

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS



***FOTOFÍSICA DE COMPUESTOS DE COORDINACIÓN E
INTERACCIÓN CON PROTEÍNAS PEQUEÑAS***

HÉCTOR HERNANDO MARTÍNEZ SAAVEDRA

2015

El presente trabajo de tesis se realizó en el Instituto de Investigaciones Físicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA) bajo la dirección del Dr. Ezequiel WOLCAN. Se presenta a consideración de las autoridades de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata a fin de acceder al grado académico de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas.

A mis padres Héctor y Stella

A mi hermanita Lili

A Pau

AGRADECIMIENTOS

Ha sido un número importante de personas e instituciones las que han contribuido a la realización de este trabajo de tesis, las que me ayudaron en este proceso de crecimiento profesional y personal y las que, desde sí mismas, hicieron de este tiempo en la Argentina una estancia llena de experiencias enriquecedoras.

Gracias al CONICET y a la UNLP por brindarme las herramientas para hacer un nuevo sueño realidad.

A mi director Ezequiel Wolcan quiero agradecerle infinitamente su paciencia, su total desapego por el conocimiento y la facilidad con que logra hacerlo asimilar, a su dedicación, orden y motivación en momentos difíciles y su excelente liderazgo y espíritu de guía en el camino de la ciencia. Gracias “Zeque”.

Aunque no en el papel, Gustavo “El Chino” Ruíz también estuvo ahí, “al lado del cañón”, compartiendo ideas, impartiendo disciplina, brindando un acompañamiento digno de un gran investigador y alentándome cuando perdía la confianza en mí mismo. “Aguante Lobito”.

Pedro David Gara (y al CIOp), Sebastián García y Franco Cabrerizo (y al INTECH), gracias por su enorme colaboración y apoyo tanto en la parte experimental como humana, definitivamente este país tiene mucha gente valiosa, gente buena, ustedes también son un gran ejemplo de eso.

A mis compañeros de grupo de investigación Alejandra e Iván por saber trabajar en equipo y principalmente a mi - no solo compañero de trabajo – sino gran amigo Fabricio Ragone, quien desde mi primer día aquí y hasta hoy me ha tendido la mano y ha estado en las buenas y en las malas.

A toda la gente del INIFTA, en especial a las personas del primer piso empezando por los integrantes del “Club del Café”, Mario Feliz, Carlos Cobos, Adela Croce, Seba, Eugenia, Paula, Larisa, Mik, Javi, que aparte de su colaboración técnica en determinados momento, hicieron posible pasar ratos muy agradables en medio de este lindo trabajo. También a Mónica González y

Daniel Mártire y todos sus chicos y chicas del LEAR, María Laura, Luciano Carlos, Valeria, Gaby, Cristian, Donald por toda su colaboración con reactivos, libros, turnos en los equipos etc. Y lo mismo con el grupo de Sebastián García, Mariana Constante, Bruno, Andrés, Eliana, Francisca; y de Andrés Thomas y Carolina Lorente, Laura Dántola, Paula Caregnato, Yanina, Paula Denofrio Mariana Paula, Adriana, Sandra, Mariana Vignone... Gracias.

También al grupo de Marita y el Turco, Nelson, Fernando, Mauro, Fernanda, Esther, Ethel que se mostraron muy colaboradores en momentos donde la orgánica se complicaba aún más.

Y de otros pisos y dependencias, gracias a mi buena amiga Laura Kovalevsky, Jhuly (compatriota), Matías Rafti, a toda la gente de secretaría, de los talleres, de contabilidad por su colaboración en cualquier momento que los necesitara.

A Gerardo Argüello y a Pablo facundo García del INFIQC, Universidad de Córdoba por su colaboración y todo lo que pude aprender con ellos en la pasantía realizada en esa Universidad.

A todos mis jefes y compañeros de la cátedra de Inorgánica I por hacerme sentir como uno más de ese grupo tan especial. A Patricia, Mauricio, Carlitos Franca (y sus costillares al asador), Luciana, Coqui, Andrés, Vicky, Yanina, Lucas M., Lucas R.P., Facundo Bigne, Facundo Massolo, Sole, Lau, Juliana Parente y los recién llegados Corel y Khalil. Gracias por el ánimo y el apoyo.

A todos mis amigos que, a pesar de la distancia, nunca dejaron de alentarme, apoyarme y seguirme alegrando la vida. Pacho, Ana María, Francesca, Magda Ivonne, Juliana, Fercho, Chakip, Juangui. Y los que estuvieron cerca, Leidy Viviana, Juan k, Diana Carolina, Miguel, Andrea, Daff, fede.

Los agradecimientos más especiales a mis padres, mi hermana y todos mis familiares en Colombia y a la mujer que me acompañó durante toda esta linda e intensa etapa de mi vida, que me sigue acompañando y brindando su amor y con quien espero poder compartir mi ser por el tiempo que la vida me permita, a ti Pau.

CONTENIDO

1	Introducción	21
2	Objetivos y Estructura del Trabajo	23
3	Antecedentes Generales	24
3.1	Complejos organometálicos de renio	28
3.2	Procesos fotofísicos y fotoquímicos en complejos de metales de transición 3d	
3.2.1	Descripción de los orbitales moleculares	31
3.2.2	Aspectos Fotofísicos	34
3.2.2.1	<i>Decaimiento radiativo</i>	37
3.2.2.2	<i>Efectos del solvente</i>	38
3.2.2.3	<i>Emisión $^3(\pi^* \rightarrow \pi)$</i>	38
3.2.2.4	<i>Fotosensibilización y Quenching bimolecular</i>	39
3.2.2.4.1	Producción de oxígeno singlete	42
3.3	Monitoreo de los procesos del estado excitado	45
3.3.1	Luminiscencia y espectrofluorimetría	45
3.3.1.1	<i>Emisión en estado estacionario: espectros de emisión, y rendimientos cuánticos de emisión</i>	45
3.3.1.2	<i>Emisión resuelta en el tiempo</i>	50
3.3.2	Métodos Fototérmicos	53
3.3.2.1	<i>Espectroscopía fotoacústica resuelta en el tiempo</i>	57
3.3.2.1.1	Descripción de la generación de la señal fotoacústica	57
3.3.2.1.2	Separación del calor liberado y del cambio de volumen estructural	60
3.3.2.1.3	Cálculos calorimétricos	61
3.3.2.1.4	Detalles Instrumentales	61
4	CAPÍTULO I. Síntesis y Caracterización Espectroscópica y Computacional del Nuevo Complejo $Bu_4N[(bpy)Re(CO)_3(dcbpy)]$	63

4.1	Resumen	63
4.2	Introducción	64
4.3	Materiales y métodos	66
4.4	Síntesis	67
4.5	Análisis ESI-MS	69
4.6	Estudios de protonación y análisis espectroscópicos	70
4.7	Detalles Computacionales	72
4.8	Resultados y discusión	73
4.8.1	Caracterización espectroscópica	73
4.8.2	Espectroscopía UV-Vis	75
4.8.3	Cálculos DFT y TD-DFT	78
4.8.3.1	<i>Caracterización Estructural</i>	78
4.8.3.2	<i>Espectroscopía IR y UV-vis</i>	80
4.9	Conclusiones Parciales	86
5	<i>CAPÍTULO II. Estudio de las Propiedades Fotofísicas del Complejo [ClRe(CO)₃(BCS)]²⁻ Por Técnicas Optoacústicas y de Luminiscencia Estacionaria y Resuelta en el Tiempo</i>	87
5.1	Resumen	87
5.2	Introducción	89
5.3	Parte experimental	91
5.3.1	Materiales	91
5.3.2	Medidas fotofísicas	91
5.3.3	Estudios de protonación y análisis espectroscópicos	93
5.3.4	Métodos computacionales	93
5.4	Resultados y discusión	95
5.4.1	Origen de la espectroscopía de absorción de los complejos tipo <i>fac</i> - XRe(CO) ₃ L	95

5.4.2	Espectroscopía de absorción de $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$	96
5.4.3	Cálculos TD-DFT	99
5.4.4	Luminiscencia estacionaria y resuelta en el tiempo	106
5.4.5	Procesos Fotofísicos del Complejo de Re(I)	112
5.4.6	Generación de Oxígeno Singlete y Experimentos LIOAS	115
5.5	Conclusiones Parciales	121
6	<i>CAPÍTULO III. Generación Fotosensibilizada de Oxígeno Singlete a Partir de Complejos de Re(I): Un Estudio Fotofísico Usando LIOAS y Técnicas Luminiscentes</i>	123
6.1	Resumen	123
6.2	Introducción	125
6.3	Materiales	127
6.4	Sección experimental	128
6.4.1	Medidas fotofísicas	128
6.5	Resultados y discusión	129
6.5.1	Experimentos LIOAS	129
6.5.2	Generación de Oxígeno Singlete	131
6.6	Conclusiones Parciales	137
7	<i>CAPÍTULO IV. Caracterización del proceso de asociación entre complejos tricarbonílicos de Renio(I) y proteínas de transporte</i>	138
7.1	Introducción	138
7.2	Materiales	141
7.3	Medidas espectroscópicas	142
7.4	Estudios de asociación	143
7.4.1	Modelo de asociación	143
7.4.1.1	<i>Transferencia de energía</i>	144
7.4.2	Estudios de dicroísmo circular	145

7.5	Resultados y discusión	146
7.5.1	Asociación entre complejos polipiridínicos de Re(I) y proteínas de transporte	146
7.5.2	Parámetros termodinámicos y naturaleza de las fuerzas de interacción	153
7.5.3	Transferencia de energía Albúmina-complejo	157
7.5.3.1	<i>Análisis por FRET</i>	157
7.5.4	Cambios en la estructura secundaria de la proteína inducida por la presencia de $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$ y $[\text{Bu}_4\text{N}[(\text{bpy})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dcbpy})]]$	160
7.6	Conclusiones parciales	162
8	<i>Conclusiones Generales</i>	163
9	<i>Bibliografía</i>	165

LISTA DE ESQUEMAS

- Esquema 3.1.** Ejemplos de alguno de los complejos de Re(I) sintetizados anteriormente por integrantes del laboratorio de fotoquímica inorgánica 25
- Esquema 3.2.** Descripción cualitativa de los orbitales moleculares del $\text{Ru}(2,2'\text{bpy})_3^{2+}$ y los tipos de transiciones electrónicas posibles: () TCML, () TCLM, () IL, () CM y () TCS 31
- Esquema 3.3.** Diagrama de Jablonski que representa los procesos de desactivación de los estados excitados del complejo $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$. () caminos radiativos () caminos no radiativos. 34
- Esquema 3.5.** Configuraciones posibles de los orbitales $2p$ del átomo de oxígeno. Debajo de cada configuración está el símbolo correspondiente. 43
- Esquema 3.6.** Diagrama de energía para el O_2 en sus diferentes estados electrónicos. 44
- Esquema 3.7.** Sistema óptico del espectrofluorómetro utilizado para los experimentos de emisión en estado estacionario 47
- Esquema 3.8.** Sistema óptico del equipo utilizado para los experimentos de emisión resuelta en el tiempo 51
- Esquema 3.9.** Propiedades principales de los efectos fototérmicos y los correspondientes parámetros monitoreados por métodos fototérmicos. Los símbolos usados se representan como: T , temperatura; V , volumen; P , presión; H , entalpía; S , entropía; ρ , densidad; n , índice de refracción; c , concentración molar; A , absorbancia. 54
- Esquema 3.10.** Comparación de la generación de la señal fotoacústica a partir de las geometrías en ángulo recto (Izquierda) y cara frontal (derecha). En la geometría de ángulo recto, el camino del haz (en verde) está conformado por una ranura para obtener un frente de onda acústica plano. 57
- Esquema 3.11.** Los cambios entálpicos (calor, Q) se convierten a cambios en la temperatura a través de la capacidad calórica ($VC_p\rho$), y a cambios de

volumen en la solución a través del coeficiente de expansión isobárica (β). ξ representa todos los reordenamientos moleculares, atómicos y electrónicos del soluto y de las moléculas de solvente que conducen a un cambio de volumen estructural. Los cambios de presión provenientes de las variaciones volumétricas son mediados por la compresibilidad isotérmica (K_T). 58

Esquema 3.12. Descripción del equipo usado para medidas de LIOAS y, con mínimas variaciones, para determinación de producción de $^1\text{O}_2$. 62

Esquema 6.1. Formulas estructurales y Abreviaciones usadas para los complejos de Re(I) estudiados 127

Esquema 6.2. Formulas estructurales y Abreviaciones usadas para los complejos de comparación con los complejos de Re(I) estudiados 132

