_1 y k_2 son las constantes bimoleculares de velocidad para la interacción del PTC* con HFIP para dar el CL*, y para la interacción de éste con HFIP para producir C*, y k_{-1} y k_{-2} son las constantes de las reacciones inversas.

A partir de este mecanismo, bajo condiciones fotoestacionarias, se pueden derivar las siguientes ecuaciones:

$$-\int_{\alpha_{PTC}}^{0} d[PTC]^* = \int_0^{\infty} \left(\frac{1}{\tau^0_{PTC}} + k_1[HFIP]\right)[PTC]^* dt - \int_0^{\infty} k_{-1}[CL]^* dt \tag{23}$$

$$-\int_{\alpha_{CL}}^{0} d[CL]^* = \int_0^{\infty} \left(\frac{1}{\tau^0_{CL}} + k_{-1} + k_2[HFIP]\right)[CL]^* dt - \int_0^{\infty} k_1[HFIP][PTC]^* dt - \int_0^{\infty} k_{-2}[C]^* dt \tag{24}$$

$$-\int_{\alpha_C}^{0} d[C]^* = \int_0^{\infty} \left(\frac{1}{\tau^0_{C}} + k_{-2}\right)[C]^* dt - \int_0^{\infty} k_2[HFIP][CL]^* dt \tag{25}$$

Teniendo en cuenta que:

$$\int_0^{\infty} [PTC]^* dt = \frac{\varphi_{PTC}}{\varphi^0_{PTC}} \tau^0_{PTC} \tag{26}$$

$$\int_0^{\infty} [CL]^* dt = \frac{\varphi_{CL}}{\varphi^0_{CL}} \tau^0_{CL} \tag{27}$$

$$\int_0^{\infty} [C]^* dt = \frac{\varphi_{C}}{\varphi^0_{C}} \tau^0_{C} \tag{28}$$

las ecuaciones (23), (24) y (25) se integran para dar:

$$\alpha_{PTC} = \left[\frac{1}{\tau^0_{PTC}} + k_1[HFIP]\right]\frac{\varphi_{PTC}}{\varphi^0_{PTC}}\tau^0_{PTC} - k_{-1}\frac{\varphi_{CL}}{\varphi^0_{CL}}\tau^0_{CL} \tag{29}$$

$$\alpha_{CL} = 0 = \left[\frac{1}{\tau^0_{CL}} + k_{-1} + k_2[HFIP]\right]\frac{\varphi_{CL}}{\varphi^0_{CL}}\tau^0_{CL} - k_1[HFIP]\frac{\varphi_{PTC}}{\varphi^0_{PTC}}\tau^0_{PTC} - k_{-2}\frac{\varphi_{C}}{\varphi^0_{C}}\tau^0_{c} \tag{30}$$

$$\alpha_{C} = \left[\frac{1}{\tau^0_{C}} + k_{-2}\right]\frac{\varphi_{C}}{\varphi^0_{C}}\tau^0_{C} - k_2[HFIP]\frac{\varphi_{CL}}{\varphi^0_{CL}}\tau^0_{CL} \tag{31}$$

en las que α_{PTC}, α_{CL} y α_C representan las fracciones de luz absorbidas por cada una de las respectivas especies.

Desgraciadamente, estas ecuaciones tienen poca utilidad ya que los parámetros α_{PTC} y α_C son difíciles de evaluar. No obstante, dichas ecuaciones se pueden simplificar introduciendo condiciones límites en las que sólo absorba una especie; bien el PTC o bien el C.

En el primer caso, cuando sólo absorbe el PTC, tendríamos $\alpha_{PTC}=1$ y $\alpha_C=0$. Si, además, elegimos unas condiciones experimentales en las que aún no se observa C en el estado excitado, las ecuaciones (29) y (30) se transforman, respectivamente, en las (32) y (33):

$$\frac{\varphi_{PTC}}{\varphi^0_{PTC}} = \frac{1 + k_{-1}\tau^0_{CL}}{1 + k_{-1}\tau^0_{CL} + k_1\tau^0_{PTC}[HFIP]} \qquad (32)$$

y

$$\frac{\varphi_{CL}}{\varphi^0_{CL}} = \frac{k_1\tau^0_{PTC}[HFIP]}{1 + k_{-1}\tau^0_{CL} + k_1\tau^0_{PTC}[HFIP]} \qquad (33)$$

Si los datos de rendimientos cuánticos relativos $\varphi_{PTC} / \varphi^0_{PTC}$ y $\varphi_{CL} / \varphi^0_{CL}$, tomados como las áreas de las respectivas especies en los espectros deconvolucionados, se ajustan a las ecuaciones (32) y (33), sólo se obtienen resultados aceptables cuando se hace $k_{-1}=0$, Figuras 24a y b. Esta suposición sería razonable si en el mecanismo general k_{-1} fuese mucho menor que k_2. En este caso, haciendo $k_{-1}=0$ y tomando la inversa en la ecuación (32), se obtiene la ecuación de Stern-Volmer:

$$\frac{\varphi^0_{PTC}}{\varphi_{PTC}} = 1 + k_1\,\tau^0_{PTC}\,[HFIP] \qquad (34)$$

En la Figura 24c se muestra, a modo de ejemplo, la representación de la ecuación (34) para el sistema MBC-HFIP en tolueno-ciclohexano al 20% v/v. La relación lineal obtenida demuestra el excelente acuerdo entre los datos experimentales y las previsiones teóricas.

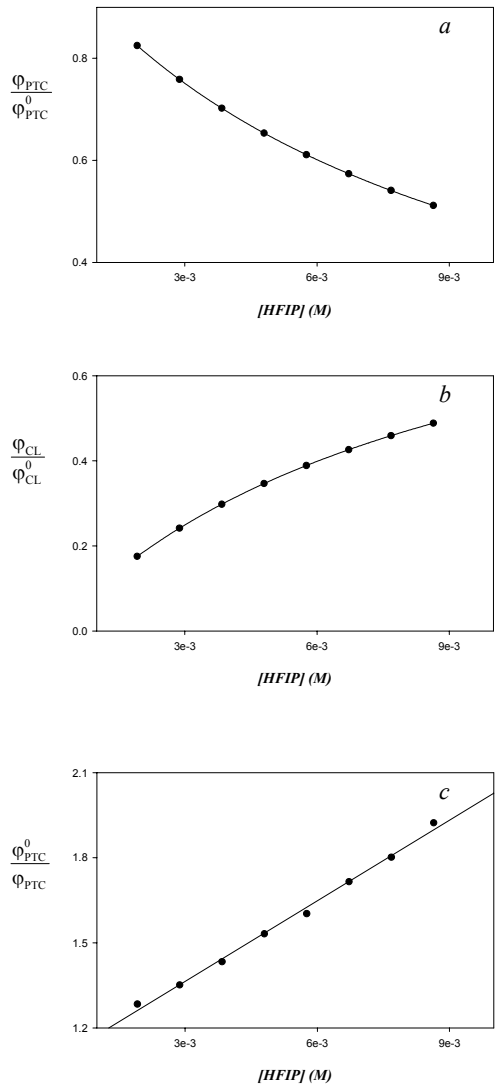


Figura 24.- Representación de la relación de rendimientos cuánticos de acuerdo con: a) ecuación (32), b) ecuación (33) y c) ecuación (34), para el sistema MBC-HFIP en 20% v/v tolueno-ciclohexano.

Por otra parte, en el caso en que la única especie que absorbiese en el estado fundamental fuese el C, tendríamos que $\alpha_{PTC}=0$ y $\alpha_C=1$, con lo que las ecuaciones (30) y (31) se transformarían en:

$$\frac{\varphi_{CL}}{\varphi_{CL}^0} = \frac{k_{-2}\,\tau_C^0}{1+k_{-2}\tau_C^0+k_2\,\tau_{CL}^0\,[HFIP]} \qquad (35)$$

y

$$\frac{\varphi_C}{\varphi_C^0} = \frac{1+k_2\,\tau_{CL}^0\,[HFIP]}{1+k_{-2}\tau_C^0+k_2\,\tau_{CL}^0\,[HFIP]} \qquad (36)$$

En este caso, como se muestra en las Figuras 25a y 25b, los datos experimentales de rendimientos cuánticos se ajustan satisfactoriamente a las ecuaciones teóricas sin necesidad de eliminar ningún parámetro. Haciendo la inversa en la ecuación (35) y reordenando, se obtiene:

$$\frac{\varphi_{CL}^0}{\varphi_{CL}} = \left[1+\frac{1}{k_{-2}\,\tau_C^0}\right] + \frac{k_2\tau_{CL}^0}{k_{-2}\tau_C^0}\,[HFIP] \qquad (37)$$

De acuerdo con esta ecuación teórica, las representaciones de $\varphi^0_{CL}/\varphi_{CL}$ frente [HFIP] dan, para los diferentes sistemas y en los distintos medios, relaciones lineales, como se muestra, a modo de ejemplo, en la Figura 25c para el sistema MBC-HFIP en las mezclas al 20% v/v tolueno-ciclohexano. Las constantes obtenidas en los distintos medios se recogen en la Tabla 8.

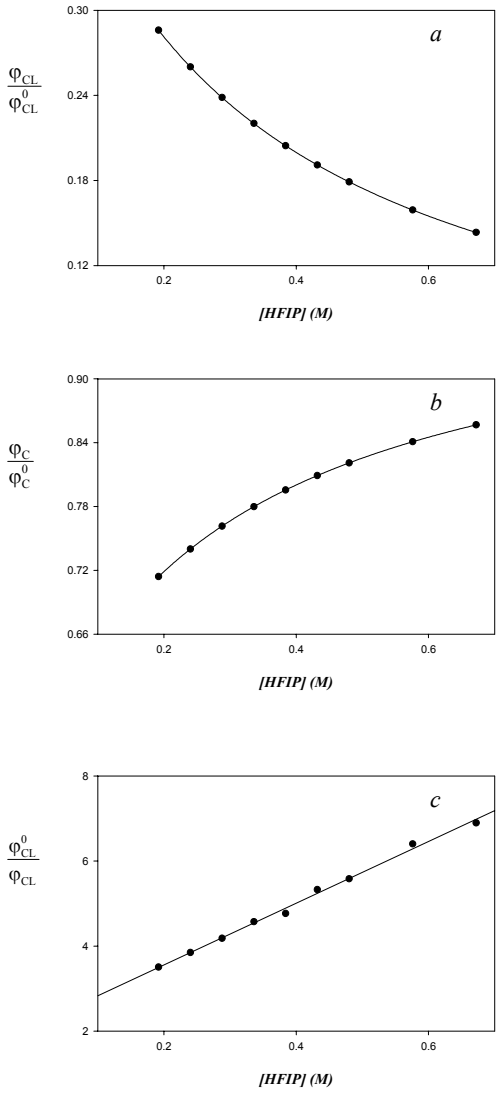


Figura 25.- Representación de la relación de rendimientos cuánticos de acuerdo con: (a) ecuación (35), (b) ecuación (36) y (c) ecuación (37). Para el sistema MBC-HFIP en 20% v/v tolueno-ciclohexano.

Tabla 8.- Constantes cinéticas del mecanismo del Esquema 18, obtenidas de las ecuaciones teóricas deducidas para este mecanismo.

MBC			**MHN**		
$k_1\tau^0_{PTC}$ / M^{-1}	$k_2\tau^0_{CL}$ / M^{-1}	$k_{-2}\tau^0_C$	$k_1\tau^0_{PTC}$ / M^{-1}	$k_2\tau^0_{CL}$ / M^{-1}	$k_{-2}\tau^0_C$
HFIP en ciclohexano					
73±3[a]	28±2[c]	1.4±0.1[c]	33[a]		
77±2[b]	29±3[d]	1.4±0.1[d]			
HFIP en 20% v/v tolueno-ciclohexano					
95±3[a]	6.6±0.6[c]	0.90±0.06[c]	46±1[a]	1.7±0.1[c]	0.90±0.01[c]
110±3[b]	6.6±0.4[d]	0.90±0.04[d]	60±3[b]	1.7±0.1[d]	0.90±0.01[d]

[a] Calculados a partir de la ecuación (32).

[b] Calculados a partir de la ecuación (34).

[c] Calculados a partir de la ecuación (36).

[d] Calculados a partir de la ecuación (37).