LISTA DE FIGURAS

- Figura 3.1.** Estructuras de los complejos $\text{Re(L)(CO)}_3(\alpha\text{-diimine})^{0/+}$. (Los complejos de Re son neutros o catiónicos si el ligando axial L es aniónico o neutro respectivamente). 26
- Figura 3.2.** Ejemplo de los datos obtenidos para las medidas de fluorescencia resuelta en el tiempo con *Data Station* (figura izquierda) y procesados con *DAS6* (Figura derecha) 53
- Figura 4.1.** Espectro de masas ESI modo ion positivo del complejo $\text{Bu}_4\text{N}[(\text{bpy})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dcbpy})]$ en MeOH. 74
- Figura 4.2.** Cambios espectrales UV-vis experimentados por el complejo $\text{Bu}_4\text{N}[(\text{bpy})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dcbpy})]$ en estudios de protonación. a. Cambios espectrales en el rango de pH 4-7. b. Cambios espectrales en el rango de pH 3,8-1. Ver texto para más detalles 76
- Figura 4.3.** Perfiles espectrales y funciones de distribución obtenidos de los análisis quemométricos de las figuras **a** y **b** para las especies dependientes del pH del complejo de Re(I): $(\text{ReL})^-$ (▼), $(\text{ReL})\text{H}$ (▲), $(\text{ReL})\text{H}_2^+$ (●) y $(\text{ReL})\text{H}_3^{2+}$ (■). 77
- Figura 4.4.** Estructura molecular de $[(\text{bpy})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dcbpy})]$ obtenida por cálculos DFT etiquetado con algunos de los átomos más relevantes que aparecen en la **Tabla 4.2**. 78
- Figura 4.5.** Diagramas de orbitales moleculares para el complejo $(\text{ReL})^-$. H-6 y LUMO son los orbitales moleculares que más contribuyen al espectro electrónico en la transición de menor energía ($\lambda_{\text{max}} = 361 \text{ nm}$), mientras que los orbitales L+1, H-9, H-10 y H-12 son los orbitales moleculares que más contribuyen al espectro electrónico en el rango de los 220 - 350 nm. 83
- Figura 4.6.** Diagrama de orbitales moleculares para el complejo $(\text{ReL})\text{H}_3^{2+}$. HOMO y L+1 son los orbitales moleculares que más contribuyen al espectro electrónico en la transición de menor energía ($\lambda_{\text{max}} = 371 \text{ nm}$), mientras

que los orbitales LUMO, L+2, H-3 y H-7 son los orbitales moleculares que más contribuyen al espectro electrónico en el rango de los 220-350 nm.⁸³

Figura 4.7. Comparación de los perfiles espectrales para las cuatro especies obtenidos de los análisis quemométricos de los cambios espectrales UV-vis de las figures **a** y **b** (líneas negras) con las transiciones electrónicas calculadas por TD-DFT (líneas azules) y los espectros simulados (líneas rojas) para $(\text{ReL})^-$, $(\text{ReL})\text{H}$, $(\text{ReL})\text{H}_2^+$ y $(\text{ReL})\text{H}_3^{2+}$. 84

Figura 5.1. a. Espectros de absorción UV-vis dependientes del pH para $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$ en soluciones buffer $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ a temperatura ambiente. **b.** Espectros de absorción UV-vis de $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$ en soluciones de agua, acetonitrilo, metanol y etanol. 98

Figura 5.2. Diagrama de orbitales moleculares para $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}/\text{PCM}/\text{MeOH}$ (isovalor = 0.02). $\text{H}-1 \rightarrow \text{L}$, $\text{H}-1 \rightarrow \text{L}+1$ y $\text{H} \rightarrow \text{L}+1$ son las principales transiciones involucradas en las bandas de baja energía del complejo en MeOH. 101

Figura 5.3. Diagrama de orbitales moleculares para $[(\text{H}_2\text{O})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^-/\text{PCM}/\text{H}_2\text{O}$ (isovalor = 0.02). $\text{H} \rightarrow \text{L}$ y $\text{H} \rightarrow \text{L}+1$ son las principales transiciones involucradas en la banda de absorción de baja energía del complejo en solución acuosa. 102

Figura 5.4. Gráficos de la densidad total de los estados (TDOS) y densidad parcial de los estados para: **a.** $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}/\text{PCM}/\text{MeOH}$ y **b.** $[(\text{H}_2\text{O})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^-/\text{PCM}/\text{H}_2\text{O}$ generados a partir de las contribuciones de seis fragmentos: (i) átomo de Re, (ii) los tres carbonilos, (iii) el átomo de Cl o molécula de H_2O , (iv) $(\text{CH}_3)_2$ -fenantrolina, (v) los dos grupos fenilo y (vi) los dos sulfonatos. Las flechas marcan la posición en energía de los diferentes MO's. Las geometrías optimizadas y los cálculos TD-DFT fueron llevados a cabo incluyendo los efectos del solvente a través del Modelo Continuo Polarizable (PCM). 103

Figura 5.5. Comparación de los espectros de absorción UV-vis (línea negra) con las transiciones electrónicas calculadas por TD-DFT (líneas azules) y los espectros simulados (línea roja) para **a.** $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}/\text{PCM}/\text{MeOH}$ y **b.** $[(\text{H}_2\text{O})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^-/\text{PCM}/\text{H}_2\text{O}$ 106

- Figura 5.6.** Dependencia del solvente y la longitud de onda de excitación de los espectros de emisión de $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$. Las soluciones fueron deaireadas burbujeando N_2 . 107
- Figura 5.7.** Espectros de emisión dependientes del pH para soluciones equilibradas en aire de: **a.** Complejo de Re(I) y **b.** BCS. Cada recuadro muestra la dependencia del pH de los correspondientes rendimientos cuánticos de emisión. 109
- Figura 5.8. a.** Espectros de luminiscencia de las dos especies emisivas con sus correspondientes funciones de distribución (ligando BCS y BCS protonado). **b.** Perfiles espectrales de las tres especies emisivas con las correspondientes funciones de distribución ($[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$, $[(\text{OH})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$ y $[(\text{H}_2\text{O})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^-$). 111
- Figura 5.9.** Amplitud de la señal fotoacústica como función de la fluencia del láser para (i) solución acuosa buffer a pH = 7,0: New coccine (RC, ●), complejo de Re(I) (▼) y (ii) soluciones en CH_3CN : 2- Hidroxibenzofenona (CR, ○), complejo de Re(I) (N_2 , ■; O_2 , ◆). Recuadro: señal fotoacústica normalizada de solución buffer a pH = 7 para la RC (New Coccine, línea punteada) y para el complejo de Re(I) (línea sólida) con absorbancias cercanas a 0,105 ($\pm 0,001$). 120
- Figura 6.1.** Señal acústica para una muestra (Línea roja) sin corrimiento en la fase con respecto al compuesto referencia (Línea negra). 129
- Figura 6.2.** Amplitud de las señales fotoacústicas como función de la fluencia del laser para soluciones en acetonitrilo de Re-pz (N_2 , ●; O_2 , ●) y 2-HBP (aire, ●). Las soluciones de Re-pz y 2-HBP se igualaron dentro de un 2% de absorbancia a 355 nm. **Recuadro:** amplitud de las señales fotoacústicas normalizadas con la fluencia como función de la energía absorbida para soluciones en acetonitrilo de Re-pz (N_2 , ●) y 2-HBP (aire, ●). 130
- Figura 6.3.** Amplitud de las señales fotoacústicas como función de la fluencia del láser para soluciones en acetonitrilo de Re-pyr (N_2 , ●; O_2 , ●) y 2-HBP (aire, ●). Las soluciones de Re-pyr y 2-HBP se igualaron dentro de un 2% a la absorbancia a 355 nm. 130

- Figura 6.4.** Espectros de absorción de los complejos de Re(I) y ligandos asociados en CH_3CN ²²⁹ 135
- Figura 7.1. a.** Complejo de Re(I) $\text{Bu}_4\text{N}[(\text{bpy})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dcbpy})]$, **b.** Complejo de Re(I) $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$ 138
- Figura 7.2.** Estructura tridimensional de HSA. Se indican los tres dominios (I y II de color púrpura y III de color azul) que forman la molécula y algunos de los sitios de unión de ligandos.^{253,262} 140
- Figura 7.3. a.** Espectros de emisión de fluorescencia para BSA en ausencia y presencia de $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$. Las concentraciones de las especies fueron $c_{\text{proteína}} = 1,5 \times 10^{-6}$ M y $c_{[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}} = (0, 0.16, 0.33, 0.49, 0.82, 1.14, 1.52, 2.3, 3, 4.5, 6, 7.5) \times 10^{-6}$ M, (A-L) respectivamente; *buffer* fosfatos pH = 7,4; $T^\circ = 298$ K, $\lambda_{\text{exc.}} = 280$ nm, $\lambda_{\text{em.BSA}} = 344$ nm; las ranuras (*slits*) de excitación y emisión fueron 4 nm. **b.** Espectros de emisión de fluorescencia de HSA en ausencia y presencia de $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$; las condiciones experimentales fueron las mismas que en **a**; $\lambda_{\text{em.HSA}} = 337$ nm. **c.** Espectros de emisión de fluorescencia para BSA en ausencia y presencia de $[\text{Bu}_4\text{N}[(\text{bpy})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dcbpy})]]$. Las concentraciones de las especies fueron $c_{\text{proteína}} = 1,5 \times 10^{-6}$ M y $c_{[\text{Bu}_4\text{N}[(\text{bpy})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dcbpy})]]} = (0, 0.16, 0.33, 0.49, 0.82, 1.14, 1.52, 2.3, 3, 4.5, 6) \times 10^{-6}$ M, (A-K) respectivamente; *buffer* fosfatos pH = 7,4; $T^\circ = 298$ K, $\lambda_{\text{exc.}} = 280$ nm, $\lambda_{\text{em.BSA}} = 343$ nm; las ranuras (*slits*) de excitación y emisión fueron 4 nm. **d.** Espectros de emisión de fluorescencia de HSA en ausencia y presencia de $[\text{Bu}_4\text{N}[(\text{bpy})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dcbpy})]]$; las condiciones experimentales fueron las mismas que en **c**; $\lambda_{\text{em.HSA}} = 336$ nm. 148
- Figura 7.4.** Gráfico de intensidad de fluorescencia relativa de albúmina sérica (F/F_0) vs $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}/[\text{albúmina}]$. **a.** $\lambda_{\text{exc.}} = 280$ nm: BSA- $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$, (■) y HSA- $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$, (●); **b.** $\lambda_{\text{exc.}} = 295$ nm: BSA- $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$, (■) y HSA- $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$, (●); *buffer* fosfatos pH = 7,4. T = 298 K 149
- Figura 7.5.** Gráfico de intensidad de fluorescencia relativa de albúmina sérica (F/F_0) vs $[\text{Bu}_4\text{N}[(\text{bpy})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dcbpy})]]/[\text{albúmina}]$. **a.** $\lambda_{\text{exc.}} = 280$ nm: BSA- $[\text{Bu}_4\text{N}[(\text{bpy})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dcbpy})]]$, (■) y HSA- $[\text{Bu}_4\text{N}[(\text{bpy})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dcbpy})]]$, (●);

b. $\lambda_{exc.} = 295 \text{ nm}$: BSA-[Bu₄N[(bpy)Re(CO)₃(dcbpy)]], (■) y HSA-[Bu₄N[(bpy)Re(CO)₃(dcbpy)]], (●); *buffer* fosfatos pH = 7,4; T = 298 K 149

Figura 7.6. a. Gráfico de intensidad de fluorescencia relativa de BSA (F/F_0) vs $[ClRe(CO)_3(BCS)]^{2-}/[BSA]$; $\lambda_{exc.} = 280 \text{ nm}$, (■) y $\lambda_{exc.} = 295 \text{ nm}$, (●); *buffer* fosfatos pH = 7,4; T = 298 K. b. Gráfico de intensidad de fluorescencia relativa de BSA (F/F_0) vs $Bu_4N[(bpy)Re(CO)_3(dcbpy)]/[BSA]$; $\lambda_{exc.} = 280 \text{ nm}$, (■) y $\lambda_{exc.} = 295 \text{ nm}$, (●); *buffer* fosfatos pH = 7,4; T = 298 K 150

Figura 7.7. a. Gráfico de $1/\Delta F$ vs $1/[ClRe(CO)_3(BCS)]^{2-}$ para los sistemas BSA-[ClRe(CO)₃(BCS)]²⁻, (■) y HSA-[ClRe(CO)₃(BCS)]²⁻ (▲). Las concentraciones de los complejos variaron desde 0 a $6.04 \times 10^{-6} \text{ M}$; T = 298 K, *buffer* fosfatos pH = 7,4; $\lambda_{exc.} = 280 \text{ nm}$. b. Gráfico de $1/\Delta F$ vs $1/[Bu_4N[(bpy)Re(CO)_3(dcbpy)]]$ para los sistemas BSA[Bu₄N[(bpy)Re(CO)₃(dcbpy)]], (■) y HSA-[Bu₄N[(bpy)Re(CO)₃(dcbpy)]] (●). Las concentraciones de los complejos variaron desde 0 a $6.04 \times 10^{-6} \text{ M}$; T = 298 K, *buffer* fosfatos pH = 7,4; $\lambda_{exc.} = 280 \text{ nm}$. 151

Figura 7.8. a. Gráfico de $1/\Delta F$ vs $1/[ClRe(CO)_3(BCS)]^{2-}$ para el sistema BSA-[ClRe(CO)₃(BCS)]²⁻ a tres diferentes temperaturas. La concentración de $[ClRe(CO)_3(BCS)]^{2-}$ varió desde 0 hasta $6.04 \times 10^{-6} \text{ M}$; *buffer* fosfatos pH = 7,4; $\lambda_{exc.} = 280 \text{ nm}$. b. Gráfico de $1/\Delta F$ vs $1/[ClRe(CO)_3(BCS)]^{2-}$ para el sistema HSA-[ClRe(CO)₃(BCS)]²⁻ a diferentes temperaturas; las condiciones experimentales fueron las mismas que en a. 152

Figura 7.9. a. Gráfico de $1/\Delta F$ vs $1/[Bu_4N[(bpy)Re(CO)_3(dcbpy)]]$ para el sistema BSA-[Bu₄N[(bpy)Re(CO)₃(dcbpy)]] a tres diferentes temperaturas. La concentración de $[Bu_4N[(bpy)Re(CO)_3(dcbpy)]]$ varió desde 0 hasta $6.04 \times 10^{-6} \text{ M}$; *buffer* fosfatos pH = 7,4; $\lambda_{exc.} = 280 \text{ nm}$. b. Gráfico de $1/\Delta F$ vs $1/[Bu_4N[(bpy)Re(CO)_3(dcbpy)]]$ para el sistema HSA-[Bu₄N[(bpy)Re(CO)₃(dcbpy)]] a diferentes temperaturas; las condiciones experimentales fueron las mismas que en a. 152

Figura 7.10. Representación de Van't Hoff. a. Sistema BSA-[ClRe(CO)₃(BCS)]²⁻. b. Sistema HSA-[ClRe(CO)₃(BCS)]²⁻. 153

- Figura 7.11.** Representación de Van't Hoff. **a.** Sistema BSA- $[\text{Bu}_4\text{N}[(\text{bpy})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dcbpy})]]$. **b.** Sistema HSA-- $[\text{Bu}_4\text{N}[(\text{bpy})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dcbpy})]]$. 154
- Figura 7.12.** Representación de un proceso de asociación proteína-ligando. Modelo termodinámico hipotético.²⁶⁹ 155
- Figura 7.13.** Solapamiento de los espectros de emisión y absorción para el sistema Albúmina- $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$. **a.** Espectro de emisión para BSA, $C_{\text{BSA}} = 1,5 \times 10^{-6}$ M (línea azul); y espectro de absorción para $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$, $C_{\text{Re(II)}} = 1,5 \times 10^{-6}$ M (línea negra); $T = 298$ K, buffer fosfatos $\text{pH} = 7,4$; $\lambda_{\text{exc}} = 280$ nm. **b.** Espectro de emisión para HSA, $C_{\text{HSA}} = 1,5 \times 10^{-6}$ M (línea azul); y espectro de absorción para $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$, $C_{\text{Re(II)}} = 1,5 \times 10^{-6}$ M (línea negra), bajo las mismas condiciones experimentales que en **a.** 158
- Figura 7.14.** Solapamiento de los espectros de emisión y absorción para el sistema Albúmina- $[\text{Bu}_4\text{N}[(\text{bpy})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dcbpy})]]$. **a.** Espectro de emisión para BSA, $C_{\text{BSA}} = 1,5 \times 10^{-6}$ M (línea roja); y espectro de absorción para $[\text{Bu}_4\text{N}[(\text{bpy})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dcbpy})]]$, $C_{\text{Re(II)}} = 1,5 \times 10^{-6}$ M (línea negra); $T = 299$ K, buffer fosfatos $\text{pH} = 7,4$; $\lambda_{\text{exc}} = 280$ nm. **b.** Espectro de emisión para HSA, $C_{\text{HSA}} = 1,5 \times 10^{-6}$ M (línea roja); y espectro de absorción para $[\text{Bu}_4\text{N}[(\text{bpy})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dcbpy})]]$, $C_{\text{Re(II)}} = 1,5 \times 10^{-6}$ M (línea negra), bajo las mismas condiciones experimentales que en **a.** 159
- Figura 7.15.** **a.** Espectros de CD para soluciones de BSA (línea negra) y BSA- $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$ con una relación complejo-proteína (r) de 0,5 (línea roja), 1,0 (línea azul) y 2,0 (línea verde). Las concentraciones de las especies fueron $C_{\text{BSA}} = 5 \times 10^{-6}$ M y $C_{\text{Re(II)}} = 1 \times 10^{-5}$ M; $T =$ ambiente, buffer fosfatos $\text{pH} = 7,4$. **b.** Espectros de dicroísmo circular para soluciones de BSA (línea negra) y BSA- $[\text{Bu}_4\text{N}[(\text{bpy})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dcbpy})]]$ con una relación complejo-proteína (r) de 0,5 (línea roja), 1,0 (línea azul) y 2,0 (línea verde). Las condiciones experimentales fueron las mismas que en **a.** 160

LISTA DE ABREVIATURAS

τ_{emi}	Tiempo de vida de emisión
Φ_{emi}	Rendimiento cuántico de emisión
$P_{\text{O}_2}^{\text{T}}$	Proporción de estados triplete sofocados por O ₂
$f_{\text{O}_2}^{\text{T}}$	Eficiencia de formación de oxígeno singlete
$^1\Delta_{\text{g}}$	Oxígeno en estado singlete excitado (lento)
$^1\Sigma_{\text{g}}^+$	Oxígeno en estado singlete excitado (rápido)
$^3\Sigma$	Oxígeno en estado basal triplete
A	Absorbancia
ALS	Alternating Least-Squares/Mínimos Cuadrados Alternantes
an	Antraceno
aq	Antraquinona
BCS	Batocuproin disulfonato disodio
bpy	2,2'-bipiridina
BSA	Bovine serum albumin/Albúmina sérica Bovina
Bu₄N	Tetrabutilamonio
CR	Compuesto de referencia
CTTS	Charge transfer to solvent/Transferencia de carga al solvente
dc bpy	5,5'-dicarboxil-2,2'-bipiridina
DFT	Density Functional Theory/ Teoría del Funcional de la Densidad
DMSO	Dimetil Sulfóxido
ϵ	Coefficiente de extinción
E_{emi}	Energía de emisión
ESI	Electrospray Ionization/Ionización por electrospray
ET	Electron transfer/Transferencia de Electrones
EnT	Energy Transfer/Transferencia de energía
F	Fluencia del láser
fac	Facial (ubicación espacial de los 3 grupos carbonilo)
FTIR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy/Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier
fwhm	Full Width at Half Maximum/Ancho Total a Media Altura
H	Altura pico a pico
H NMR	Proton Nuclear Magnetic Resonance/Resonancia magnética nuclear protónica
HOMO	Highest Occupied Molecular Orbital/Orbital Molecular Ocupado de Más Alta Energía
HSA	Human serum albumin/Albúmina sérica humana
I_{A}	Intensidad de radiación absorbida
I_{emi}	Intensidad de radiación emitida
IL	Intraligando

ISC	Intersystem Crossing/Cruzamiento intersistemas
K_d	Constante de velocidad de difusión controlada de encuentro
k_D	Constante de velocidad total
k_{-d}	Constante de velocidad de difusión controlada de separación
k_f	Constante de fluorescencia
k_{ic}	Internal Conversión/Constante de conversión interna
k_{isc}	Intersystem crossing/Constante de cruzamiento intersistemas
k_{nr}	Constante no radiativa
k_p	Constante de fosforescencia
k_q	Constante de velocidad de quenching bimolecular de emisión
k_r	Constante radiativa
K_T	Constante de compresibilidad isotérmica
k_{Td}	Constante de decaimiento del triplete catalizado por el oxígeno molecular
LC	Ligand centered/Centrado en el ligando
LF	Ligand Field/Campo Ligando
LIOAS	Laser Induced Optoacoustic Spectroscopy/Espectroscopía Optoacústica inducida por láser
LMCT	Ligand to metal charge transfer/Transferencia de carga Ligando a metal
LUMO	Lowest Unoccupied Molecular Orbital/Orbital Molecular Desocupado de Más Baja Energía
LLCT	Ligand to ligand charge transfer/Transferencia de carga ligando a ligando
MCR-ALS	Multivariate Curve Resolution- Alternating Least-Squares/ Resolución Multivariable de Curvas por Mínimos Cuadrados Alternados
MLCT	Metal to ligand charge transfer/Transferencia de carga metal ligando
MLLCT	Metal-ligand to ligand charge transfer/Transferencia de carga metal-ligando a ligando
MO	Molecular Orbital/Orbital Molecular
N_A	Constante de Avogadro
na	Naftaleno
n_{abs}	Cantidad de fotones absorbidos
N_{ph}	Cantidad de fotones incidentes
P_A	Presión Atmosférica
PCM	Polarizable Continuum Model/Modelo Continuo Polarizable
PDT	Photodynamic Therapy/Terapia Fotodinámica
P_v	Presión de vapor
pyr	Pireno
pz	Pirazina
PZT	Lead zirconium titanate/Plomo zirconio titanato
S_0	Estado basal singlete
T_1	Estado ³ TCML de más baja energía
TCSPC	Time Correlated Single Photon Counting/Conteo de fotones individuales correlacionado con el tiempo

TD-DFT	Time-Dependent Density Functional Theory/Teoría del Funcional de la Densidad Dependiente del Tiempo
TDOS	Total Density of States/Densidad total de los Estados
UV-vis	Ultravioleta visible
$VC_p\rho$	Capacidad calórica
α	Fracción de energía absorbida liberada como calor
δ	Desplazamiento químico
ΔV_r	Cambios de volumen por rearrreglos estructurales moleculares
ΔV_{th}	Cambios de volumen por relajación no radiativa
λ	Longitud de onda
ξ	Reordenamientos moleculares
ν_{calc}	Frecuencia calculada
ν_{exp}	Frecuencia experimental
f_{osc}	Fuerza del oscilador
β	Coefficiente de expansión isobárica

1 INTRODUCCIÓN

Los fenómenos fotofísicos y fotoquímicos son la base irrefutable para la supervivencia de los organismos en nuestro planeta siendo la fotosíntesis el ejemplo biológico por excelencia, gracias a su eficiencia en la conversión de energía solar en energía química y siendo el principal enlace entre el sol y las necesidades energéticas del mundo viviente. Pero el papel vital que juega la luz en las ciencias biológicas y de materiales no necesita mayor énfasis ya que el valor de la energía solar nunca había sido más evidente para el hombre que en los tiempos actuales¹. Partiendo de lo anterior, se ha visto en las últimas décadas la gran atención enfocada sobre la fotosíntesis artificial, cuyo principal objetivo es sintetizar complejos que sigan los principios de la naturaleza para poder ser explotados en sus propiedades para un sinnúmero de aplicaciones; sobresaliendo entre ellas la producción de energía idealmente iniciada desde fuentes renovables y procesos sostenibles. Y es que este camino no ha sido corto, pues remitiéndonos unos siglos atrás, Scheele, en 1777, y hasta ahora considerado descubridor de los efectos de la luz en sustancias puras, observa el oscurecimiento de los haluros de plata con la luz del sol, Trommsdorff en 1834, por el lado de la química orgánica, describe la primera reacción fotoquímica observada de la santonina, cuyo color cambia por efecto de la luz. Aún así, a finales del siglo XIX los estudios fotoquímicos todavía ocupaban solo una discreta parte en el desarrollo de la química; solo se conocía un número limitado de reacciones y la única fuente de luz empleada era el sol.² Podría decirse que la teoría de la fotoquímica no empieza sino hasta 1900 con la ley de Planck. A partir de esto, las contribuciones relevantes a los fundamentos teóricos por parte de Einstein, Lewis, Stern, Volmer, Franck, Condon, Jablonski, Hammond, Woodward y Hoffmann han permitido importantes avances³, revolucionando el conocimiento científico e impulsando nuestra comprensión sobre diferentes fenómenos a nivel atómico, subatómico y molecular. Así, la meta actual no radica solamente en descubrir nuevas reacciones fotoquímicas, sino también en el estudio de los mecanismos y procesos que intervienen en estas, apoyándose también, en muchos casos, en la química computacional.