Estos resultados, además de apoyar el mecanismo propuesto, permiten interpretar satisfactoriamente los decaimientos de fluorescencia del sistema MBC-HFIP. Así, a bajas concentraciones de HFIP cuando se está formando el PTC y la etapa k_{-1} puede considerarse despreciable, la fluorescencia a bajas longitudes de onda decae biexponencialmente. Este decaimiento sería triexponencial si se estableciera en el estado excitado el equilibrio PTC*-CL*. Por otra parte, los

decaimientos triexponenciales que se observan en el rango de concentraciones intermedias de HFIP, cuando todavía no se ha formado C en el estado fundamental, corresponden al proceso PTC*→CL*→C*. Por tanto, de acuerdo con lo que se muestra en el Esquema 18, las especies C* se pueden formar a partir de los CL* o por excitación directa, una vez formado C en el estado fundamental. En cualquier caso, los resultados experimentales indican que, a altas concentraciones de HFIP, se establece el equilibrio CL*↔C*. Si suponemos que los tiempos de vida de las diferentes especies no cambian sensiblemente al pasar de la MBC al MHN o al cambiar el medio, los datos de la Tabla 8 nos permiten extraer interesantes conclusiones. En primer lugar, estos datos muestran que las constantes k_1 y k_2 son mayores para la MBC que para el MHN. Es decir, que CL* y C* se forman más rápidamente, o si se quiere, a más bajas concentraciones de HFIP, para el sistema MBC-HFIP que para MHN-HFIP. Por otra parte, la adición de tolueno al medio de reacción tiene un efecto opuesto sobre estas constantes. Así, mientras que la presencia de tolueno acelera ligeramente la formación de CL*, retrasa la de C*.

4.3- Propiedades espectrales de la N,N-dimetil betacarbolina, DMBC, y de su derivado 6-sulfónico, BCSA, en disoluciones acuosas de ácido sulfúrico.

Hace varios años, en los estudios llevados a cabo por nuestro grupo de investigación sobre las reacciones de sulfonación de las betacarbolinas *(Carmona y col., 1989)*, se observó que en las disoluciones muy concentradas de ácido sulfúrico las betacarbolinas sulfonadas presentaban una emisión a 400 nm similar a la de los exciplejos CL*. Por esta razón, hemos creído que una revisión de las propiedades espectrales de estos derivados sulfonados podría contribuir al esclarecimiento de la naturaleza de los exciplejos CL*, que, como se ha visto en el capítulo anterior,

juegan un papel fundamental en las reacciones ESPT de la MBC. Así pues, en este capítulo se recogen los resultados del estudio de la influencia de la acidez en las propiedades espectrales del ácido N,N-dimetil-9H-pirido[3,4-b]indol-6-sulfónico, BCSA, y de la N,N-dimetilbetacarbolina, DMBC.

En la Figura 26, se muestran los cambios que experimenta el espectro de absorción ultravioleta visible del BCSA al variar la concentración de ácido sulfúrico desde 1 M hasta 18 M. Como se aprecia en la gráfica del interior de esta figura, la representación de las absorbancias a 258 nm frente a la concentración de ácido sulfúrico da una doble sigmoide, con dos claras mesetas, indicativa de dos procesos sucesivos de protonación.

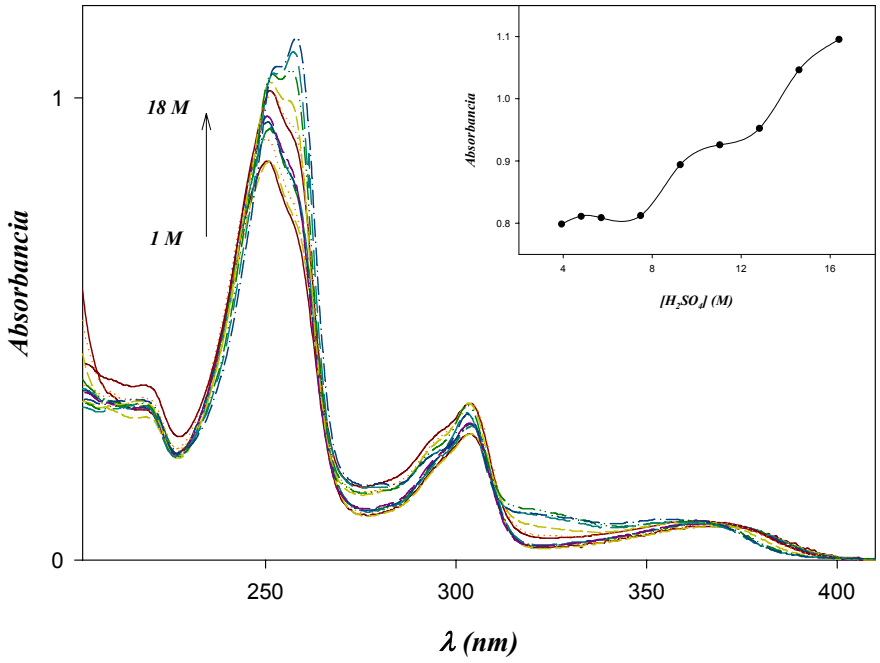
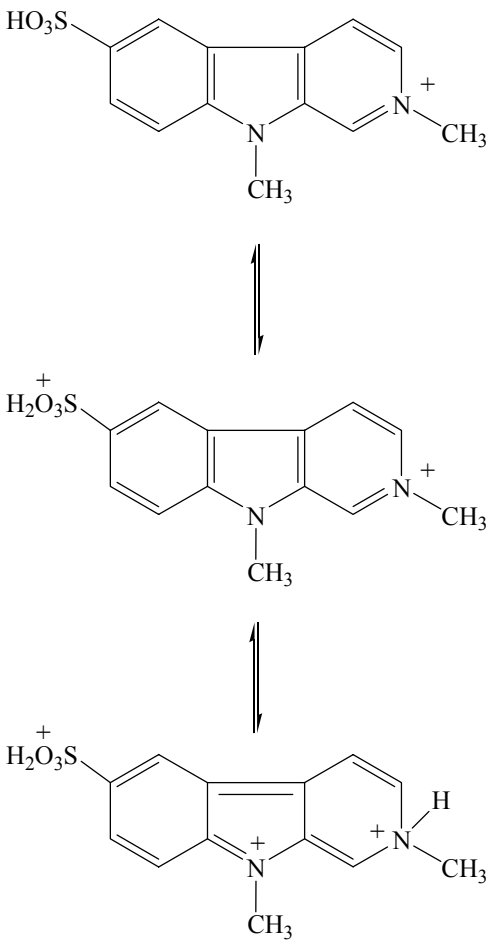


Figura 26.- Espectros de absorción del BCSA en disoluciones de ácido sulfúrico 1-18 M. En el interior: curva de valoración obtenida a partir de los datos de absorbancia medidos a 258 nm.

El análisis de estos datos de ionización mediante el método EAM, da, para la primera protonación, un pK_a = -2.6±0.3 y un valor de m* = 0.46±0.08, característico de las protonaciones sobre átomos de oxígeno *(Bagno y col., 1987)*. Esto indicaría que esta primera protonación tendría lugar, como cabe esperar, sobre un átomo de oxígeno del grupo sulfónico y daría lugar a las especies dicatiónicas, DC, que se muestran en el Esquema 19. Téngase en cuenta que la BCSA se encuentra en agua en su forma de monocatión piridínico.

El valor estimado para el segundo pK_a es de -7±2 y presenta un valor de m* = 1.1±0.3. Nuestros estudios previos de los espectros de RMN de ^{13}C de esta especie demuestran concluyentemente que esta protonación tiene lugar sobre uno de los átomos de nitrógeno del anillo de betacarbolina *(Muñoz y col., 1988)*. De hecho, m* presenta el valor típico de las protonaciones sobre átomos de nitrógeno *(Bagno y col., 1987)*. Puesto que la protonación sobre el átomo de nitrógeno pirrólico del BCSA rompería la aromaticidad del anillo de la betacarbolina y ocasionaría, contrariamente a lo que se observa experimentalmente, una importante disminución de la fluorescencia, debemos concluir que esta segunda protonación tiene lugar sobre el átomo de nitrógeno piridínico. Esta protonación del nitrógeno piridínico rompería parcialmente la aromaticidad del anillo de betacarbolina y daría lugar a los tricationes, TC, que se muestran en el Esquema 19.



Esquema 19.- Equilibrios prototrópicos de la BCSA en disoluciones de ácido sulfúrico.

El espectro de fluorescencia del BCSA en las disoluciones concentradas de ácido sulfúrico consiste en una banda ancha y sin estructura cuyo máximo de emisión se desplaza hacia el azul a medida que aumenta la concentración de ácido sulfúrico, Figura 27.

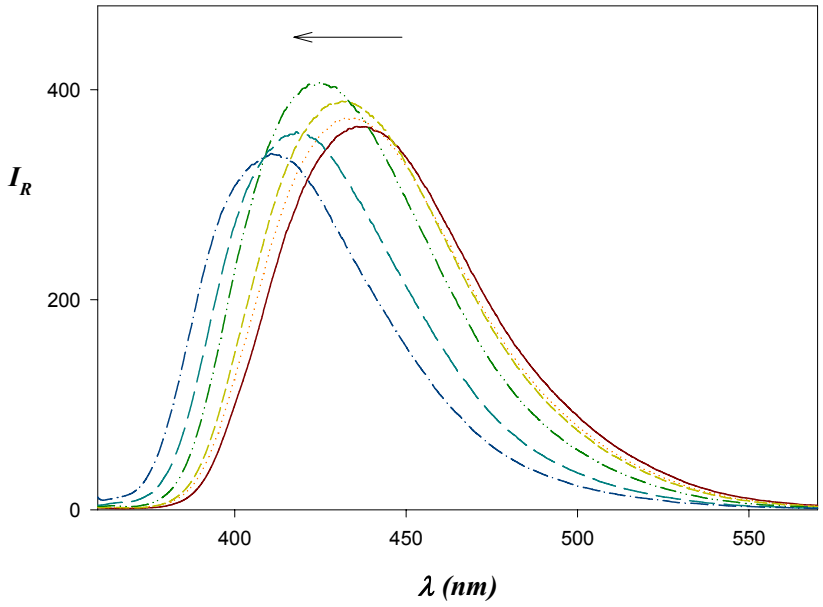


Figura 27.- Espectros de emisión del BCSA, λ_{exc} = 350 nm, en disoluciones de ácido sulfúrico 0.2 - 16.2 M.

Dependiendo del rango de acidez, esta banda se puede deconvolucionar en un sistema de dos o tres bandas. Así, como se muestra en la Figura 28, en el rango de baja acidez, la deconvolución de los espectros de fluorescencia da dos bandas con máximos a 450 nm y 420 nm, cuyas intensidades disminuyen y aumentan, respectivamente, al aumentar la acidez. No obstante, para deconvolucionar el perfil del espectro de emisión en medios más ácidos, $[H_2SO_4]$ > 10 M, se requiere una tercera banda a 400 nm.

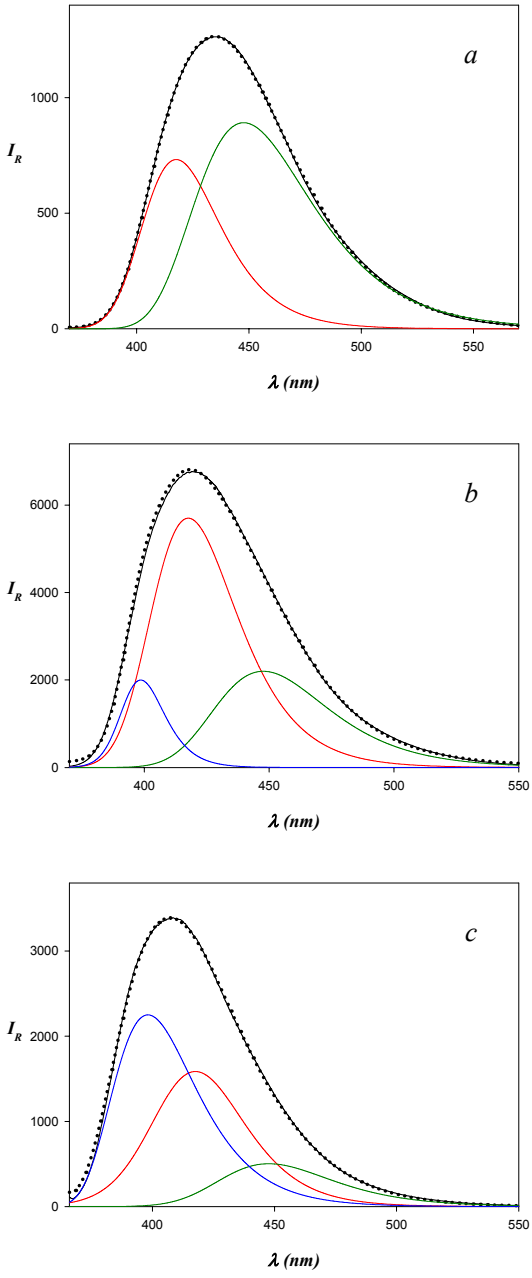


Figura 28.- Deconvolución de los espectros de emisión del BCSA en disoluciones de ácido sulfúrico 0.89 M (a), 12.3 M (b) y 17.8 M (c). λ_{exc} (a) 300 nm, (b) y (c) 360 nm.