Dentro de este contexto, el reciente interés por la fotofísica y la fotoquímica de moléculas con estados electrónicos excitados de vida relativamente larga se ha acentuado gracias a avances en diferentes campos de la ciencia como el desarrollo de dispositivos lógicos moleculares, solo por mencionar alguno.⁴⁻⁵ Estas moléculas fotoquímicamente estables podrían actuar como fotosensibilizadores o donores/aceptores de energía electrónica cuando sean incorporados a sistemas poliméricos o supramoleculares.⁶⁻⁷ El valor potencial de incorporar estas especies en dispositivos moleculares asciende a medida que incrementa su estabilidad y tiempos de vida del estado excitado.

De esta manera, desde hace unas tres décadas se viene dedicando gran esfuerzo en el estudio de los complejos tricarbonílicos de renio(I) diimina, debido en gran parte a que son complejos químicamente muy robustos y de síntesis relativamente sencilla. El comportamiento fotofísico de los mismos es excepcionalmente diverso y muy dependiente de la naturaleza de sus estados excitados de menor energía, debido a que las características de estos pueden ser fácilmente modificadas por variación de grupos sustituyentes tanto en los ligandos diimina como en ligandos auxiliares. Por todo lo anteriormente expuesto, estos complejos pueden ser usados fácilmente como fotosensibilizadores.

Esta tesis pretende hacer un aporte en esta área de la química y, precisamente, en los procesos relacionados con especies supramoleculares donde los complejos tricarbonílicos de renio(I) son protagonistas, para lo cual es importante entender en primera instancia las propiedades fundamentales de los diferentes componentes de la especie supramolecular. Es por esto que se traerán a colación conceptos de la química de coordinación y de los diferentes caminos fotofísicos presentes en complejos de metales de transición como soporte para dilucidar las propiedades de los complejos de renio evaluados y su interacción con proteínas de transporte.

2 OBJETIVOS Y ESTRUCTURA DEL TRABAJO

Se investigaron las propiedades fotoquímicas y fotofísicas de nóveles compuestos de coordinación. Se diseñaron complejos metálicos con ligandos polipiridínicos con el propósito de obtener propiedades adecuadas para su uso como fotosensibilizadores y en reacciones que involucren procesos de interacción con proteínas pequeñas.

Las investigaciones estuvieron centradas en la síntesis y caracterización de nuevos compuestos y en el conocimiento fundamental de la fotofísica de los sistemas seleccionados (Capítulos 1, 2 y 3). También se realizaron estudios de la interacción (formación de aductos) entre estos complejos metálicos y proteínas pequeñas (Capítulo 4).

El objetivo específico de esta tesis está relacionado con el estudio de las propiedades fotofísicas de nuevos complejos de la familia del $\text{Re}^I(\text{CO})_3\text{L}$ solubles en agua y la interacción de los mismos con proteínas de transporte como la albúmina sérica bovina (BSA por sus siglas en inglés) y la albúmina sérica humana (HSA por sus siglas en inglés).

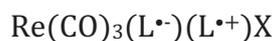
3 ANTECEDENTES GENERALES

Una gran cantidad de trabajos de investigación en complejos mononucleares de metales de transición han mostrado que varias familias de estos compuestos son muy interesantes desde el punto de vista electroquímico, fotofísico y fotoquímico,⁸⁻¹³ pues la interacción metal-ligando es lo suficientemente débil como para permitir que se manifiesten las propiedades intrínsecas de los metales y los ligandos (por ejemplo bandas de absorción y procesos redox centrados en el ligando y en el metal) y al mismo tiempo lo suficientemente fuertes como para causar la aparición de nuevas propiedades, características del compuesto como un todo (por ejemplo bandas de transferencia de carga del metal al ligando ó del ligando hacia el metal).

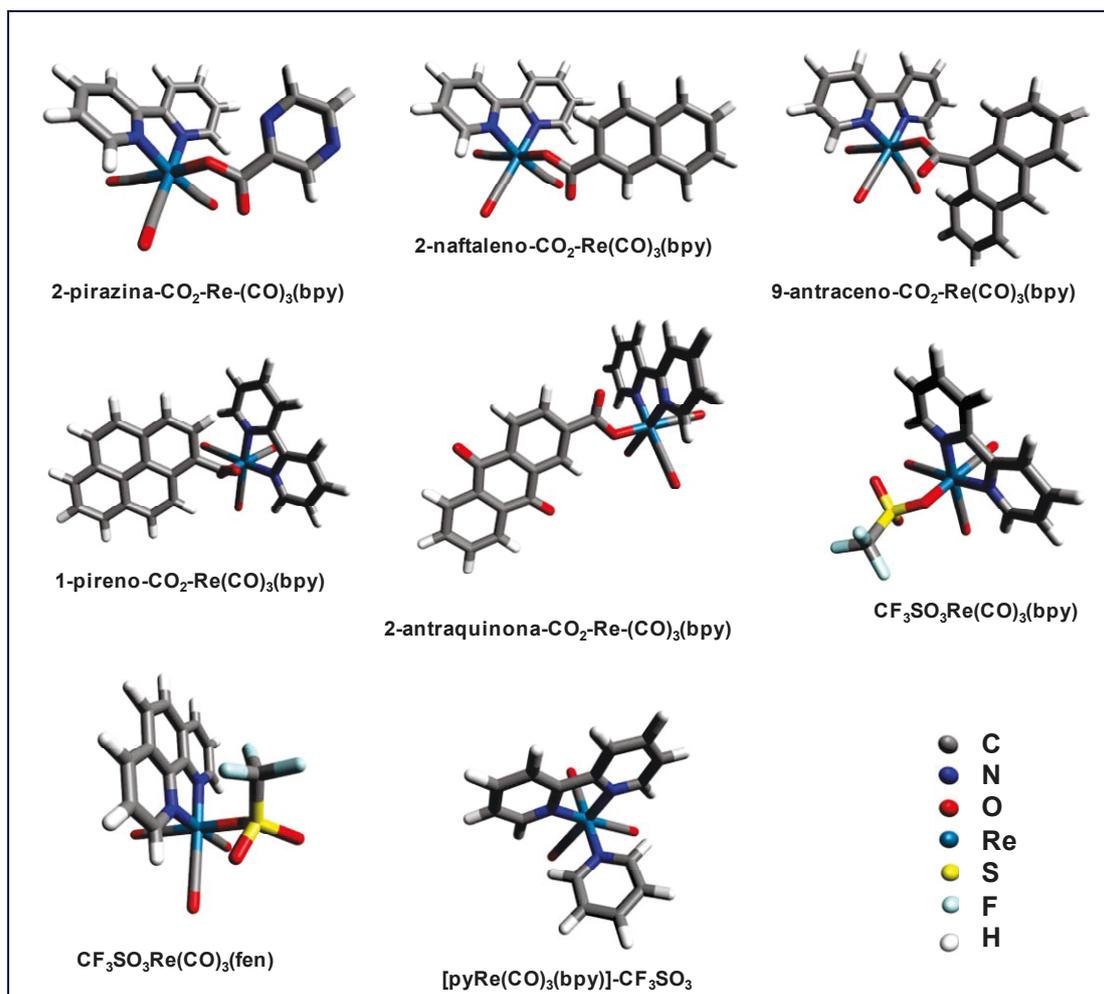
Cuando pasamos de complejos de metales de transición mononucleares a polinucleares la situación se pone aún más interesante debido a que en los últimos compuestos (supramoleculares) se encuentran, además de las propiedades relacionadas a cada componente basado en el metal, las propiedades relacionadas con la estructura y la composición de todo el arreglo supramolecular. Una elección adecuada de las partes monomoleculares a ensamblar y los ligandos puentes y un diseño apropiado de la estructura supramolecular puede permitir que de hecho ocurran procesos muy interesantes y potencialmente útiles tales como la transferencia de energía a través de rutas predeterminadas, separación de carga fotoinducida, intercambio multielectrónico a un potencial predeterminado, etc.

Nuestro grupo de Fotoquímica Inorgánica del INIFTA, tiene una experiencia de más de tres lustros en la síntesis y estudio de las propiedades fotofísicas y fotoquímicas de compuestos de coordinación. Durante ese tiempo se han realizados diversas investigaciones con distintos complejos, principalmente complejos de Re(I) con ligandos polipiridínicos de fórmula general $XRe(CO)_3L_2$, en donde X = halogenuro ó piridina sustituida y L_2 = biazina ó L puede ser una azina monodentada. Algunos ejemplos de estos complejos se pueden ver en el

Esquema 3.1. Así, se ha contribuido a determinar que la fotofísica de estos compuestos está generalmente asociada con algún estado excitado $MLCT_{azina \leftarrow Re}$ (transferencia de carga metal-ligando) o con estados excitados IL_{azina} (intra-ligando).¹⁴⁻¹⁵ En algunos casos fue posible detectar intermediarios birradicales del tipo:

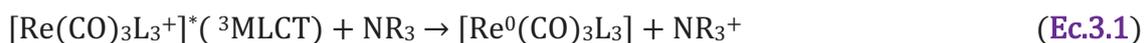


originados en estados excitados MLCT de mayor energía que el 3MLCT responsable de la emisión observada en estos compuestos.¹⁶⁻¹⁷



Esquema 3.1. Ejemplos de alguno de los complejos de Re(I) sintetizados anteriormente por integrantes del laboratorio de fotoquímica inorgánica

Asimismo, se ha examinado su capacidad como fotocatalizadores en la reducción de CO_2 .¹⁸ Durante los estudios de las propiedades redox de los estados excitados se estudió la reacción de estos con reductores adecuados (aminas, NR_3) (**Ecuación 3.1**):



dado que la reacción de transferencia de electrones inversa (**Ecuación 3.2**):



es muy exergónica con un gran número de aminas alifáticas, este hecho fue explotado para observar nítidamente la zona invertida de Marcus en tales procesos bimoleculares en solución.¹⁹ Por otra parte, la estructura elegida para algunos ligandos L ha permitido investigar cómo la deslocalización electrónica en el estado excitado MLCT afecta su estabilidad.²⁰

Estos complejos son catiónicos cuando el ligando L es neutro y son neutros cuando L es aniónico (por ejemplo L = piridina, el complejo tiene carga (+), L = Cl⁻, el complejo es neutro. (**Figura 3.1**))

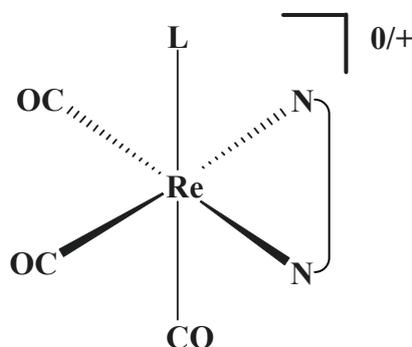


Figura 3.1. Estructuras de los complejos $\text{Re}(\text{L})(\text{CO})_3(\alpha\text{-diimine})^{0/+}$. (Los complejos de Re son neutros o catiónicos si el ligando axial L es aniónico o neutro respectivamente).

También se realizaron estudios con compuestos diseñados para investigar la existencia de estados de transferencia de carga ligando-ligando ($\text{LLCT}_{\text{L}' \leftarrow \text{L}}$). Tales estados habían sido sugeridos en la literatura como explicación para la anormalmente rápida desactivación del estado MLCT. Para ello, se buscó “aislar electrónicamente” un ligando del otro haciendo la conexión, entre uno de ellos y el metal, electrónicamente poco permeable. Esto dio lugar a un conjunto de publicaciones donde se presenta evidencia de la existencia de probables estados LLCT.²¹⁻²⁴

Investigaciones más recientes con complejos binucleares: Ferroceno-CO₂-Re(CO)₂L₂, donde L₂ = 1,10-fenantrolina o 2,2'-bipiridina, han puesto de manifiesto cómo la presencia del Fe^{II}, en el ferroceno, impide la descarboxilación que se observaba en la fotólisis de compuestos relacionados.²⁵

En el último lustro, parte de las investigaciones del grupo han evolucionado hacia el desarrollo de compuestos polinucleares derivatizando, con complejos de iones metálicos, polipiridinas, policarboxilatos ó poliaminas. La fotofísica y fotoquímica muestra un comportamiento particular derivado de la influencia de la estructura polimérica.²⁶⁻³¹ Por ejemplo, la interacción de los estados excitados de transferencia de carga de Re(I) a fenantrolina (MLCT) hacen que las propiedades fotofísicas de los cromóforos coordinados al polímero de la poli-4-vinilpiridina sean marcadamente diferentes a aquellas de los monómeros piridina Re(CO)₃(1,10-fenantrolina)⁺. La aniquilación de dos estados excitados MLCT genera cromóforos en el estado fundamental y estados excitados IL, estos últimos de energías mayores a las de los MLCT. En contraste con lo que ocurre con los estados MLCT, estos estados IL oxidan ciertos solventes orgánicos (como por ejemplo metanol). Por otra parte, incorporando diferentes cromóforos a los polímeros, hemos observado procesos de transferencia de energía de resonancia entre los mismos.³²

Esta tesis estará centrada específicamente en los estudios fotofísicos de los complejos tricarbónicos *fac* de Re(I) [Bu₄N][(bpy)Re(CO)₃(dcbpy)] (donde bpy = 4,4'-bipiridina; dcbpy = 5,5'-dicarboxil-2,2'-bipiridina y Bu₄N = tetrabutilamonio) y [ClRe(CO)₃(BCS)]²⁻ (donde BCS = batocuproindisulfonato) y la interacción de estos con proteínas de transporte como la HSA y la BSA.

3.1 COMPLEJOS ORGANOMETÁLICOS DE RENIO

Los complejos organometálicos de renio ocupan una posición importante en la fotofísica y la fotoquímica de los complejos de metales de transición, ya que los primeros estudios sistemáticos de las propiedades fotofísicas y fotoquímicas de los complejos extraordinariamente estables, *fac*-Re(I)X(CO)₃(L) (donde L es un ligando diimina bidentado o dos ligandos piridínicos monodentados, y X es un halógeno, un grupo alquilo o un ligando piridínico), en los 70's por Wrighton y colaboradores acerca de complejos polipiridínicos de renio (I), han jugado un papel importante en la comprensión de los procesos fotofísicos y de transferencia de electrones inducida por luz (ET por sus siglas en inglés) y transferencia de energía electrónica (EnT por sus siglas en inglés)³³⁻³⁷. Varias investigaciones han sido reportadas en la literatura, basadas en complejos que incorporan el cromóforo Re(I)X(CO)₃(bpy) (bpy = 2,2'-bipiridina o sus derivados). Las propiedades fotofísicas de estos complejos son dependientes del medio³⁸⁻³⁹, y están determinadas mayormente por sus estados excitados de transferencia de carga metal-ligando (MLCT)⁴⁰⁻⁴¹ y por procesos físicos o químicos facilitados por sistemas *cromóforo-quencher* unidos covalentemente⁴²⁻⁴³. Los compuestos basados en Re(I) ofrecen algunas ventajas en la elucidación de varias propiedades de los estados excitados de los complejos organometálicos. Como lo señalaron Vogler y Kunkley, la fotofísica y fotoquímica de los complejos de renio es muy amplia, comprendiendo ocho estados de oxidación que van desde el renio (0) (en el caso de Re₂(CO)₁₀) hasta el renio (VII) (por ejemplo, MeReO₃)⁴¹. Además, la facilidad y viabilidad de las síntesis de complejos *fac*-Re(I)(CO)₃(diimina) y de la variación de los ligandos diimina en sus estructuras, hacen más fácil la modificación sistemática de las propiedades electrónicas para estos complejos⁴⁴⁻⁴⁶. Estas modificaciones de las propiedades del estado excitado nos dan una idea del rol del ligando diimina en la determinación de las características espectroscópicas y fotofísicas. Por otra parte, en los complejos del tipo *fac*-Re(I)(CO)₃(diimina) los tiempos de vida de los estados excitados de más baja energía son, usualmente, lo suficientemente largos para permitir

procesos de transferencia de electrones o energía a especies cercanas cuando se satisfacen las condiciones energéticas y electrónicas necesarias⁴².

Por lo general, las propiedades del estado excitado de los complejos tricarbonílicos de Re(I) diimina ocurren principalmente a través de sus estados excitados triplete de más baja energía, debido a la rápida relajación vibracional y al cruce intersistemas desde niveles de energía vibracional superiores luego de la excitación óptica³⁴⁻³⁵. Así, la naturaleza de los ligandos aceptores de menor energía (tanto ligandos diimina como ligandos puente) desempeña un papel decisivo en la determinación de las propiedades fotofísicas y/o fotoquímicas finales. Varios estados excitados se generan dependiendo de los niveles de energía relativos de los orbitales de metal y ligando, así como también del grado de interacción entre ellos. Muchos complejos tricarbonílicos de Re(I) diimina son altamente emisivos ($\Phi_{em} = \leq 0,6$) y presentan tiempos de vida de emisión en solución relativamente largos (10 ns a 1 μ s) debido a la existencia de estados excitados MLCT de más baja energía de carácter triplete^{13,34}. En estos casos, el decaimiento de los estados emisores MLCT de más baja energía, está a menudo determinado principalmente por la ley de diferencia de energía (Energy Gap Law, en inglés), que indica que el tiempo de vida del estado excitado se hace más corto cuanto menor es la diferencia de energía entre el estado excitado y el estado fundamental. Otra característica importante de estos complejos es el gran desplazamiento hipsocrómico de sus máximos de emisión cuando se va desde un ambiente fluido hasta un medio rígido, lo que se describe como "*rigidocromismo luminiscente*". Aquí, el estado excitado triplete MLCT de larga vida, al parecer, se eleva en energía comparado con la molécula en estado fundamental, debido a la capacidad limitada de las moléculas del solvente para reorientar y estabilizar el momento dipolar del estado excitado en el medio rígido^{33,38,40}.

Claramente, hay una riqueza enorme en el comportamiento fotofísico y fotoquímico de los estados excitados presentes en los complejos tricarbonílicos de Re(I) diimina. En efecto, la abundancia de las propiedades fotofísicas de estas moléculas ha permitido un amplio rango de aplicaciones de gran interés e importancia, incluyendo su uso como catalizadores⁴⁷⁻⁵¹, sensores⁵²⁻⁵⁹, sondas

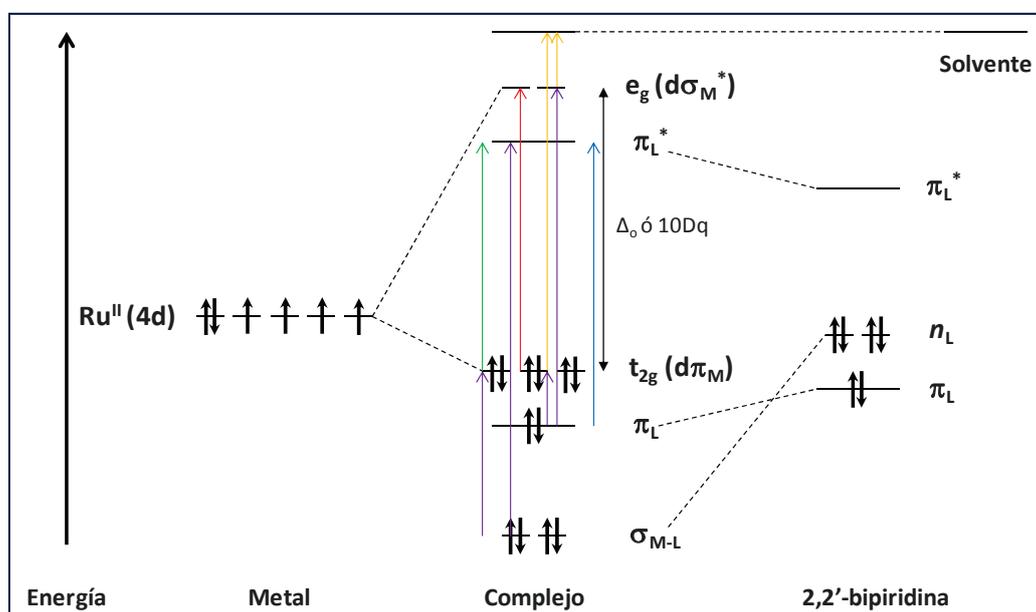
para fotopolimerización^{38,60-61}, interruptores ópticos⁶²⁻⁷¹, materiales emisores de luz⁷²⁻⁷⁸, materiales para óptica no lineal⁷⁹⁻⁸², fotoclivaje de ADN⁸³⁻⁸⁷ y radiofarmacéuticos⁸⁸⁻⁹².

3.2 PROCESOS FOTOFÍSICOS Y FOTOQUÍMICOS EN COMPLEJOS DE METALES DE TRANSICIÓN

3.2.1 DESCRIPCIÓN DE LOS ORBITALES MOLECULARES

Los complejos de Re en estado de oxidación 1+ presentan una configuración electrónica en la cual los orbitales 5d poseen 6 electrones. En general, los complejos de metales de transición $d6$ que poseen en su esfera de coordinación ligandos polipiridínicos, presentan estados excitados que se asemejan mucho a los observados para el $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$. Este ha sido ampliamente estudiado y se presentará aquí como complejo “modelo” para entender, de manera simplificada, la dinámica de los estados excitados puestos en juego luego de la excitación electrónica.

En el **Esquema 3.2** se ilustra el diagrama de orbitales moleculares resultante de la combinación de los orbitales 4d del Ru(II) y orbitales n , π y π^* de la bpy.



Esquema 3.2. Descripción cualitativa de los orbitales moleculares del $\text{Ru}(2,2'\text{bpy})_3^{2+}$ y los tipos de transiciones electrónicas posibles: (—) MLCT, (—) LMCT, (—) IL, (—) MC y (—) CTTS

En un entorno pseudo-octaédrico, los cinco orbitales 4d se dividen en dos grupos, como producto de su diferente simetría y energía de repulsión, generada luego de la coordinación de cada ligando y su ubicación en el

espacio octaédrico: dos orbitales e_g y tres t_{2g} . Los primeros son de mayor energía y por lo tanto se los ha denominado también como orbitales $d\sigma^*$ -metal, mientras que los segundos, que disminuyen su energía con la coordinación, se denominan orbitales $d\pi$ -metal. Los 6 electrones 4d están apareados y se ubican en estos tres orbitales degenerados, de naturaleza no enlazante (complejos de bajo spin). La magnitud, en energía, de la separación entre los orbitales e_g y t_{2g} , Δ_0 o $10Dq$, depende de algunos parámetros que incluyen el radio iónico y carga del metal y la naturaleza química de los ligandos. Los ligandos polipiridínicos tienen orbitales n no enlazantes y orbitales π ocupados ó llenos, y orbitales π^* anti-ligantes vacíos de baja energía. Los pares de electrones no enlazantes de los átomos de nitrógeno (u orbitales n llenos) participan en la formación de enlaces metal-ligando, estabilizándose y disminuyendo sustancialmente su energía. En función de este diagrama simplificado se pueden identificar las diferentes transiciones electrónicas posibles en esta familia de compuestos luego de la absorción de radiación de longitud de onda apropiada.