La intensidad de esta nueva banda a 400 nm crece a medida que aumenta la concentración de ácido sulfúrico. Como ésta es la banda predominante en las disoluciones concentradas de ácido sulfúrico próximas a 18 M, debe corresponder a la emisión de los tricationes. Dado que la intensidad de esta última banda crece a expensas de la de 420 nm, consideraremos que las especies que emiten a 420 nm son las precursoras de los tricationes que emiten a 400 nm.

Es importante señalar que, incluso en el rango de acidez en el que el grupo sulfónico todavía no está protonado en el estado fundamental, $[H_2SO_4]< 5$ M, se requieren las bandas a 450 nm y 420 nm para resolver el perfil del espectro de fluorescencia. Si tenemos en cuenta, además, que los espectros de excitación de las emisiones en los extremos azul y rojo de estos espectros de fluorescencia son diferentes, Figura 29, podemos sospechar que en estos medios de baja acidez existe una heterogeneidad en el estado fundamental del BCSA.

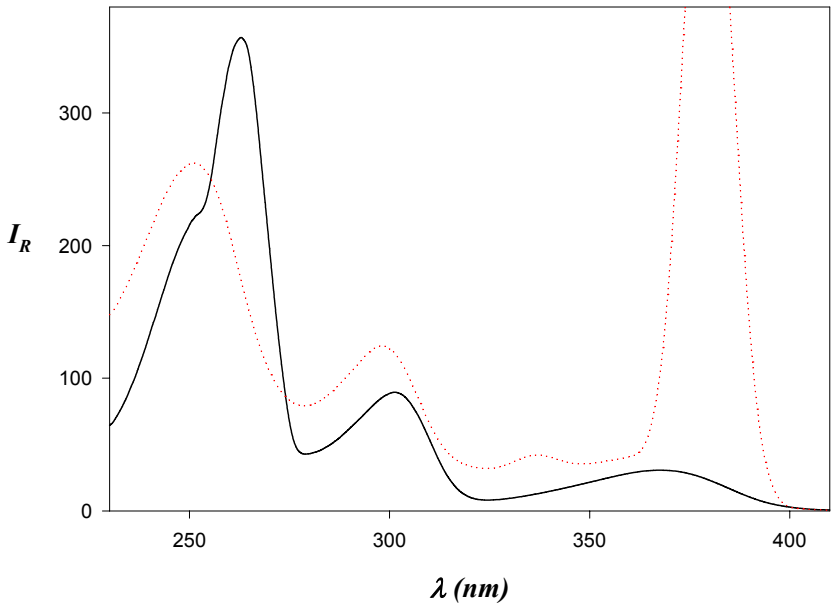


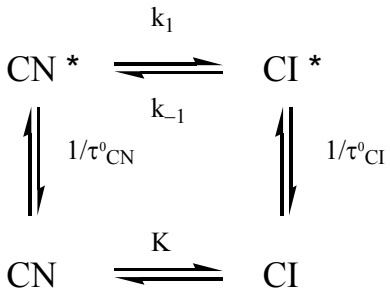
Figura 29.- Espectros de excitación del BCSA en disoluciones de ácido sulfúrico 1.78 M obtenidos con λ_{em} = 380 nm (¨) y λ_{em} = 530 nm (—).

Los datos de fluorescencia con resolución temporal apoyan esta hipótesis ya que, en este rango de acidez, $[H_2SO_4] < 5$ M, las curvas de decaimiento de fluorescencia se ajustan a funciones biexponenciales con tiempos de vida que cambian con la concentración de ácido sulfúrico y factores preexponenciales positivos en todo el rango de longitudes de onda del espectro de emisión, Tabla 9.

Tabla 9.- Tiempos de vida y factores preexponenciales (entre paréntesis) obtenidos del análisis de los decaimientos de fluorescencia del BCSA a λ_{exc}= 250 nm y λ_{em}= 440.

$[H_2SO_4]$ /M	τ_1 /ns	τ_2 /ns	χ^2
0.89	20.79 (0.100)	7.8 (0.024)	1.053
1.78	20.11 (0.094)	7.3 (0.029)	1.099
2.67	19.70 (0.084)	6.9 (0.031)	1.091
3.56	19.29 (0.092)	6.4 (0.028)	1.181
4.45	18.80 (0.089)	6.0 (0.027)	1.119

Estos resultados se pueden explicar si admitimos que, tanto en el estado fundamental como en el estado excitado, existen dos especies catiónicas CN y CI en equilibrio. La especie CN sería la responsable de la emisión a 450 nm y su isómera CI de la emisión a 420 nm. Así pues, el comportamiento del BCSA en las disoluciones de bajas concentraciones de ácido sulfúrico se describiría mediante el modelo cinético que se muestra en el Esquema 20.



Esquema 20.- Equilibrio CN↔CI del BCSA.

De acuerdo con este mecanismo, la evolución con el tiempo de las concentraciones de las especies CN y CI en el estado excitado, tras el pulso de excitación, pueden expresarse mediante las siguientes ecuaciones:

$$[CN^*] = \sum n_i e^{-\lambda_i t} \quad (i = 1,2) \tag{38}$$

$$[CI^*] = \sum m_i e^{-\lambda_i t} \quad (i = 1,2) \tag{39}$$

en las que las inversas de los tiempos de vida $\lambda_1=1/\tau_1$ y $\lambda_2=1/\tau_2$ vienen dadas por:

$$\lambda_{1,2} = \frac{(A + B) \mp \sqrt{(A - B)^2 + 4 k_1 k_{-1} [H_2SO_4]}}{2} \tag{40}$$

con

$$A = k_1 [H_2SO_4] + 1/\tau^0_{CN} \qquad B = k_{-1} + 1/\tau^0_{CI} \tag{41}$$

La combinación de λ_1 y λ_2 da las siguientes relaciones:

$$\lambda_1 + \lambda_2 = k_1 [H_2SO_4] + 1/\tau^0_{CN} + 1/\tau^0_{CI} + k_{-1} \tag{42}$$

$$\lambda_1 \lambda_2 = k_1 (1/\tau^0_{CI}) [H_2SO_4] + 1/\tau^0_{CN} (k_{-1} + 1/\tau^0_{CI}) \tag{43}$$

Según predicen las ecuaciones (42) y (43), las representaciones de $(\lambda_1+\lambda_2)$ y $(\lambda_1\lambda_2)$ frente a $[H_2SO_4]$ son lineales, Figura 30. A partir de las pendientes y ordenadas en el origen de estas representaciones se pueden calcular los siguientes valores para k_1 y k_{-1}, $k_1= 1.2\ 10^7\ M^{-1}s^{-1}$ y $k_{-1}= 5.8\ 10^7\ s^{-1}$. Por otra parte, se obtiene un tiempo de vida de 22 ns, característico de los cationes de la BC que emiten a 450

nm, y otro de 16 ns que se corresponde bastante bien con el del exciplejo CL* de la MBC que emite a 420 nm.

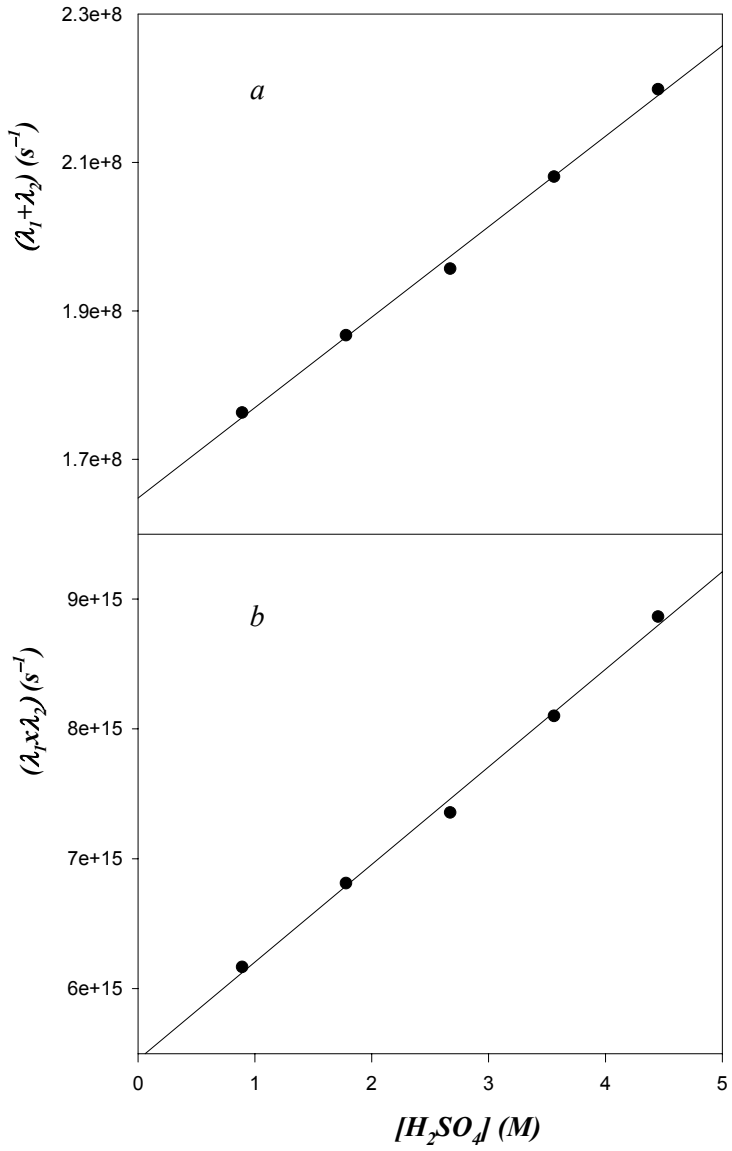


Figura 30.- Representaciones de $(\lambda_1 + \lambda_2)$ y $(\lambda_1\ \lambda_2)$ frente a $[H_2SO_4]$.

Con objeto de comprobar si esta heterogeneidad se da también en otros cationes betacarbolínicos hemos estudiado los espectros de la N,N-dimetilbetacarbolina, DMBC, en la región de baja acidez, $[H_2SO_4] < 5$ M, en la que se observa la heterogeneidad del derivado sulfonado. En disoluciones de ácido sulfúrico más concentradas se produce la sulfonación de la DMBC *(Carmona y col., 1989)*. En este rango de concentración de ácido sulfúrico, el espectro de fluorescencia de la DMBC experimenta un ligero desplazamiento al azul cuando aumenta la acidez. Como en el caso del BCSA, los perfiles de los espectros de emisión se pueden resolver por deconvolución en dos bandas con máximos a 420 nm y 450 nm, cuyas intensidades aumentan y disminuyen, respectivamente, cuando aumenta la acidez. Por otra parte, los resultados obtenidos indican que los decaimientos de la fluorescencia se ajustan a funciones biexponenciales con tiempos de vida que cambian con la concentración de ácido sulfúrico y amplitudes positivas a todas las longitudes de onda del espectro de emisión.

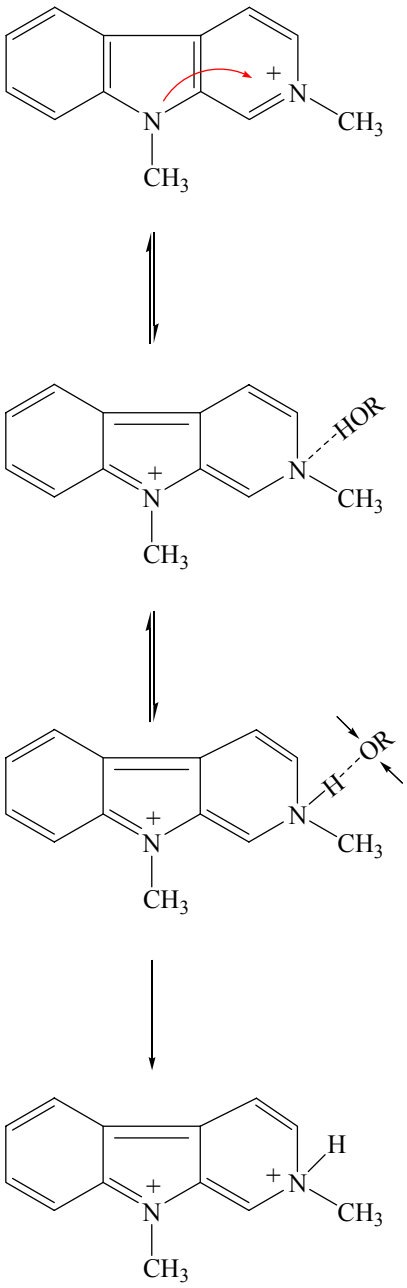
Con el fin de determinar la posible existencia de un efecto isotópico en la catálisis ácida del equilibrio CN↔CI, se han llevado a cabo una serie de medidas en las que se ha substituido el ácido sulfúrico por su derivado deuterado. En estas medidas se ha empleado agua deuterada y sin deuterar. Los resultados obtenidos indican que la substitución isotópica no introduce cambios significativos en el comportamiento del sistema. Por tanto, si se aplica a la DMBC el mismo modelo cinético propuesto para el BCSA, de las representaciones de $(\lambda_1+\lambda_2)$ y $(\lambda_1\lambda_2)$ frente a la concentración de ácido se obtienen los siguientes valores $k_1= 5.5\ 10^6\ M^{-1}s^{-1}$, $k_{-1}= 1.5\ 10^7\ s^{-1}$ y tiempos de vida de 22 ns y 17 ns, para el ácido sulfúrico sin deuterar, y $k_1= 9.4\ 10^6\ M^{-1}s^{-1}$, $k_{-1}= 1.5\ 10^7\ s^{-1}$ y tiempos de vida de 21 ns y 16 ns, para el deuterado. Dada la pequeña magnitud del efecto isotópico, se puede concluir que el efecto catalítico del ácido sulfúrico en el equilibrio CN↔CI no está relacionado con ningún tipo de proceso que esté controlado cinéticamente por una protonación.