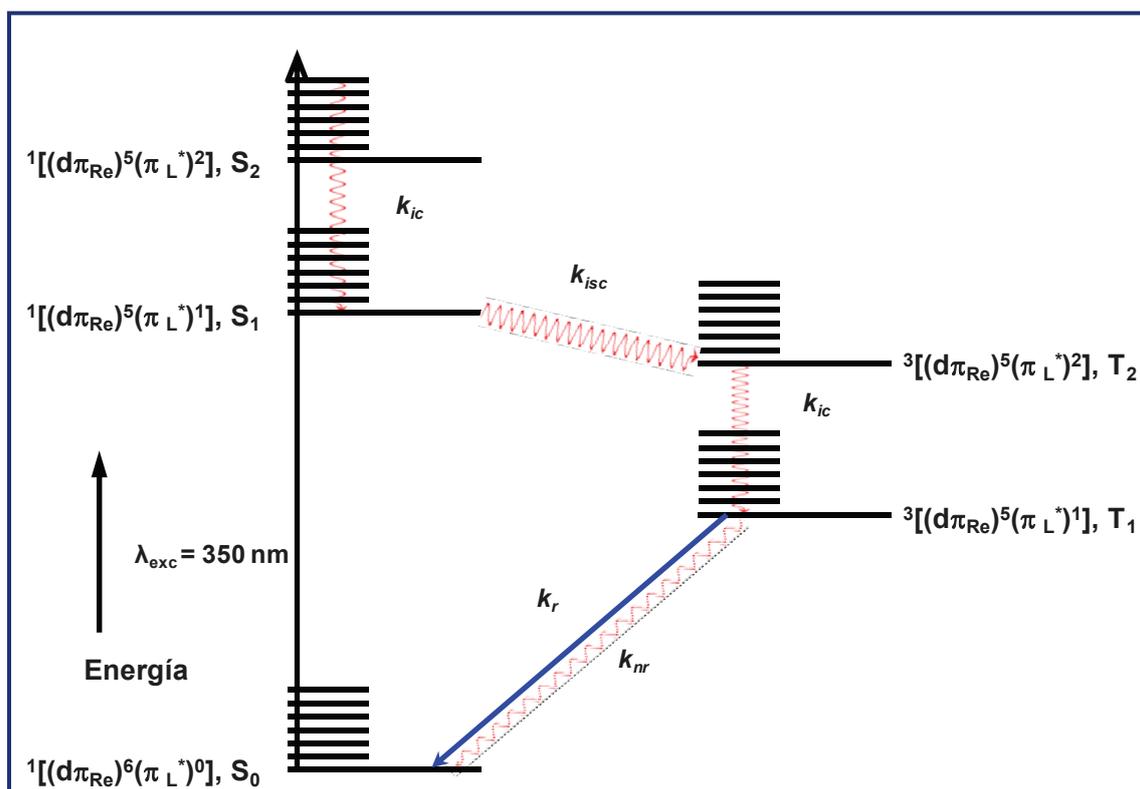
La aparición de una intensa absorción en la región visible es un rasgo característico de estos complejos y se corresponde con una *transferencia de carga del metal hacia el ligando*, MLCT. Estas transiciones ocurren cuando un electrón alojado en un orbital localizado sobre el metal es promovido hacia un orbital localizado sobre el ligando, $t_{2g} \rightarrow \pi_L^*$ en el **Esquema 3.2**, presentando típicamente, valores del coeficiente de extinción, $\varepsilon \geq 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, ya que están permitidas por las reglas de Laporte y usualmente por las de spin. Además se caracterizan por su tendencia a producir separación de cargas, las cuales pueden llevar a reacciones redox. Las transiciones en las cuales la carga electrónica es transferida esencialmente desde los ligandos hacia el metal coordinante, pertenecen a otro tipo de transferencia de carga denominada *transferencia de carga de ligando a metal*, LMCT, $\pi_L \rightarrow e_g$ en **Esquema 3.2**. Que se verifique una u otra transición, dependerá de la capacidad donora ó aceptora de electrones de los ligandos y de la capacidad de oxidarse ó reducirse del metal central. Por último, ocasionalmente puede observarse también la transferencia de carga desde el metal hacia el solvente (CTTS por

sus siglas en inglés). En los casos en los cuales se observa dicha transición, la posición de la banda de absorción depende de la facilidad que tenga el solvente para reducirse y el centro metálico para oxidarse. Estas transiciones donde la carga se mueve hacia el solvente pueden llegar a tener valores de ϵ de $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Además de las transferencias de carga, pueden presentarse transiciones en donde solamente están involucrados orbitales de los ligandos y se denominan transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ centradas en el ligando ó *transiciones intraligando*, IL, $\pi_L \rightarrow \pi_L^*$ las cuales se pueden ver en el **Esquema 3.2**. Estas transiciones son relativamente poco afectadas por los centros metálicos (se corren levemente hacia el rojo con respecto a la correspondiente transición $\pi \rightarrow \pi^*$ para el ligando libre), ocurren típicamente en el ultravioleta ($\lambda < 350 \text{ nm}$) y poseen un alto coeficiente de extinción ($\epsilon \geq 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Otro tipo de transición que puede ocurrir, es aquella en la cual están involucrados los orbitales *d* del metal y se denominan *transiciones centradas en el metal*, (MC por sus siglas en inglés) ó transiciones $d \rightarrow d$, $t_{2g} \rightarrow e_g$ en el **Esquema 3.2**. Estas transiciones están formalmente prohibidas en una geometría octaédrica resultando en absorciones muy débiles ($\epsilon \sim 10\text{-}100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), usualmente en la región visible. Como estas transiciones involucran la promoción de un electrón hacia un orbital de naturaleza antiligante ($d\sigma^*$ -metal) el enlace metal-ligando se debilita y por lo tanto, las transiciones $d \rightarrow d$ comúnmente resultan en reacciones fotoquímicas de sustitución de ligandos. Los complejos tricarbónicos de Re(I) prácticamente no experimentan este tipo de transiciones debido al gran efecto de campo ligando que producen los carbonilos. Por lo tanto, dichos orbitales se encuentran a mayor energía y, como consecuencia de ello, presentan una notable estabilidad en relación con el cambio de ligandos. De esta manera, las absorciones que se observan en los carbonilos de Re(I), corresponden, generalmente, a las transiciones fuertemente permitidas MLCT e IL.

3.2.2 ASPECTOS FOTOFÍSICOS

Las características de los estados excitados del $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ pueden ser resumidas y representadas en un diagrama de Jablonski, **Esquema 3.3**. En general, se puede considerar que las moléculas del complejo en su estado basal, presentan una distribución electrónica en donde todos sus electrones se encuentran apareados, es decir, son de naturaleza singletes (la multiplicidad global de la molécula es igual a 1). Si la promoción de un electrón a algún estado excitado de energía mayor, luego de la absorción de luz, se produce manteniendo las coordenadas nucleares del estado fundamental, es decir, los cambios electrónicos ocurren mucho más rápidamente que los rearrreglos nucleares, entonces estas transiciones electrónicas se dice que obedecen al *principio de Franck-Condon*, y a los estados generados inmediatamente después de la absorción de luz se los denomina estados de Franck-Condon.



Esquema 3.3. Diagrama de Jablonski que representa los procesos de desactivación de los estados excitados del complejo $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$. (↗) caminos radiativos (↘) caminos no radiativos.

Debido a que las transiciones en las cuales se mantiene la misma multiplicidad de spin son completamente permitidas (y por lo tanto las absorciones serán intensas) se asume que los estados excitados poblados también serán de

naturaleza singletes. Una transición a un estado triplete (en la cual el electrón promovido sufrió un cambio de spin) es prohibida por spin y por lo tanto existirá una baja probabilidad de poblar ese estado desde uno basal singlete. Por lo tanto las absorciones, si las hubiera, serán muy débiles. Sin embargo, como veremos más adelante, estos estados se pueden poblar siguiendo otros caminos.

Para el complejo modelo considerado, al excitar con luz de 450 nm, se pueblan estados singletes de transferencia de carga, $^1\text{MLCT}$, generalmente el correspondiente al de menor energía (S_1), aunque otros de niveles más altos se pueden poblar también en forma directa (S_2, S_3, \dots etc). En estos casos, luego de la absorción, se produce un proceso de relajación rápida, antes que cualquier otro proceso, hacia el estado excitado más bajo $^1\text{MLCT}$ (ley de Kasha), debido a la reorganización de los enlaces en toda la estructura molecular producto de los cambios en la configuración electrónica. Este paso de disipación de energía en forma no radiativa se la denomina *conversión interna* y ocurre siempre entre estados de igual multiplicidad. La constante de velocidad específica que caracteriza este proceso se denomina k_{ic} y generalmente es del orden de 10^{13} s^{-1} , tanto en sistemas orgánicos como inorgánicos.

El estado excitado $^1\text{MLCT}$ puede continuar ahora su camino de regreso al estado de energía basal (S_0) siguiendo pasos de desactivación radiativos y no radiativos. El camino radiativo, es decir, la pérdida de energía por emisión de luz, se conoce como *fluorescencia* cuando los estados involucrados poseen la misma multiplicidad ($S_1 \rightarrow S_0$), siendo k_f la constante de velocidad. Tanto en sistemas orgánicos como inorgánicos k_f toma valores del orden de 10^8 s^{-1} .

Se denomina *cruzamiento intersistemas* a una transición no radiativa entre estados de distinta multiplicidad ($\Delta S = 1$) la cual está formalmente prohibida por spin. Esta regla se cumple, en general, en moléculas orgánicas que contienen átomos de bajo número atómico y por lo tanto estos procesos son muy lentos (la constante de velocidad específica, k_{isc} , es del orden $10^6 - 10^9 \text{ s}^{-1}$). En sistemas inorgánicos, en cambio, las diferencias pueden ser sustanciales.

Estas diferencias se deben, en parte, a los altos valores de las constantes de acoplamiento spin-órbita asociadas con los altos pesos atómicos de los iones metálicos. El incremento del acoplamiento spin-orbital causa un efecto de *mezcla* entre los estados singletes y tripletes lo cual, de alguna manera, atenúa (flexibiliza) la regla de selección anterior. Por este motivo, estados tripletes pueden poblarse eficientemente desde estados singletes cercanos más altos (En general se verifica que los estados tripletes se encuentran a una energía menor con respecto al correspondiente estado singlete debido a que los estados de mayor multiplicidad son más estables ya que su configuración electrónica presenta una mínima energía de repulsión electrón-electrón) y las k_{isc} correspondientes serán del orden de 10^9 - 10^{12} s⁻¹. Así, estas transiciones son muy rápidas e indistinguibles, desde el punto de vista cinético, de la conversión interna la cual no tiene ninguna prohibición.

El estado ³TCML de más baja energía, T₁, es el estado excitado responsable, en esta familia de complejos, de la luminiscencia y reactividad química que se monitorean en las medidas de emisión en estado estacionario y emisión resuelta en el tiempo. En efecto, una vez poblado, la desactivación de este estado para retornar al estado basal puede seguir un camino no radiativo por el cual la energía es disipada como calor hacia los alrededores, a través de vibraciones moleculares internas de altas frecuencias. Este proceso posee una constante de velocidad específica denominada k_{nr} . Además, la emisión espontánea de un fotón de luz puede ocurrir desde este estado ³TCML, siguiendo un camino radiativo de desactivación con constante k_r . En sistemas orgánicos, a este paso radiativo en el cual los estados involucrados poseen diferente multiplicidad de spin se lo denomina *fosforescencia* (T₁ → S₀) y la constante de velocidad es k_p . Este modo de desactivación está prohibido por spin y por lo tanto k_p toma valores entre 0,02 - 100 s⁻¹ permitiendo hacer una clara distinción fenomenológica, entre fluorescencia y fosforescencia, mediante los tiempos de vida de la emisión. En sistemas inorgánicos esta distinción puede ser incierta debido a la característica de mezcla que poseen los estados excitados y k_p puede tomar valores entre 10² - 10⁷ s⁻¹. Por esta razón en complejos de metales de transición se utiliza el término *luminiscencia* que describe el camino radiativo correspondiente. Se puede asumir, como regla

para complejos polipiridínicos de metales de transición d6, que el decaimiento no radiativo domina y es más importante que el radiativo.

3.2.2.1 DECAIMIENTO RADIATIVO

El análisis del decaimiento radiativo es muy importante para establecer la dinámica de los estados excitados y provee, usualmente, el primer indicio sobre el carácter de el/los estado/s excitado/s de más baja energía en esta familia de complejos. La emisión típica del estado excitado MLCT corresponde a una banda ancha y sin estructura a temperatura ambiente en solución. La forma de la banda de emisión, su máximo de energía E_{emi} , rendimiento cuántico Φ_{emi} , tiempo de vida τ_{emi} , etc., son datos experimentales directamente medibles, como se describirá más adelante. El rendimiento cuántico de emisión, $\Phi_{\text{emi}} = k_r / (k_r + k_{nr})$ es dependiente de la longitud de onda de excitación e indica la eficiencia del cruzamiento entre sistemas. Para este tipo de complejos, es decir, el pasaje de $^1\text{MLCT} \xrightarrow{k_{isc}} ^3\text{MLCT}$ se produce con eficiencia ~ 1 . Como se mencionó anteriormente, la presencia de un átomo “pesado” permite una rápida formación del $^3\text{MLCT}$ desde el $^1\text{MLCT}$ como consecuencia de la alta constante de acoplamiento spin-órbita, impartiendo algún carácter singlete al estado $^3\text{MLCT}$. Por esta razón, la denominación de estados singlete y triplete para estos complejos no es estrictamente correcta aunque el formalismo se mantiene. El tiempo de vida del estado excitado emisor está relacionado con la inversa de la suma de las constantes correspondientes a los pasos de decaimiento, $\tau_{\text{emi}} = (k_r + k_{nr})^{-1}$. Como se mencionó anteriormente, cuando Φ_{emi} es pequeño, la desactivación del estado excitado está dominada por el mecanismo no radiativo, es decir $k_{nr} \gg k_r$ y por lo tanto $\tau_{\text{emi}} \approx 1 / k_{nr}$. De esta manera se podría calcular fácilmente k_r y k_{nr} una vez determinados experimentalmente los valores de Φ_{emi} y τ_{emi} . Siguiendo con el decaimiento del estado excitado $^3\text{MLCT}$ al estado fundamental singlete, nuevamente vemos que este paso está formalmente prohibido por spin, pero el mismo efecto de acoplamiento spin-órbita permite un decaimiento luminiscente del estado excitado con tiempos de vida del orden de 0,1 - 2 μs para cromóforos como el

$\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$. Estos tiempos son de vida relativamente larga comparados con los de transiciones singlete-singlete puras de sistemas orgánicos cuyo $\tau_{\text{emi}} \sim 1$ ns (fluorescencia), pero más cortos que los tiempos en que se efectúa una transición fosforescente, que son del orden del milisegundo, para estos mismos sistemas.

3.2.2.2 EFECTOS DEL SOLVENTE

La emisión originada en un estado excitado MLCT es también sensible a la polaridad del solvente. El estado excitado genera un gran cambio en el momento dipolar con respecto al estado fundamental producto de la transferencia de un electrón desde el metal hacia el ligando alojándose ahora sobre esta parte del complejo. Esto provoca una mayor estabilización en solventes más polares. El origen microscópico de esto está relacionado con el efecto sobre la constante dieléctrica del solvente, y puede ser racionalizado en el siguiente contexto: cuando el estado excitado de más baja energía $^3\text{MLCT}$ sigue los pasos de relajación, las moléculas del solvente se reorientarán en función del momento dipolar generado por el estado excitado. Los solventes más polares podrían producir una mayor reorientación de sus moléculas generando un efecto de mayor estabilización en el estado excitado. Obviamente, para que esta dinámica tenga lugar, la redistribución del solvente debe ocurrir mucho más rápidamente que el decaimiento del estado excitado.

3.2.2.3 EMISIÓN $^3(\pi^* \rightarrow \pi)$

A pesar de la prevalencia de la emisión del estado excitado MLCT a temperatura ambiente, se ha podido observar otro tipo de emisión en complejos de metales de transición d6. En particular, para los complejos tricarbónicos de $\text{Re}(\text{I})$ con ligandos bidentados de tipo diimina, la emisión $^3(\pi^* \rightarrow \pi)$ se origina en un estado de tipo IL del complejo; se observa más claramente a 77 K y puede ser fácilmente asignada por la fuerte similitud con el espectro de fosforescencia del ligando no coordinado. Los espectros de emisión de estos ligandos

muestran una estructura vibrónica similar a la de los espectros de emisión de la banda MLCT del complejo a 77 K, sin embargo, el máximo de emisión de esta última está corrido más hacia el rojo ($\sim 2500 \text{ cm}^{-1}$) que el del $^3(\pi^* \rightarrow \pi)$ comparado con la fosforescencia del ligando. La banda de emisión es angosta y estructurada aún a temperatura ambiente aunque muchas veces se encuentra enmascarada por la emisión coexistente de la transferencia de carga. Los estados ^3IL son usualmente de vida larga aunque sus tiempos de vida son más cortos comparados con los del ligando libre. Estos estados muestran una pequeña o nula dependencia con el solvente debido a que no se produce un gran cambio en el momento dipolar cuando el estado excitado IL es generado. La introducción en los complejos de ligandos polipiridínicos con estructuras aromáticas que posean un sistema π extensamente deslocalizado, aumenta la posibilidad de generar estados excitados de energía más baja centrados en el ligando.⁹³

3.2.2.4 FOTOSENSIBILIZACIÓN Y QUENCHING BIMOLECULAR

Otro método para la desactivación del estado excitado emisor $^3\text{MLCT}$ es por transferencia de electrones ó energía hacia donores ó aceptores apropiados. Cuando se produce la transferencia de carga metal-ligando, el electrón se ubica en un orbital π^* de alta energía del ligando, y a la vez, se genera un hueco en el orbital de baja energía $d\pi$ del metal. Por lo tanto el potencial de ionización decrece y la afinidad electrónica se incrementa cuando la molécula pasa del estado electrónico fundamental al estado electrónico excitado. Esto quiere decir que un estado electrónico excitado, en general, será un mejor reductor y un mejor oxidante que el estado electrónico fundamental. Por lo tanto, en presencia de aceptores y donores de electrones ocurre una rápida *transferencia de electrones* que desactiva el estado excitado $^3\text{MLCT}$. En complejos tricarbónicos de Re(I) han sido ampliamente utilizadas aminas reductoras como la trietanolamina (TEOA) y trietilamina (TEA) para desactivar el estado excitado. Como ejemplo se muestra en la **Ecuación 3.3** la reacción entre TEOA y un complejo de Re(I) con ligandos 4-fenilpiridina (4-phpy):

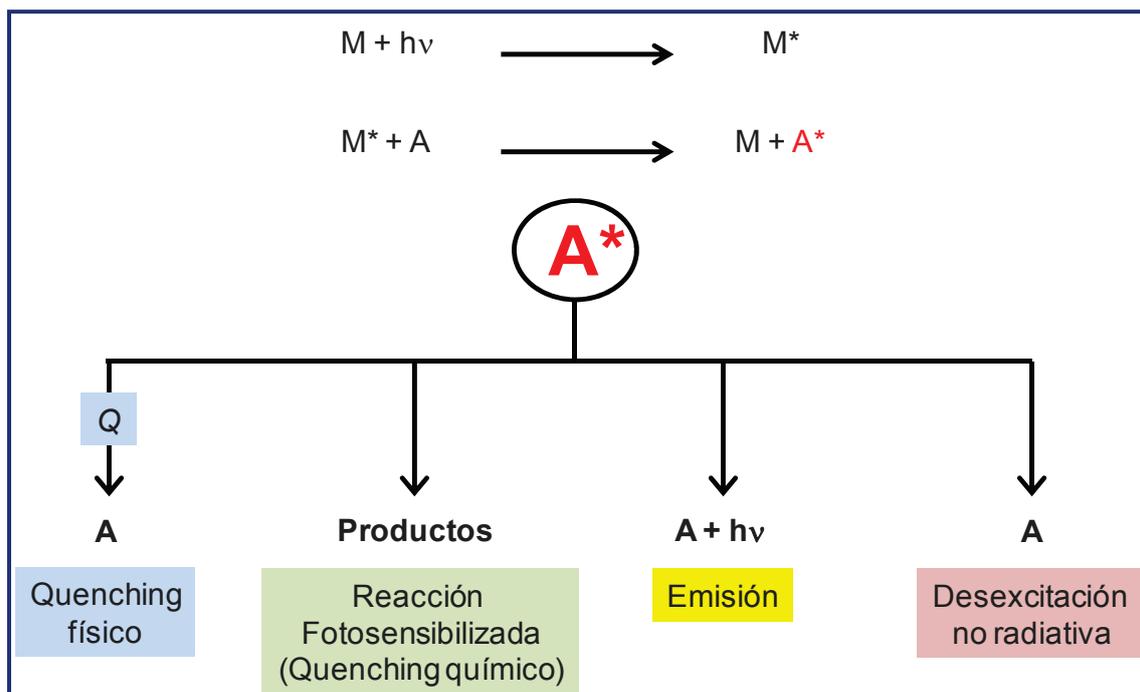


Posteriormente, la recombinación rápida de los productos regenera el estado fundamental. El estado excitado $^3\text{MLCT}$ también puede ser empleado en reacciones de sensibilización por *transferencia de energía* a estados tripletes de moléculas orgánicas como ocurre entre el estado excitado del complejo $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ y el antraceno⁹³.

Así, se denomina fotosensibilización a todo proceso por el cual una especie química sufre una alteración fotoquímica o fotofísica como resultado de la absorción inicial de luz por otra especie química denominada fotosensibilizador (o simplemente sensibilizador)⁹⁴. La fotosensibilización y el *quenching* juegan un papel muy importante en muchos aspectos de la fotoquímica orgánica⁹⁵. Ambos procesos pueden involucrar transferencias de energía del tipo:



La transferencia intermolecular de energía de una especie a otra, conduce a la excitación de especies no absorbentes (a una longitud de onda dada), que pueden involucrarse en cambios químicos que no son posibles por absorción directa de la luz de dicha longitud de onda. Esta vía diferente de excitación puede poblar estados excitados distintos a los obtenidos por absorción directa, y por lo tanto, se pueden observar otras reacciones químicas⁹⁶. Este mecanismo es responsable de reacciones fotosensibilizadas y de procesos de quenching bimolecular de emisión. En las reacciones fotosensibilizadas (**Ecuación 3.4**), una molécula (A) transparente a la longitud de onda de excitación sufre reacción a consecuencia de su interacción con otra molécula (M) que sí absorbe. Los procesos de quenching, por su parte, se abordan más adelante, pero implican la desexcitación de la molécula que absorbe (M) por interacción con otra molécula. Estos mecanismos de transferencia de energía y sus consecuencias pueden sintetizarse con las ecuaciones del **Esquema 3.4**.



Esquema 3.4. Procesos de transferencia de energía de una especie fotoexcitada.

En esta reacción, A resulta “sensibilizada” por radiación de una longitud de onda no absorbida por A sino por M . La energía de excitación es obtenida por M mediante la absorción de un fotón, para generar M^* , y posteriormente la energía se transfiere a A . Por las características de esta reacción la cantidad de energía en A^* debe ser menor a la absorbida por M . Así una molécula M^* puede ser relajada por una molécula A adecuada. La sensibilización es una técnica muy usada en química orgánica. En el esquema, Q es una tercera molécula que puede estar presente en el medio (quencher). Mediante un choque entre Q y A^* , A^* resulta desactivada por un mecanismo de quenching. Los procesos de fotosensibilización son muy importantes en el campo de la química orgánica para generar estados tripletes. Esto se debe a que muchas moléculas orgánicas no pueden acceder fácilmente al estado triplete por absorción directa desde el estado basal singlete, a causa de sus bajos rendimientos cuánticos de producción de estados tripletes. Por otra parte, la química de estados tripletes y singletes es, a menudo, muy diferente y, frecuentemente, se necesitan generar estados tripletes para su estudio o para producir reacciones particulares. Sin embargo, la transferencia de energía entre moléculas resulta ser un camino eficiente para obtener moléculas en estado

triplete. Un fotosensibilizador de tripletes debe reunir algunas características. Un fotosensibilizador ideal posee las siguientes:

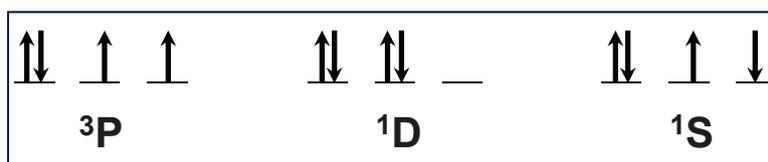
1. Una velocidad de cruzamiento intersistemas mucho más alta que la desactivación del estado S1 por otras vías.
2. Una energía de triplete más alta que los aceptores, permitiendo una transferencia de energía exotérmica.
3. Un tiempo de vida de triplete alto, para maximizar la eficiencia del proceso de transferencia de energía.
4. Una importante absorción en la región del espectro donde el aceptor no absorbe considerablemente.
5. Una baja reactividad química para permitir reacciones fotosensibilizadas con un aceptor.

No existe dicho fotosensibilizador ideal. Sin embargo, puede encontrarse el fotosensibilizador adecuado de acuerdo a las características de la molécula que se pretende fotosensibilizar. El parámetro más importante al seleccionar un fotosensibilizador es la diferencia de energía entre el fotosensibilizador excitado y el aceptor excitado, porque solamente ocurrirá la fotosensibilización si la transferencia de energía es exotérmica.

3.2.2.4.1 Producción de oxígeno singlete

El oxígeno es uno de los elementos más abundantes sobre la corteza terrestre, principalmente en su forma de molécula biatómica gaseosa, constituyendo el 21 % en volumen del aire seco. Por ello, su presencia es casi inevitable en cualquier sistema de reacción. Es uno de los elementos más importantes desde el punto de vista biológico debido a que reacciones en las que participa el oxígeno molecular proveen la fuerza termodinámica necesaria para el metabolismo de todos los organismos superiores. Su alto contenido energético, su gran reactividad y sus estados excitados, de relativamente baja energía, hacen al oxígeno molecular una especie muy importante desde el punto de vista fotoquímico.

Para entender la reactividad química del oxígeno es necesario conocer su estructura electrónica. El oxígeno atómico tiene número atómico ocho y, considerando los orbitales atómicos, una configuración $1s^2 2s^2 2p^4$. Los estados resultantes de considerar esta configuración electrónica pueden representarse esquemáticamente como se muestra en el **Esquema 3.5**.