Con relación a la posible naturaleza de este proceso, es conveniente recordar que en la segunda protonación del anillo de betacarbolina, la que rompe

parcialmente su aromaticidad, el átomo de nitrógeno piridínico rehibridiza su estructura electrónica sp^2 en otra sp^3. Evidentemente, el disolvente debe jugar un papel fundamental en este proceso energéticamente desfavorecido. Primero, debe facilitar la reorganización molecular previa al proceso de rehibridación. Segundo, estabilizar el átomo de nitrógeno una vez rehibridado y, tercero, asistir a la transferencia protónica. De acuerdo con ésto, el proceso de protonación se podría representar mediante el mecanismo del Esquema 21.

Según este mecanismo, la primera etapa de la transferencia protónica sería la reorganización quinonoide del anillo de betacarbolina. La fuerza impulsora de este proceso de isomerización sería la ICT desde el nitrógeno pirrólico al piridínico y la influencia del medio estaría relacionada con su capacidad para solvatar preferentemente la estructura quinonoide. En este sentido, la influencia del ácido sulfúrico en esta etapa de isomerización se podría relacionar con el efecto de "secado", o de disminución del número de moléculas de agua "libres", que provoca la fuerte hidratación de sus iones. Este efecto de desolvatación o"secado" favorecería la estructura quinonoide frente a la normal, ya que al estar la carga positiva mucho más deslocalizada requiere menos moléculas de agua para su hidratación.

Una vez reorganizada la molécula, tendría lugar la rehibridación del átomo de nitrógeno piridínico y su rápida estabilización por puente de hidrógeno. Con la transformación de este puente de hidrógeno tipo HBC en otro tipo PTC, se inicia el movimiento gradual del protón hasta que se concluye la transferencia protónica. Dada la naturaleza del medio, es razonable pensar que las moléculas de agua que intervienen en los procesos de hidratación y de interacción por puente de hidrógeno se encuentran formando agregados o *"clusters"*. De hecho, es bien conocida la tendencia del ácido sulfúrico a promover la formación de agregados o *"clusters"* de moléculas de agua en los que se refuerza cooperativamente la capacidad dadora/aceptora de puentes de hidrógeno de las moléculas de agua *(Lazaridis, 1998; Ding y Laasonen, 2004)*. Ésto estaría de acuerdo además con los modelos actuales sobre los procesos de transferencia protónica en medios acuosos *(Agmont, 2005)*.



Esquema 21.- Protonación del catión CN de la DMBC.

Teniendo en cuenta que, según nuestros resultados experimentales, los cationes isómeros, CI, son los precursores de los tricationes, TC, del BCSA, estas especies CI habría que identificarlas con alguno de los complejos HBC o PTC de este mecanismo. Por otra parte, estos CI deberían estar estructuralmente relacionados con los exciplejos CL* de la MBC, ya que ambos tienen emisiones muy parecidas. Según todo lo anterior, los CI y los CL* tendrían una estructura intermedia entre la plana totalmente aromática del anillo monoprotonado y la quinonoide parcialmente aromática del anillo diprotonado.

Pese a lo similar de sus estructuras, conviene señalar que mientras los CI* se pueden formar directamente por excitación de los propios CI del estado fundamental, los CL* son exciplejos que se forman por reacción de los PTC* piridínicos de la MBC con una molécula de HFIP. Siguiendo el modelo propuesto para la formación de los CI, la formación de los CL* implicaría la reorganización quinonoide de los PTC en el estado excitado, la piramidalización del átomo de nitrógeno piridínico y su estabilización por puente de hidrógeno con una molécula de HFIP.

Según se establece en nuestro mecanismo, la fuerza impulsora del proceso de reorganización del anillo de betacarbolina es la ICT desde el nitrógeno pirrólico al piridínico. Evidentemente, este proceso estará tanto más favorecido cuanto mayor sea la densidad de carga positiva del átomo de nitrógeno piridínico. De esta forma, la carga positiva sobre el átomo de nitrógeno piridínico del CN favorece tanto la ICT que su reorganización a CI tiene lugar en el estado fundamental. Por el contrario, dada la menor densidad de carga positiva sobre el átomo de nitrógeno piridínico del PTC de la MBC su reorganización sólo tiene lugar en el estado excitado, que es donde se observa la formación de CL*.

Siguiendo nuestro mecanismo, supondremos que en el caso de la reacción CL*$\rightarrow$C*, a diferencia de lo que ocurre en el caso del CI que evoluciona a TC, el catión quinonoide que se forma se reorganizaría rápidamente para dar el catión plano totalmente aromático.

4.4.- Interacciones por puente de hidrógeno y reacciones ESPT de la betacarbolina, BC, con HFIP en ciclohexano y tolueno.

Una vez estudiados los derivados metilados, modelos de las distintas especies prototrópicas de la BC, concluiremos nuestro estudio analizando las interacciones por puente de hidrógeno y las reacciones de transferencia protónica fotoinducidas de la propia BC y el HFIP en ciclohexano y en tolueno.

El espectro de absorción de la BC en ciclohexano consta de tres bandas: una intensa y ligeramente estructurada a 240 nm, otra de intensidad media a 280 nm y finalmente una tercera mucho más débil con máximos a 328 nm y 340 nm. En la

Figura 31 se muestran los cambios que experimenta el espectro de absorción de la BC al aumentar la concentración de HFIP en ciclohexano. Estos cambios espectrales presentan un punto isosbéstico a 300 nm.

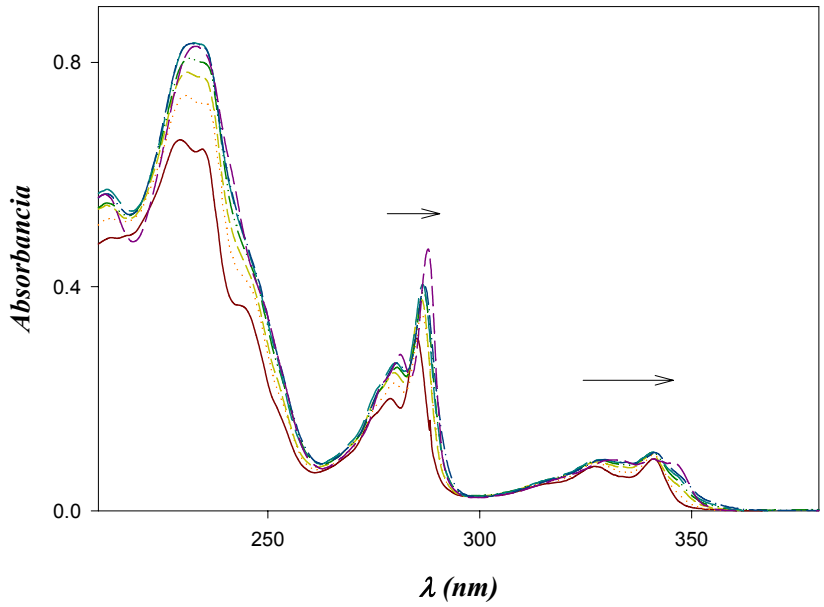


Figura 31.- Espectros de absorción del sistema BC-HFIP en ciclohexano a bajas concentraciones de HFIP (0-1 10^{-4} M).

Por otra parte, en este rango de bajas concentraciones de HFIP, la adición de HFIP provoca un desplazamiento al rojo y una intensificación de la fluorescencia. No obstante, como se muestra en la Figura 32, un análisis detallado de estos espectros indica que los cambios espectrales se producen secuencialmente; primero se produce el desplazamiento batocrómico de la banda y después el aumento de la intensidad.

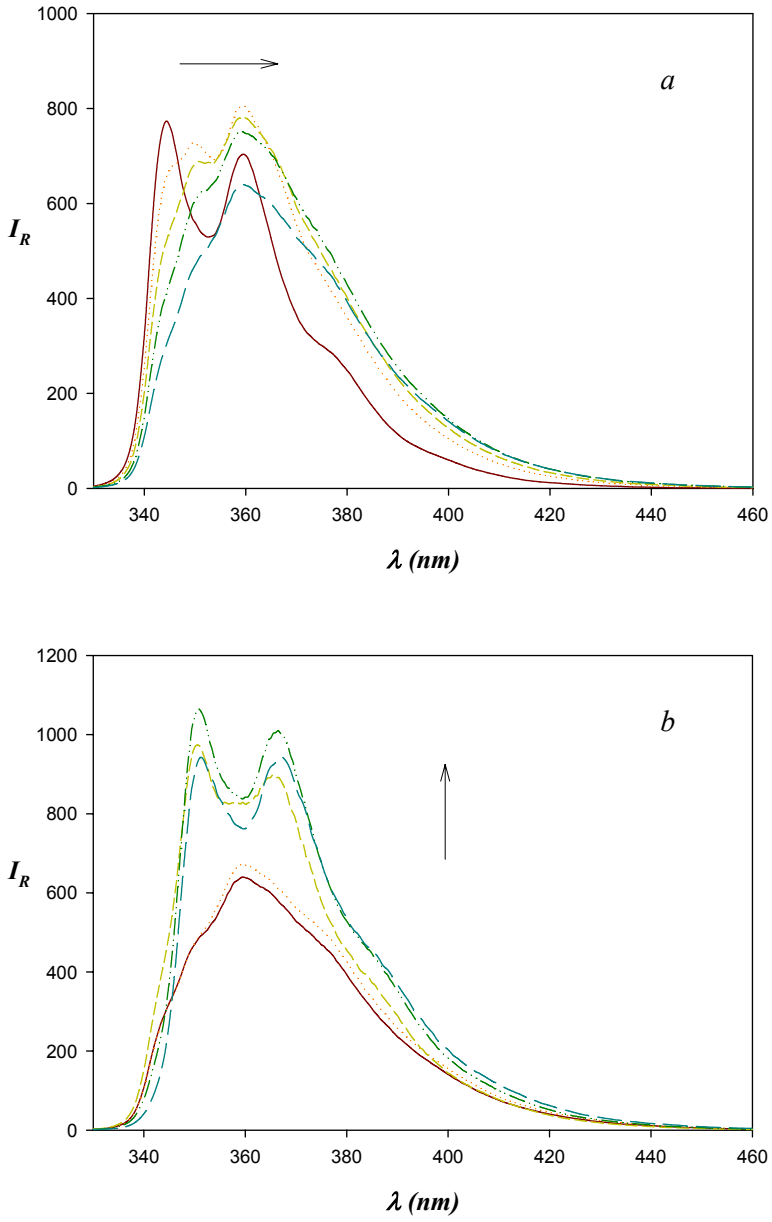


Figura 32.- Espectros de emisión del sistema BC-HFIP en ciclohexano en los rangos de concentraciones de HFIP bajas (0-8.64 10^{-4} M) (a) y medias (8.64 10^{-4}-8.64 10^{-3} M) (b), λ_{exc} = 320nm.

Los cambios que experimenta el espectro de excitación del sistema BC-HFIP con la longitud de onda de emisión en el rango de bajas concentraciones de HFIP, Figura 33, también confirman la existencia de una heterogeneidad en el estado fundamental del sistema BC-HFIP.

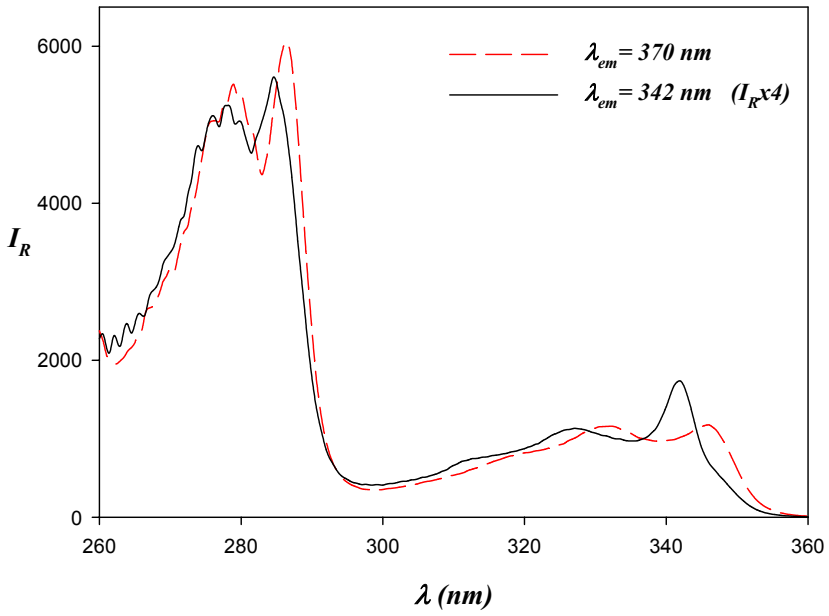


Figura 33.- Espectros de excitación del sistema BC-HFIP en ciclohexano a una concentración de HFIP de 8.64 10^{-4} M.

A más altas concentraciones de HFIP, los cambios que experimentan los espectros de absorción y emisión de la BC en ciclohexano son completamente similares a los de la BCA, Figura 34. Esto es, en el espectro de absorción, Figura 34a, se produce un ligero efecto hipercrómico y un ensanchamiento de la banda a longitudes de onda más largas, cuyo borde al rojo aparece como una larga cola de absorción que se extiende casi hasta los 450 nm. En el de emisión, Figura 34b, se observa una amortiguación de la fluorescencia y la formación de una débil banda de emisión sobre 520 nm.

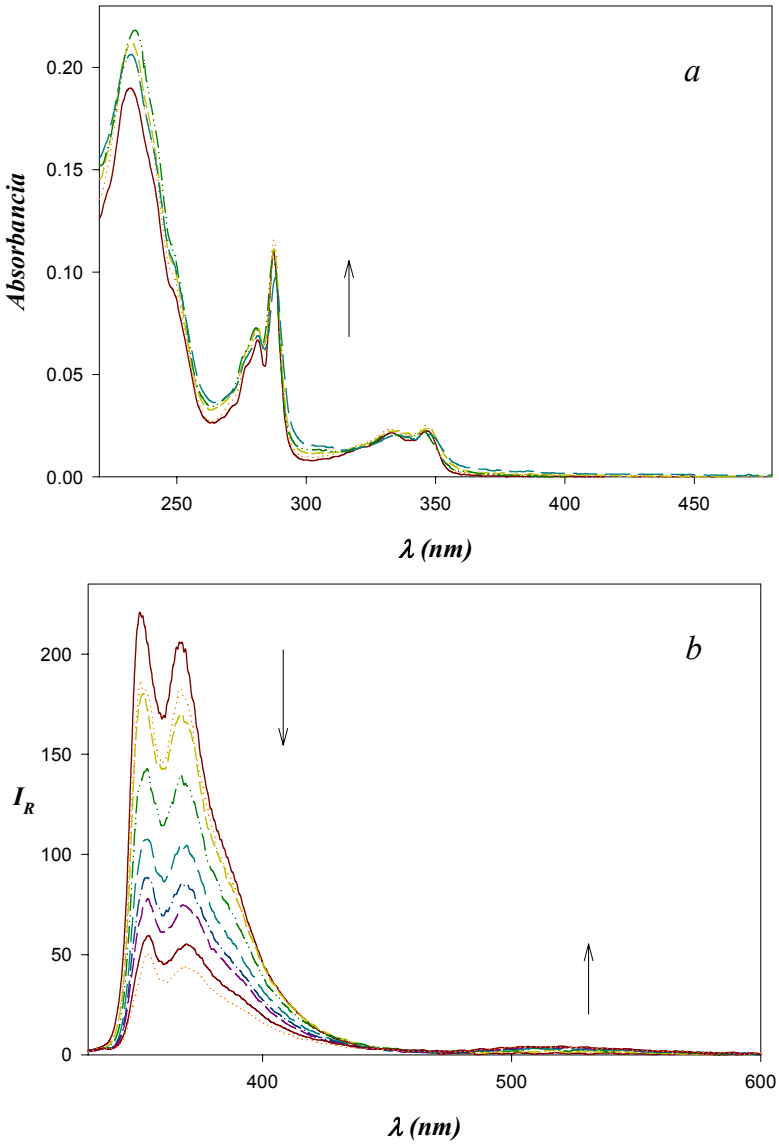


Figura 34.- Espectros de absorción (a) y de emisión, λ_{exc} = 320 nm, (b) de la BC en ciclohexano a altas concentraciones de HFIP ($8.64\ 10^{-3}$- $8.64\ 10^{-2}$ M).

De la representación Benesi-Hildebrand de los datos de absorbancia, Figura 35a, se obtiene un valor de 63±2 M^{-1} para la constante de formación del complejo BC-HFIP que se forma en estos medios de alta concentración de HFIP. Esta constante es unas cinco veces mayor que la obtenida para el complejo BCA-HFIP, 12±1 M^{-1}. La representación Benesi-Hildebrand de las áreas bajo los espectros de emisión, Figura 35b, da una constante de equilibrio de 67±1 M^{-1}, que coincide razonablemente con la que se obtiene por absorción. Por tanto, se trata de un proceso estático de amortiguación de la fluorescencia que se puede relacionar con la formación, en el estado fundamental, de una nueva especie que presenta doble emisión y cuyo rendimiento cuántico es extremadamente bajo.

En este rango de altas concentraciones de HFIP, los resultados de fluorescencia con resolución temporal son muy similares a los obtenidos para el sistema BCA-HFIP. Como en este último sistema, los ajustes de las curvas de decaimiento de la fluorescencia a 520 nm son biexponenciales, Tabla 10, con un tiempo constante próximo a 4.0 ns y otro más corto que disminuye al aumentar la concentración de HFIP. Estos tiempos tienen factores preexponenciales iguales y de signo contrario.

Tabla 10.- Ajustes de las curvas de decaimiento de fluorescencia del sistema BC-HFIP en ciclohexano.

10^2 [HFIP] /M	τ_1 / ns	τ_2 / ns
1.92	2.47 (-0.186)	4.00 (0.216)
2.40	1.02 (-0.144)	4.06 (0.163)
2.88	1.90 (-0.124)	3.94 (0.154)
3.36	1.70 (-0.122)	3.80 (0.150)
3.84	1.50 (-0.085)	3.99 (0.106)

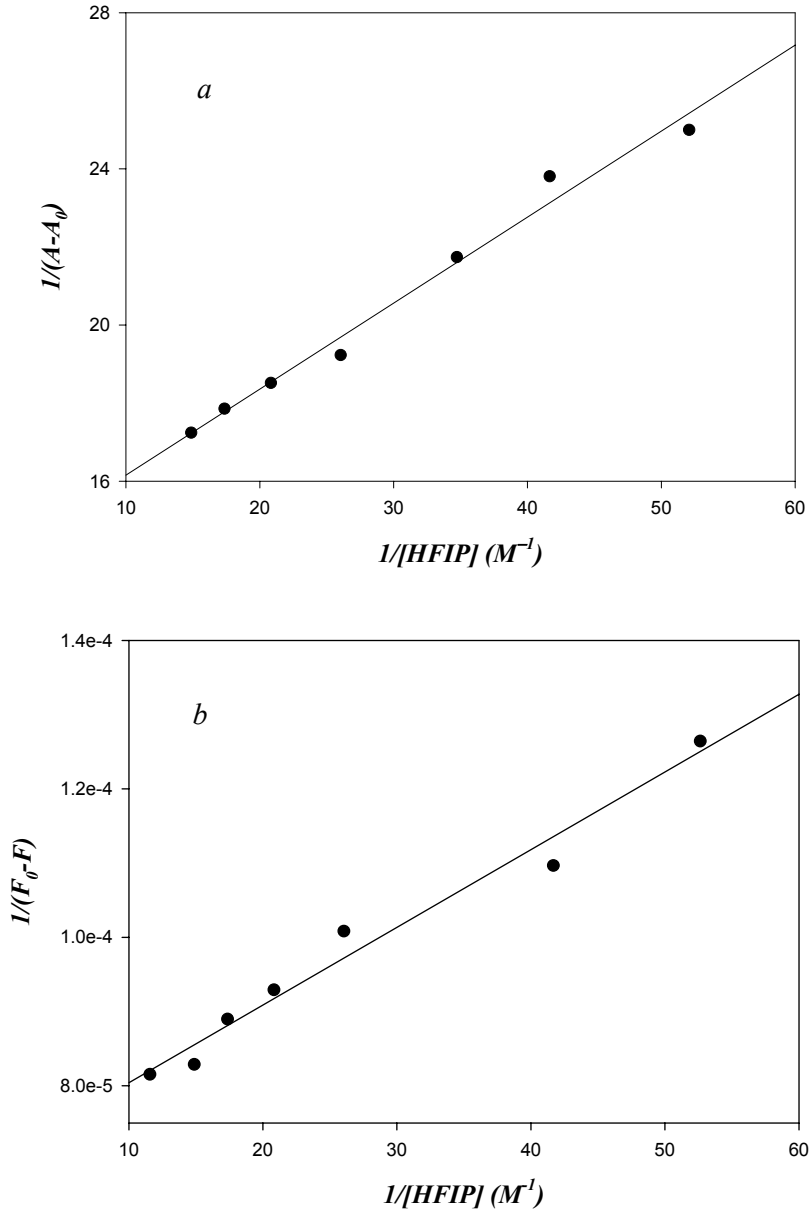


Figura 35.- Representación Benesi Hildebrand de los datos de absorción (a) y emisión, λ_{exc} = 320 nm, (b) de la BC en ciclohexano a altas concentraciones de HFIP (8.64 10^{-3}- 8.64 10^{-2} M).

Si suponemos, por tanto, que en el sistema BC-HFIP en ciclohexano también opera el mecanismo del Esquema 16, se puede efectuar un tratamiento de estos resultados dinámicos similar al realizado anteriormente para la BCA. Así, de la dependencia del tiempo corto con la concentración de HFIP, Figura 36, se obtiene un valor de (1.3±0.4) 10^{10} M^{-1} s^{-1} para la constante bimolecular, k, de la transformación LE→CT. De la ordenada en el origen de esta representación se puede estimar un tiempo de vida para el precursor del estado CT de 6 ns. Tanto estos valores, como el de 4.0 ns correspondiente al tiempo de vida del estado CT, coinciden excelentemente con los obtenidos para la BCA.

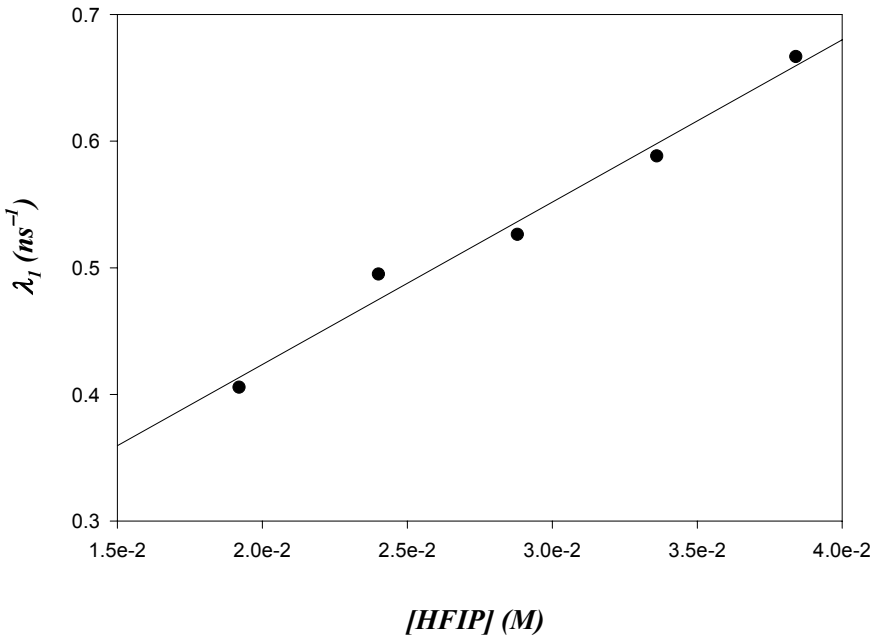


Figura 36.- Representación de λ_1 frente a la concentración de HFIP.

Una vez analizados los cambios espectrales que experimenta el sistema BC-HFIP en ciclohexano, pasaremos a estudiar su comportamiento en tolueno. En este disolvente los cambios que sufren los espectros de absorción y emisión del sistema BC-HFIP, en el rango de bajas concentraciones de dador, son muy parecidos a los que se observan en ciclohexano. Por tanto, es razonable pensar que los complejos BC-HFIP que se forman en ambos disolventes deben ser similares. No obstante, como se verá a continuación, a más altas concentraciones de HFIP, los comportamientos del sistema BC-HFIP en ciclohexano y en tolueno son completamente diferentes, lo que indica que estos complejos iniciales evolucionan de forma distinta en cada disolvente.

Bajo estas condiciones de alta concentración de dador, el comportamiento del sistema BC-HFIP en tolueno podría considerarse como una mezcla de los de la MBC-HFIP y de la BCA-HFIP en tolueno. Como en el caso del sistema MBC-HFIP, en el espectro de emisión, Figura 37, se observa una amortiguación y ensanchamiento de la banda a cortas longitudes de onda. Dicho ensanchamiento parece indicar la formación de un CL*, aunque su banda a 420 nm no llega a ser tan nítida e intensa como en el caso de la MBC. Pero, por otra parte, en dicho espectro se observa la débil emisión a 500 nm típica del sistema BCA-HFIP, aunque no aparece la emisión a 450 nm característica de los cationes betacarbolínicos. En el caso del sistema BC-HFIP en tolueno, esta emisión catiónica sólo se observa débilmente en disoluciones altamente concentradas de HFIP, > 1 M.

Los resultados obtenidos de los decaimientos de fluorescencia del sistema BC-HFIP se asemejan a los del sistema BCA-HFIP en tolueno. Como en este caso, a altas concentraciones de HFIP, los decaimientos de la fluorescencia se ajustan razonablemente a funciones triexponenciales con un tiempo corto alrededor de 1 ns y factor preexponencial negativo, un tiempo intermedio en torno a 4-5 ns y un tiempo largo próximo a 15-16 ns.

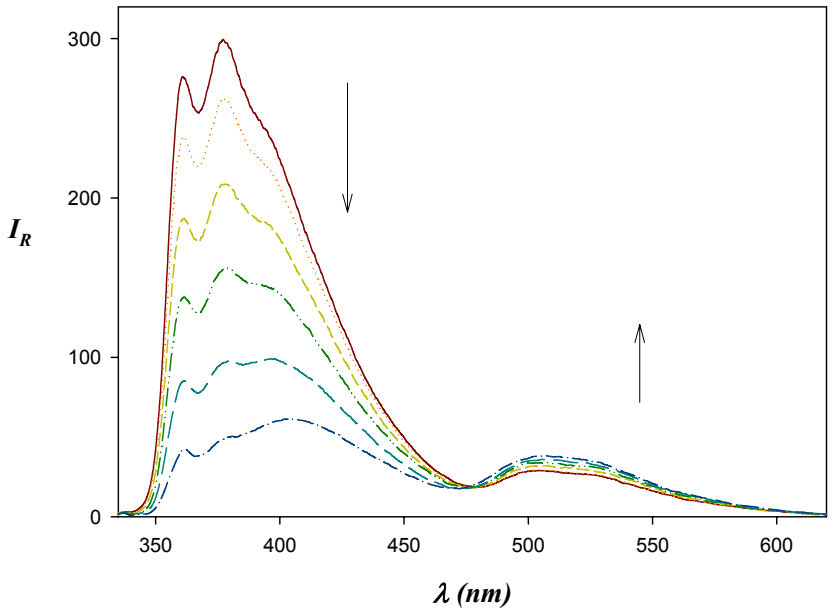


Figura 37.- Espectros de emisión del sistema BC-HFIP (9.6 10^{-2}– 0.48 M) en tolueno, λ_{exc} = 325 nm.

Dadas las similitudes entre el comportamiento de la BC y el de la BCA y la MBC, es lógico pensar que, dependiendo del medio, las estructuras de los complejos de la BC deben estar relacionadas con las de la BCA y MBC. De hecho, como se muestra en la Figura 38, a altas concentraciones de HFIP, los espectros de absorción y de emisión de la BC y BCA en ciclohexano son muy parecidos. Esto indica que, aunque por caminos diferentes, estas especies deben formar complejos con HFIP de estructuras muy parecidas.

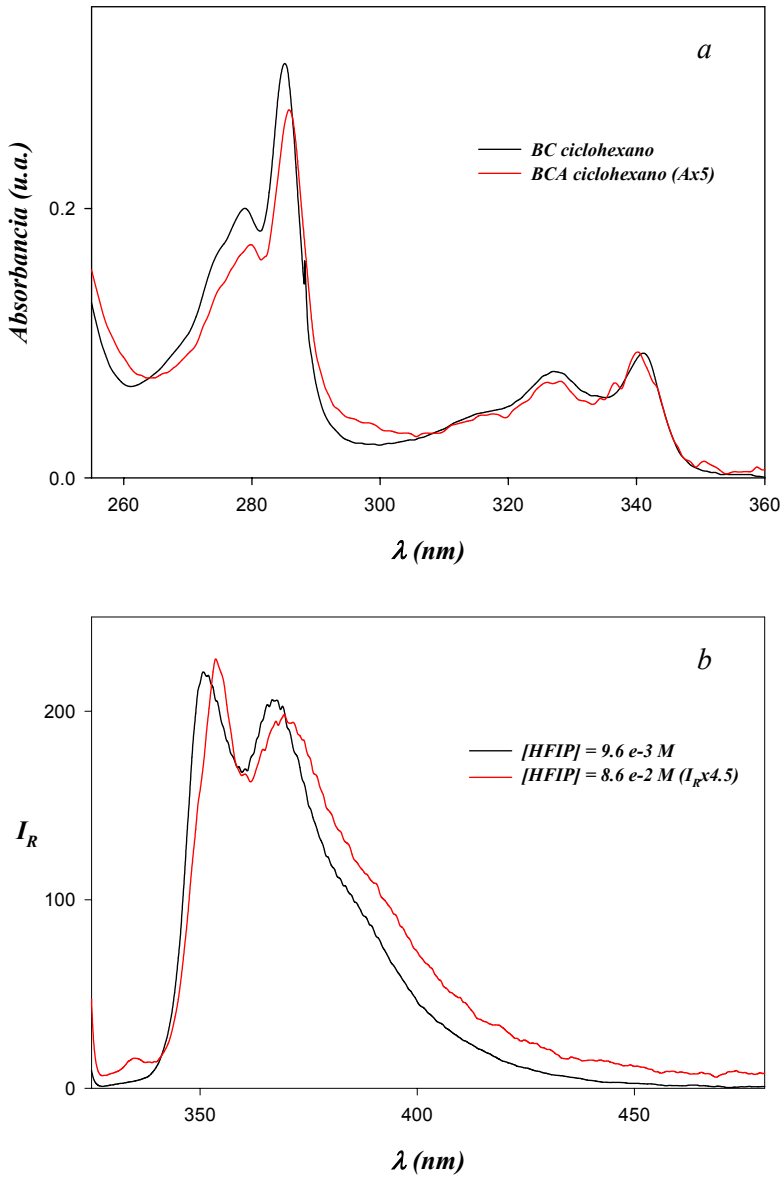


Figura 38.- Comparación de los espectros de absorción (a) y de emisión (b) de la BC (---) y de la BCA (---)en ciclohexano.

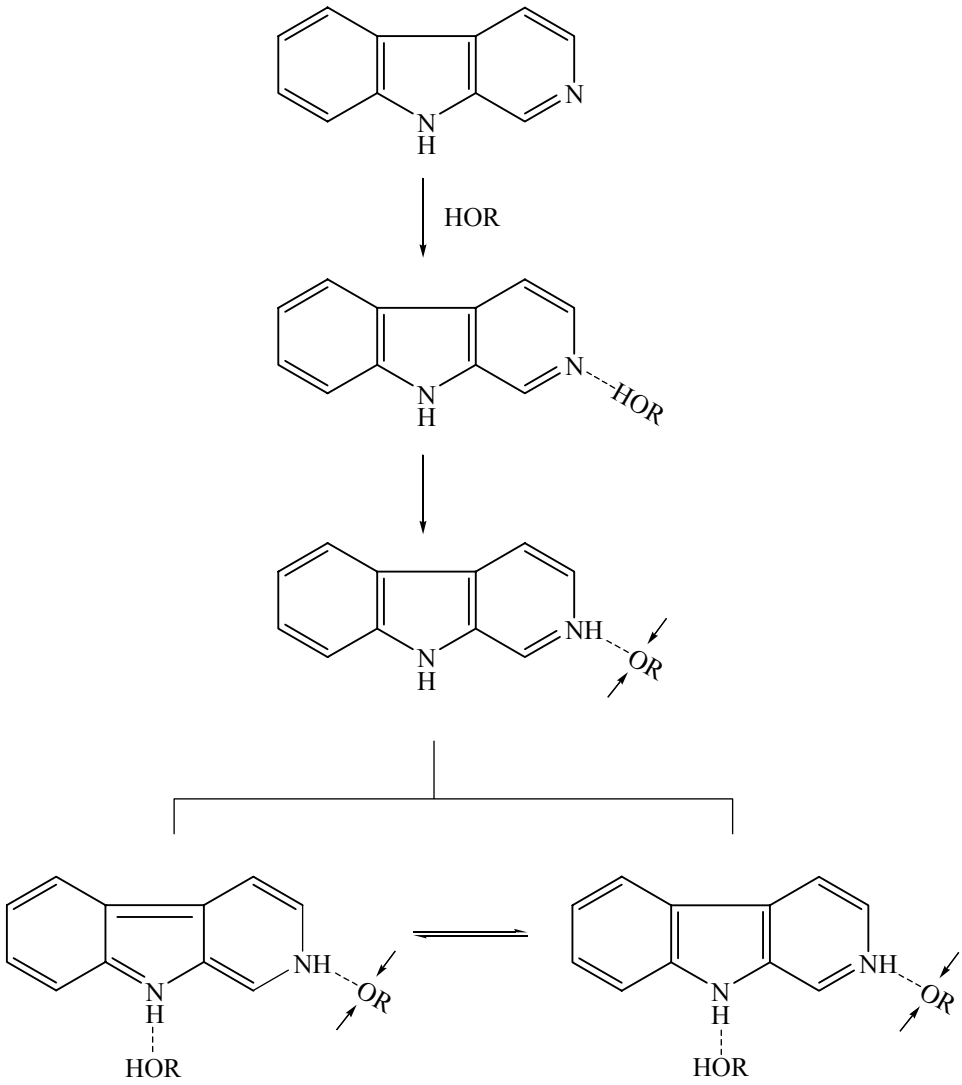
La molécula de BC tiene dos centros potenciales para la formación de puentes de hidrógeno, uno aceptor, el átomo de nitrógeno piridínico, y otro dador, el nitrógeno pirrólico. Las propiedades aceptoras del átomo de nitrógeno piridínico son moderadamente fuertes. Por el contrario, las propiedades dadoras del nitrógeno pirrólico son muy débiles *(Guardado y col., 1997)*. Como, por otra parte, el HFIP es un dador extremadamente fuerte y un aceptor muy débil *(Marcus, 1993)*, parece lógico pensar que la interacción por puente de hidrógeno entre la BC y el HFIP se inicie, tanto en ciclohexano como en tolueno, a través del nitrógeno piridínico. Como se muestra en el Esquema 22 esta interacción daría lugar primero a un complejo tipo HBC y posteriormente a un complejo tipo PTC.

La densidad de carga positiva que genera este PTC sobre el átomo de nitrógeno piridínico de la BC favorece la ICT desde el nitrógeno pirrólico al piridínico. Este proceso provocaría un notable aumento de la acidez del grupo pirrólico que, a su vez, facilitaría la formación de un doble complejo piridínico-pirrólico, DHB, en el que las moléculas de HFIP interaccionan simultáneamente con ambos nitrógenos de la BC.

La formación de este DHB generará una separación de carga entre los átomos de nitrógeno piridínico y pirrólico similar, aunque menor, a la del zwiterión de la BCA. Como en el caso de la BCA, cabe esperar que se establezca un equilibrio entre las estructuras zwiteriónica y quinonoide del DHB cuya posición dependerá del disolvente. Así, el DHB adoptaría una estructura quinonoide en ciclohexano y mantendría su estructura zwiteriónica en tolueno. De esta forma se explicaría el cambio de reactividad que se observa, a altas concentraciones de HFIP, al pasar de ciclohexano a tolueno.

Según este modelo, el DHB quinonoide de la BC y el PTCQ de la BCA tendrían estructuras muy parecidas. Así, a altas concentraciones de HFIP, los sistemas BC-HFIP y BCA-HFIP evolucionarían en ciclohexano de forma parecida. De acuerdo con los resultados experimentales, la formación de estos complejos

provoca una amortiguación de la fluorescencia en la banda al azul del espectro y la formación de una banda de emisión CT muy desplazada al rojo.



Esquema 22.- Interacciones por puente de hidrógeno entre la BC y el HFIP.

Por el contrario, en tolueno, el DHB zwiteriónico de la BC se comportaría como el PTCZ de la BCA y daría una doble emisión con una banda CT a largas longitudes de onda. Además, como en las estructuras zwiteriónicas de los complejos DHB y PTCZ se mantiene la estructura tipo PTC del puente de hidrógeno piridínico, una fracción de moléculas de estos complejos puede evolucionar en el estado excitado como el PTC de la MBC para dar CL* y C*. No obstante, en ambos casos este camino debe estar muy poco favorecido, a juzgar por las débiles emisiones del CL* en el caso de la BC y del C* en el caso de la BCA.

De acuerdo con esta interpretación, consistente con los resultados experimentales, la débil banda de emisión de la betacarbolina por encima de los 500 nm no se debe, como hasta ahora se había creído, a la emisión de un supuesto fototautómero zwiteriónico, sino al solapamiento de las bandas CT de los isómeros quinonoide y zwiteriónico de los DHB de la BC.

5.- RESUMEN Y CONCLUSIONES.

Los resultados de nuestro estudio ponen claramente de manifiesto la compleja fotofísica del anillo de betacarbolina. Por una parte, la presencia de un átomo de nitrógeno piridínico y otro pirrólico con diferentes propiedades dadoras/aceptoras de puente de hidrógeno, proporciona al anillo de betacarbolina diferentes pautas de reactividad frente a aceptores/dadores protónicos. Por otra parte, las diferentes estructuras electrónicas de estos dos centros conjugados permiten que

se establezcan entre ellos procesos ICT. Ambas propiedades se ven drásticamente intensificadas tras la excitación por la luz.

La estrategia seguida, consistente en bloquear por metilación los átomos de nitrógeno pirrólico y piridínico del anillo de betacarbolina, nos ha permitido controlar y modular las propiedades dadoras/aceptoras de puente de hidrógeno y los procesos ICT que determinan la reactividad de dicho anillo. Estos derivados metilados nos han proporcionado, además, los modelos adecuados para estudiar individualmente las propiedades espectrales y fotofísicas de las diferentes formas prototrópicas de la betacarbolina. Del estudio individualizado de cada uno de estos derivados se han extraido los resultados y conclusiones que han servido de base para interpretar el comportamiento de la propia BC.

Así, de los resultados de nuestro estudio sobre la fotofísica de la BCA se pueden sacar dos conclusiones de especial relevancia. La primera es que en el estado fundamental de la BCA se establece un equilibrio entre dos formas isómeras zwiteriónica y quinonoide del anillo de betacarbolina. Dado que otros derivados de la BC muestran también equilibrios isoméricos similares, cabe pensar que este isomerismo sea una propiedad general del anillo de betacarbolina. Este isomerismo quinonoide-zwiteriónico, de importancia fundamental en la fotofísica del anillo de betacarbolina, puede jugar también un importante papel en otros anillos diaza-aromáticos de gran interés, tales como el de 7-azaindol.

La segunda conclusión que se extrae del estudio de la BCA es la naturaleza dual de la fluorescencia de sus isómeros. Este fenómeno, de gran interés y actualidad, hasta ahora desconocido en los derivados de la betacarbolina, tiene una doble importancia. Por una parte, establece la base experimental para una nueva interpretación del origen de las emisiones a largas longitudes de onda clásicamente atribuidas a especies zwiteriónicas. Por otra parte, pone de manifiesto el importante papel que juegan los procesos ICT en el anillo de betacarbolina. Aunque la importancia del proceso ICT desde el átomo de nitrógeno pirrólico al piridínico ya había sido resaltada por varios autores, la existencia de isómeros quinonoides añade,

además, la posibilidad de que estos procesos se den también en sentido contrario: del átomo de nitrógeno piridínico al pirrólico.

A nuestro juicio, la hipótesis sobre la estructura quinonoide y zwiteriónica de los isómeros de la BCA es razonable y está fundamentada. No obstante, creemos que hubiera sido interesante confirmarla haciendo uso de métodos teóricos y otros métodos experimentales más directos. Desgraciadamente, debido a la baja solubilidad de la BCA en disolventes apróticos, todos nuestros intentos para obtener información experimental sobre el isomerismo de la BCA mediante técnicas de RMN han sido infructuosos. Por otra parte, dada la complejidad del sistema, un estudio teórico sistemático y riguroso de la BCA hubiera quedado claramente fuera de los límites de nuestro trabajo.

Sin lugar a dudas, los resultados experimentales que prueban de forma más concluyente el isomerismo de la BCA, son los que se derivan del estudio de sus interacciones por puente de hidrógeno con HFIP. Las diferencias espectrales de las mezclas BCA-HFIP en ciclohexano y tolueno, no sólo apoyan la existencia de dos especies isómeras en la BCA, sino que, además, ponen de manifiesto que cada isómero sigue pautas de reactividad diferentes. Ambos isómeros forman dos tipos de complejos enlazados por puente de hidrógeno, uno a bajas y otro a altas concentraciones de HFIP. Siguiendo el modelo clásico, estos complejos representan las estructuras covalente, HBC, e iónica, PTC, de la interacción por puente de hidrógeno. Los complejos de cada isómero tienen propiedades diferentes; mientras que el PTC del isómero Q, PTCQ, favorece las bandas ICT de absorción y emisión de la BCA; el del isómero Z, PTCZ, las desfavorece y da lugar a especies de tipo catiónico.

El modelo ideal para estudiar la formación de estas especies catiónicas es la MBC, ya que, al tener bloqueado el átomo de nitrógeno pirrólico, sólo puede interaccionar por el átomo de nitrógeno piridínico. Nuestro estudio del sistema MBC-HFIP demuestra que la formación de cationes en el estado excitado es un proceso complejo en el que participan diferentes exciplejos. Según se deduce de

nuestros resultados, la reacción de transferencia protónica fotoinducida MBC-HFIP se inicia con la formación de un puente de hidrógeno entre el grupo OH del HFIP y el nitrógeno piridínico de la MBC. Dicho puente de hidrógeno puede adoptar las clásicas estructuras isoméricas de HBC y PTC, según que el protón esté más próximo al átomo de oxígeno del HFIP o al nitrógeno piridínico de la MBC. A medida que aumenta la concentración de HFIP, el equilibrio HBC↔PTC se desplaza en el estado fundamental hacia la formación de PTC.

Estos PTC juegan un papel fundamental en el proceso ESPT de la MBC, ya que a partir de ellos se forman, en el estado excitado, los C*. No obstante, la transformación de PTC* en C* no transcurre de forma directa, sino a través de un intermediato CL*. Este exciplejo se forma por reacción del PTC con una molécula de HFIP. Los CL* reaccionan, a su vez, con una nueva molécula de HFIP para dar finalmente C*. El hecho de que se necesiten varias moléculas de HFIP para que se produzca la transferencia protónica se podría relacionar con la estabilización por solvatación de la carga negativa del anión alcoholato que resulta de la reacción de transferencia protónica. Como es bien conocido, la estabilización del ión saliente juega un papel fundamental en las reacciones ESPT en medios acuosos (*Huppert y col.,1982*; *Suwaiyan y col., 1990; Tolbert y Haubrich, 1994; Htun y col., 1995)*.

Aunque los exciplejos CL* ya habían sido detectados por nuestro grupo de investigación en el sistema MHN-HFIP *(Balón y col.,1998; Carmona y col., 2000, 2001, 2002)* y por *Reyman y col. (1994, 1997)* en el sistema BC-ácido acético, su naturaleza resultaba bastante enigmática. Así pues, para tratar de clarificar esta cuestión, hemos llevado a cabo un estudio espectral de los derivados N,N-dimetilados de la BC, el BCSA y la DMBC, en medios fuertemente ácidos. Estos compuestos, al tener bloqueados ambos átomos de nitrógeno, pueden considerarse modelos arquetípicos de las especies catiónicas.

Los resultados de este estudio proporcionan claras evidencias experimentales sobre la existencia, tanto en el estado fundamental como en el excitado, de un equilibrio isomérico entre dos especies catiónicas CN y CI. El catión isómero CI

sería el modelo del CL*, ya que ambas especies tienen emisiones y tiempos de vida completamente similares. Siguiendo el modelo propuesto para la BCA, parece razonable suponer que las estructuras de estos cationes están relacionadas con las de sus isómeros Q y Z. Según ésto, en el catión CN la carga positiva estaría localizada preferentemente sobre el átomo de nitrógeno piridínico y en CI, de estructura quinonoide, sobre el pirrólico.

Por otra parte, como el CI es el precursor de los tricationes, TC, del BCSA, el anillo de betacarbolina del CI debe tener una estructura intermedia entre la de un monocatión plano completamente aromático y la de un dicatión quinonoide parcialmente aromático. De acuerdo con nuestra hipótesis, tanto el CI como el exciplejo CL* tienen estructuras quinonoides parcialmente aromáticas con sus átomos de nitrógeno piridínicos piramidalizados y estabilizados por puente de hidrógeno.

Todos los resultados hasta aquí mencionados, nos han proporcionado la base para interpretar, finalmente, el comportamiento del sistema BC-HFIP. Dado que la BC puede interaccionar con dadores y aceptores de puente de hidrógeno a través de sus átomos de nitrógeno piridínico y pirrólico, respectivamente, parece lógico pensar que, a priori, su comportamiento debe ser mucho más complejo que el de sus derivados metilados. De todas formas, también cabe esperar ciertas analogías entre el comportamiento de la BC y el de sus derivados metilados. De hecho, a altas concentraciones de HFIP, los sistemas BC-HFIP y BCA-HFIP se comportan en ciclohexano de forma totalmente análoga. Por el contrario, el comportamiento del sistema BC-HFIP en tolueno es una mezcla del de la BCA y la MBC. Así pues, nuestros resultados experimentales indican que, aunque por caminos diferentes, la BC y sus derivados monometilados forman complejos con HFIP de estructuras muy parecidas.

De esta forma, mediante el análisis de las interacciones por puente de hidrógeno entre la BC y el HFIP, se llega a la conclusión de que, al ir aumentando la concentración de HFIP, se forma un complejo doble, DHB, en el que los átomos de

nitrógeno pirrólico y piridínico de la BC están enlazados simultáneamente por puente de hidrógeno a moléculas de HFIP. La redistribución de carga dentro de este complejo, modulada por el proceso ICT desde el átomo de nitrógeno pirrólico al piridínico, permite que se establezca el equilibrio de isomerización quinonoide-zwiteriónico del anillo de betacarbolina. De acuerdo con ésto, el complejo DHB tendría una estructura quinonoide en ciclohexano y una estructura "normal", con una distribución de densidades de carga de tipo zwiteriónica, en tolueno. Como los de la BCA, los isómeros del complejo DHB dan doble fluorescencia, emitiendo a cortas longitudes de onda desde sus estados LE y a largas longitudes de onda desde sus estados CT. Además, en su estado excitado LE, el isómero DHB "normal" puede reaccionar como el PTC* de la MBC para dar especies catiónicas o precatiónicas.

Finalmente, resumiremos los resultados de nuestro estudio sobre las interacciones por puente de hidrógeno de la BC y sus derivados metilados con HFIP enumerando las ***principales conclusiones***:

1.- La BCA presenta, en su estado fundamental, un equilibrio isomérico entre dos especies de estructuras quinonoide y zwiteriónica, cuya posición depende de la polaridad del medio. Cuando se excitan por acción de la luz, cada isómero emite simultáneamente desde un estado localmente excitado, LE, y otro de transferencia de carga, CT.

2.- Las interacciones de los monometil derivados de la BC, BCA y MBC, con HFIP en ciclohexano y tolueno dan lugar a diferentes tipos de aductos y exciplejos en los que el grupo OH del alcohol está enlazado por puente de hidrógeno con sus respectivos átomos de nitrógeno pirrólico, BCA, o piridínico, MBC. En los puentes de hidrógeno de estos complejos se establece el equilibrio tautomérico entre sus formas puramente covalentes, HBC, OH···N, y sus formas de par iónico o de transferencia protónica, PTC,

$O^{-}\cdots H^{+}N$. La separación de carga en los PTC está asistida por una nueva molécula de alcohol.

3.- Los complejos HBC y PTC de los isómeros de la BCA producen diferentes efectos sobre los espectros de la BCA y siguen comportamientos fotofísicos diferentes. El HBC del isómero quinonoide desplaza al rojo el espectro de absorción de la BCA, mientras que el del isómero zwiteriónico lo desplaza al azul. El PTC del isómero quinonoide amortigua la fluorescencia del estado LE e intensifica la del CT, y el del isómero zwiteriónico amortigua y ensancha la emisión LE y disminuye la intensidad de la banda CT.

4.- Los complejos HBC y PTC de la MBC desplazan batocrómicamente los espectros de absorción y de emisión. En el estado excitado, la interacción del PTC con nuevas moléculas de HFIP da un nuevo exciplejo, CL*, precursor del catión, C*.

5.- En disoluciones acuosas concentradas de ácido sulfúrico, se establece un equilibrio isomérico, tanto en el estado fundamental como en el excitado, entre los monocationes de las dimetilbetacarbolinas con forma plana completamente aromática, CN, y quinonoide parcialmente aromática, CI. Los CI, precursores en el estado fundamental de los tricationes del BCSA, dan una emisión de fluorescencia similar a la de los CL*.

6.- Los CI y los CL* tienen una estructura quinonoide parcialmente aromática en la que el átomo de nitrógeno piridínico rehibridado se estabiliza formando un puente de hidrógeno con una molécula de HFIP.

7.- La BC, al poder interaccionar a través de sus centros pirrólico y piridínico, forma complejos dobles, DHB, en los que los átomos de nitrógeno

pirrólico y piridínico del anillo de betacarbolina están enlazados simultáneamente por puente de hidrógeno a moléculas de HFIP. En el estado fundamental de estos complejos se establece un equilibrio isomérico entre sus estructuras quinonoides y zwiteriónicas, cuya posición depende de la polaridad del medio.

8.- Los isómeros de los DHB de la BC emiten simultáneamente desde dos estados diferentes: uno localmente excitado, LE, y otro de transferencia de carga, CT. La débil fluorescencia de la betacarbolina por encima de los 500 nm, atribuida clásicamente a la emisión de los supuestos fototautómeros zwiteriónicos de la BC es, en realidad, la banda que resulta del solapamiento de los componentes CT de las dobles emisiones de los isómeros quinonoide y zwiteriónico de los DHB de la BC.

6.- REFERENCIAS.

Abramovitch R.A., I.D. Spencer, Adv. Heterocycl. Chem., 3(1964)79.

Adler T.K., Anal. Chem., 34(1962)685.

Agmon. N, J. Phys. Chem. A, 109(2005)13.

Airaksie M.M., I. Kari,Med. Biol., 59(1981)21.

Allen J.R.F., B.R. Holmsted, J. Phytochem., 19(1980)1573.

Alvarez M., M. Salas, Heterocycles, 32(1991)1391.

Angulo G, C. Carmona, R.R. Pappalardo, M.A. Muñoz, P. Guardado, E. Sánchez Marcos, M. Balón, J. Org. Chem., 62(1997)5104.

Armit J.W., R. Robinson, J. Chem. Soc., 127(1925)1604.

Arnaut L.G., S.J. Formosinho, J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry, 75(1993)1.

Bagno A, G. Scorrano, R.A. More O´Ferral, Rev. Chem. Intermed., 7(1987)313.

Balón M., M.A. Muñoz, J. Hidalgo, C. Carmona, M. Sánchez, J. Photochem., 36(1987)193.

Balón M., J. Hidalgo, P. Guardado, M.A. Muñoz, C. Carmona, J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2, (1993)99.

Balón M., M.A. Muñoz , P. Guardado, J. Hidalgo, C. Carmona, Trends in Photochemistry and Photobiology, 3(1994)117.

Balón M., C. Carmona, P. Guardado, M.A. Muñoz, Photochem. Photobiol., 67(1998)414.

Balón M., M. A. Muñoz, C. Carmona, P. Guardado, M. Galán, Biophys. Chem., 80(1999)41.

Balón M., G. Angulo, C. Carmona, M.A. Muñoz, P. Guardado, M. Galán, Chem. Phys., 276(2002)155.

Balon M., M.A. Muñoz, C. Carmona, Chem.Phys., 299(2004a)67.

Balón M., M.A. Muñoz, C. Carmona, Chem Phys., 302(2004b)13.

Barker S.A., R.E.W. Harrison, J.A. Monti, G.B. Brown, S.T. Christian, Biochem. Pharmacol., 30(1981)9.

Barrow G. M., J. Am. Chem. Soc., 78(1956)5802.

Beck O., A. Lundman, Biochem Pharmacol., 32(1983)1507.

Beljanski M., M.S. Beljanski, Exp. Cell. Biol., 50(1982)79.

Bloom F, J. Barches, M Sandler, E. Usdin Eds., Betacarbolines and Tetrahydroisoquinolines, Alan R. Liss, New York, 1982.

Burns V.W., Biophys J., 14(1974)189.

Cai Z., J. Reimers, J. Phys. Chem. A, 106 (2002) 8769.

Carmona, C., M. Balón, J. Hidalgo, M.A. Muñoz, M. López Poveda, Can.

J. Chem., 67(1989)720.

Carmona, C., M. Galán, G. Angulo, M.A. Muñoz, P. Guardado, M. Balón, Phys. Chem. Chem. Phys., 2 (2000) 5076.

Carmona, C., M. Balón, M. Galán, G. Angulo, P. Guardado, M.A. Muñoz, J. Phys. Chem. A, 105(2001)10334.

Carmona, C., M. Balón, M. Galán, P. Guardado, M.A. Muñoz, Photochem. Photobiol., 76 (2002) 239.

Catalán J., J. Am. Chem. Soc., 123(2001)11940.

Chachisvilis M., A. Zewail, J. Phys. Chem. A, 103 (1999)7408.

Chou P.T., Y.I. Liu, G.R. Wu, M.Y. Shiao, W.S. Yu, J. Phys. Chem. B, 105 (2001) 10674.

Demas J.N., Excited State Lifetime Measurements, Academic Press, New York, 1983.

Denckla W.D., H.K. Dewey, J. Lab. Clin. Med., 69(1967)160.

Dias A., A.P. Varela, M.G. Miguel, A.L. Maçanita, R.S. Becker, J. Phys. Chem., 96 (1992)10290.

Dias A., A.P. Varela, M.G. Miguel, R.S. Becker, H.D. Burrows, A.L. Maçanita, J. Phys. Chem., 100 (1996) 17970.

Ding C.G., K. Laasonen, Chem. Phys. Letters, 390(2004)307.

Doig G.G, J.D. Loudon, P. McCloskey, J. Chem. Soc., (1952)3912.

Draxler S., M.E. Lippitsch , J. Phys. Chem., 97(1993)11493.

Draxler S., M.E. Lippitsch, J. Phys. Chem., 99(1995)2241.

Duportail G., H. Lami, Biochim. Biophys. Acta, 402(1975)20.

Duportail G., Int. J. Biol. Macromol., 2(1981)188.

Fenerty C.A., E. Lindup, Biochem. Soc. Trans., 13(1985)907.

Formosinho S.J., L.G. Arnaut, J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry, 75(1993)21.

Friedrich, D.M., Z. Wang, A.G. Joly, K.A. Peterson, P.R.J. Callis, J. Phys. Chem., 1999, 103, 9644-9653.

Ghiggino K.P., P.F. Skilton, P.J. Thistlethwaite, J. Photochem., 31(1985)113.

Grabowski Z.R,, K. Rotkiewicz, W. Rettig, Chem. Rev., 103(2003)3899.

Grabowski Z.R., W. Rubaszewska, J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1, 73(1977)11.

Guardado P., M. Balón, C. Carmona, M.A. Muñoz, C. Domene, J. Pharm. Sci., 86(1997)106.

Hasenfratz V., Ann. Chim., 10(1927)150.

Herraiz T., C. Chaparro, Biochem. Biophys. Res. Commun., 326(2005)378.

Hidalgo J., C. Carmona, M.A. Muñoz, M. Balón, J. Chim. Phys., 87(1990)555.

Htun T., A. Suwaiyan, U.K. Klein, Chem. Phys. Lett., 243(1995)71, 506, 512.

Huppert D., S. D. Rand, P. M. Rentzepis, P. F. Barbara, W. S. Struve, Z. R. Grabowski, J. Photochem., 18(1982)89.

Jeffrey G.A., W Saenger, Hydrogen Bonding in Biological Structures, Springer-Verlag, Berlín, 1991.

Lakowicz J.R., Topics in Fluorescence Spectroscopy, vol. 2, cap.5, Plenum Press, New York, 1991.

Lakowicz J.R., Principles of Fluorescence Spectroscopy, 2nd Edition, Kluwer Academic/Plenum Press, New York, 1999.

Larson. R.A., K.A. Marley, R.W. Tuvenson, M.R. Barenbaum, Photochem. Photobiol., 48(1988)665.

Lazaridis M., Chem. Phys. Lett., 296(1998)477.

Lippert E., W. Luder, F. Moll, W. Nägele,H. Boss, H. Prigge, I. Seybold-Blankenstein, Angew. Chem., 73(1961)695.

Lippert E., W. Luder, H. Boss, Advances in Molecular Spectroscopy, A. Mangini Ed., Pergamon Press, Oxford, 1962.

Mahmood A., F. Alvarado, Biochim. Biophys. Acta, 483(1977)367.

Manske R.H.F., W.H. Perkin, R. Robinson, J. Chem. Soc., (1927)14.

Marcus Y., Chem, Soc. Rev., (1993)409.

Marziano N.C., A. Tomasin, P.Traverso, J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2, (1981)1070.

Mataga N., T. Kubota, Molecular Interactions and Electronic Spectra, Marcel Dekker, New York, 1970.

Mosini A., Studt. Hist. Phil. Mod. Phys., 4(2000)569.

Muñoz M.A., M. Balón, J. Hidalgo, C. Carmona, M. López Poveda, Heterocycles, 27(1988)2067.

Muñoz M.A., J. Hidalgo, C. Carmona, M. Balón, M. López Poveda, Heterocycles. 29(1989)1343.

O'Connor, D.V. y D. Phillips,"Time-correlated Single Photon Counting", Academic Press Inc., London, 1984.

Pardo A., D. Reyman, J.M. Poyato, J.J. Camacho, J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry, 45(1988)207.

Pardo, A., D. Reyman, J.M.L. Poyato, F. Medina, J. Luminesc., 51(1992),269.

Perrin D.D y W.L. Amarego, "Purification of Laboratory Chemicals". London, Pergamon Press, 1988.

Queralto A. J. Hidalgo, M. Sánchez, Il Farmaco Ed. Pr., 41(1986)338.

Raczynska E. D., W. Kosinska, B. Osmialowski, R. Gawinecki, Chem. Rev. 105(2005)3561.

Reyman D., M.H. Viñas, Chem. Phys. Letters, 301(1999a)551.

Reyman D., M.H. Viñas, J.J. Camacho, J. Photochem, Photobiol. A: Chemistry, 120(1999b)85.

Reyman D., M.J. Tapia, C. Carcedo, M.H. Viñas, Biophys. Chem., 104(2002)683.

Reyman D., A. Pardo, J.M.L. Poyato, J. Phys. Chem., 98(1994)10408.

Reyman D., M.H. Viñas, J.M.L. Poyato, A. Pardo, J. Phys. Chem. A, 101(1997)768.

Rochester C.H., "Acidity Functions", Academic Press, New York, 1970.

Rommelspacher H., H. Honecker, M. Babey, B. Meinke, Naunyn-Schmieeberg´s Arch. Pharmacol., 310(1979)35.

Szafran M., J. Mol. Struct., 381(1996)39.

Sakuros R., K.P. Ghiggino, J. Photochem., 18(1982)1.

Schulman S.G., "Modern Fluorescence Spectroscopy", Ed. E. L. Wehry , Heyden, London, vol. 2, ch. 6,1976.

Seixas de Melo J., A. M. Maçanita, Chem. Phys. Letters, 204(1993)556.

Shoemaker D.W., J.T. Cummins, T.G. Bidder, Neurosci., 3(1978)233.

Suwaiyan A., F. Al-Adel, A. Hamdan, Uwe K.A. Klein, J. Phys. Chem., 94 (1990) 7423

Tapia, M.J., D. Reyman, M.H. Viñas, C. Carcedo and J.J. Camacho, Phys. Chem. Chem. Phys., 4(2002)3676.

Tolbert L.M., J.E. Haubrich, J. Am. Chem. Soc., 116(1994)10593.

Tomas F., I. Zabala, A. Olba, J. Photochem., 23(1983)355.

Udenfriend S., D.E. Duggan, B.M. Vasta, B.B. Brodie, J. Pharmacol. Exptl. Therapeutics, 120(1957)26.

Valera A.P., A. Dias, M.G. Miguel, R.S. Becker, A.L. Maçanita, J. Phys. Chem., 99(1995)2329.

Valeur B., Molecular Fluorescence, Wiley-VCH, Weinheim, 2002.

Vander Donckt E., Bull. Soc. Chim. Belg., 78(1969)69.

Vander Donckt E., Progr. React. Kinet., 5(1970)273.

Varela A.P, A. Dias, M.G. Miguel, R.S. Becker, A.L. Maçanita, J. Phys. Chem., 99 (1995)2239.

Varela, A.P., A. Dias, M.G. Miguel, R.S. Becker, A.L. Maçanita, J. Phys. Chem., 99(1995)2239.

Waluk J. Ed., Conformational analysis of molecules in excited

states,Wiley-VCH, New York, 2000.

Wolfbeis O.S., E. Fürlinger, Zeitschtift. Phys. Chem. Neue Folge BD., 129(1982)171.