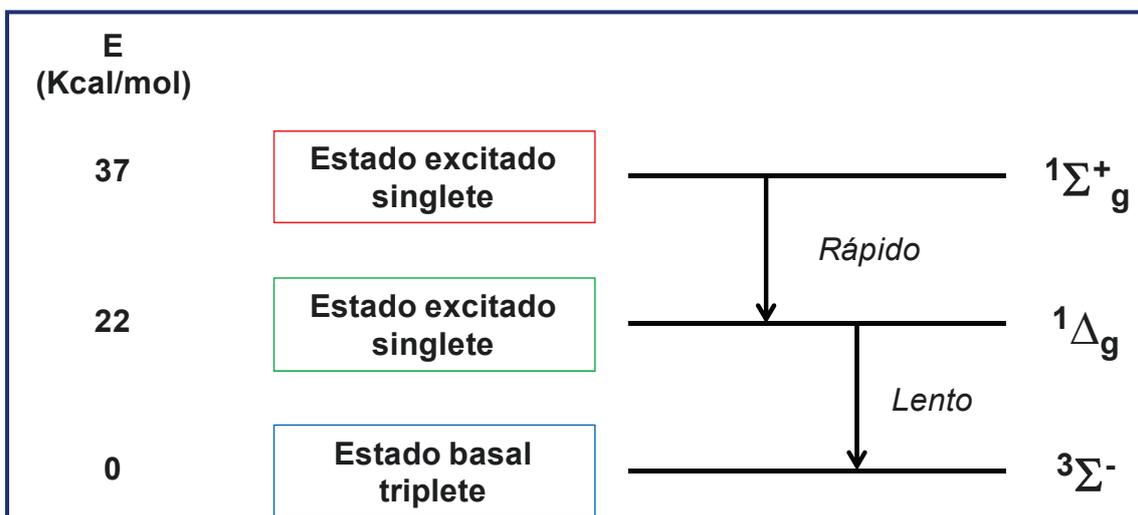
Esquema 3.5. Configuraciones posibles de los orbitales 2p del átomo de oxígeno. Debajo de cada configuración está el símbolo correspondiente.

Según la regla de Hund el estado basal es aquél de mayor multiplicidad de spin. Por lo tanto, la primera configuración del **Esquema 3.5.**, que tiene multiplicidad 3, corresponde al estado basal. Así, el átomo de oxígeno en su estado basal es un triplete. La segunda configuración, un singlete 1D , corresponde al primer estado excitado del oxígeno atómico. La configuración 1S es el segundo estado excitado, también singlete.

Para el oxígeno molecular pueden hacerse las mismas consideraciones. Con la teoría de orbitales moleculares se puede construir un diagrama para el estado basal del oxígeno molecular, que posee 16 electrones. La configuración resultante es $(\sigma_{1s})^2 (\sigma^*_{1s})^2 (\sigma_{2s})^2 (\sigma^*_{2s})^2 (\sigma_{2p})^2 (\pi_{2p})^4 (\pi^*_{2p})^2$. Esto da tres estados electrónicos correspondientes a tres arreglos posibles para los electrones.

El estado basal del O_2 es un triplete ($^3\Sigma^-$), paramagnético, debido a sus dos electrones no apareados. Los dos estados electrónicamente excitados energéticamente más próximos son singletes, cuyas notaciones espectroscópicas son $^1\Delta_g$ y $^1\Sigma_g^+$. En el **Esquema 3.6** puede apreciarse el diagrama de energía para el O_2 . De los dos estados excitados mencionados, sólo el de menor energía ($^1\Delta_g$) parece jugar un papel significativo en reacciones en solución y es este estado al cual se denomina comúnmente oxígeno singlete o, simplemente, 1O_2 . Se encuentra a 22,5 Kcal/mol sobre el estado basal. Esta especie emite luz fosforescente en la región del infrarrojo (1270 nm). El estado

de mayor energía ($^1\Sigma_g^+$), por su parte, se desactiva tan rápidamente al $^1\Delta_g$ que no tiene chances de participar en reacciones. El oxígeno singlete (1O_2) es, entonces, una especie electrónicamente excitada del oxígeno molecular (O_2) y participa en numerosas reacciones de oxidación como especie activada.



Esquema 3.6. Diagrama de energía para el O_2 en sus diferentes estados electrónicos.

El oxígeno singlete es una especie electrofílica sumamente reactiva y tiene la capacidad de atacar rápidamente a los compuestos orgánicos. Es alrededor de 1000 veces más reactivo que el estado basal del oxígeno. Esta mayor reactividad se debe simplemente a que numerosas sustancias con las que reacciona se encuentran en estado basal singlete, entonces la reacción es singlete-singlete, más probable que una reacción triplete-singlete, como debería ser con el oxígeno en su estado basal.

3.3 MONITOREO DE LOS PROCESOS DEL ESTADO EXCITADO

A continuación se describen los equipos y técnicas empleadas para la determinación de los factores que influyen en la dinámica del estado excitado. También se mencionan otras técnicas complementarias y algunas de las utilizadas para la caracterización de los complejos. Igualmente, en cada capítulo en los que se presentan los resultados de los experimentos realizados, se menciona en forma resumida los equipos utilizados para cada medida en particular y otras especificaciones experimentales.

3.3.1 LUMINISCENCIA Y ESPECTROFLUOROMETRÍA

3.3.1.1 EMISIÓN EN ESTADO ESTACIONARIO: ESPECTROS DE EMISIÓN, Y RENDIMIENTOS CUÁNTICOS DE EMISIÓN

La aplicación satisfactoria de los métodos de luminiscencia requiere una comprensión de la instrumentación utilizada, siendo necesario prestar una atención considerable a los detalles experimentales. Hay dos razones que justifican que esto sea así. Primero, la fluorescencia es un método altamente sensible. La ganancia o amplificación de los instrumentos puede ser incrementada para hacer observables emisiones muy débiles. Sin embargo, estas emisiones pueden no estar originadas por el fluoróforo de interés. Tales interferencias pueden deberse a la emisión del solvente, pérdidas de luz de los instrumentos, luz dispersada por soluciones turbias, dispersión Rayleigh y/o dispersión Raman, para nombrar solo algunas. Segundo, no existe espectrofluorómetro ideal y tales instrumentos no dan verdaderos espectros de excitación ni de emisión debido a la no uniformidad de la salida espectral de las fuentes de luz y a la dependencia de la eficiencia de los monocromadores y tubos fotomultiplicadores con la longitud de onda. Además, la polarización o anisotropía de la luz emitida también puede afectar la medición de las

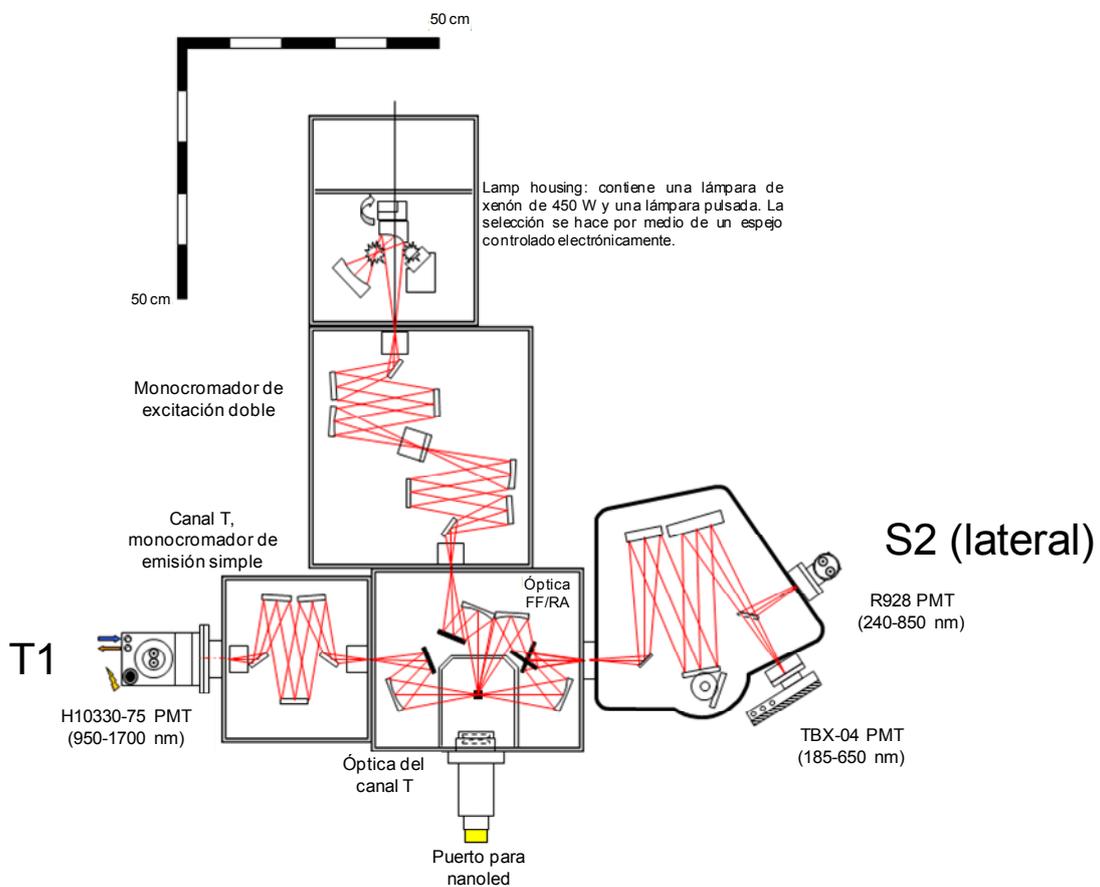
intensidades de fluorescencia. Para obtener datos espectrales confiables, entonces, es necesario controlar todos estos factores para poder efectuar las correcciones necesarias.

Un espectro de emisión es la distribución espectral de la emisión de la muestra en estudio, medido excitando con una longitud de onda fija (λ_{exc}). Inversamente, un espectro de excitación consiste en la dependencia de la intensidad de emisión a una dada longitud de onda (λ_{obs}), con la variación de la longitud de onda de excitación.

Para un instrumento ideal, el espectro de emisión registrado directamente, representaría el flujo de fotones emitidos a cada longitud de onda, sobre un intervalo de longitud de onda determinado por el ancho de las rendijas y la dispersión del monocromador de emisión. Similarmente, el espectro de excitación representaría el rendimiento cuántico relativo de emisión a cada longitud de onda de excitación. En el **Esquema 3.7** se muestra un diagrama esquemático del sistema óptico del espectrofluorómetro **FluoroLog-3 TCSPC HORIBA Scientific** utilizado para nuestros experimentos.

Básicamente, los espectros de emisión en estado estacionario, se obtienen excitando con luz monocromática desde una fuente de excitación luminosa (una lámpara de arco de Xenón en nuestro instrumento), focalizando el haz (cuya pureza espectral se obtiene del monocromador de excitación), sobre la cubeta. Para evitar complicaciones por efecto de la luz dispersada la emisión de la muestra se detecta a 90° con respecto al haz de excitación. El espectro de emisión se obtiene por barrido de un segundo monocromador (monocromador de emisión) situado entre la muestra y el detector, un tubo fotomultiplicador R928.

La lámpara de Arco de Xenón emite con alta intensidad en todo el rango de longitudes de onda por encima de 250 nm por lo tanto es muy útil para trabajar en la región UV-visible. Por esta razón se utilizaron celdas de cuarzo.



Esquema 3.7. Sistema óptico del espectrofluorómetro utilizado para los experimentos de emisión en estado estacionario

El espectro de emisión obtenido es corregido haciendo la diferencia entre éste y el espectro de emisión del solvente ó matriz tomado en las mismas condiciones, y al espectro así obtenido se lo corrige por la respuesta del instrumento (la sensibilidad del detector y la eficiencia de los monocromadores varían con la longitud de onda). Esta corrección se realiza dividiendo la señal

de emisión de la muestra por la respuesta de instrumento, que en nuestro caso, el equipo Horiba utilizado ya la incluye. El denominado espectro de emisión corregido hace referencia, generalmente, a este tipo de corrección. Otro factor que hay que tener en cuenta en todos los experimentos de luminiscencia es la posibilidad de que la intensidad aparente de la emisión y su distribución espectral sean dependientes de la densidad óptica de la muestra y de la geometría del sistema. Para la geometría más común usada en espectrofluorimetría, que implica la observación de la emisión en ángulo recto de una cubeta iluminada centralmente, se puede demostrar que si la absorbancia de la muestra a la longitud de onda de excitación es de 0,1 la intensidad en el centro de la cubeta, I , es $0,88 \cdot I_0$, donde I_0 es la intensidad incidente sobre la cubeta. Como la intensidad de la luminiscencia observada es proporcional a la intensidad de la luz de excitación, el rendimiento cuántico aparente será alrededor de un 10% menor que el observado con una solución infinitamente diluida. Este es el denominado efecto de filtro interno. Tal fenómeno puede disminuir la intensidad de excitación en el punto de observación o disminuir la emisión observada por absorción de ésta. Por lo general, y para minimizar este efecto, los espectros de emisión y excitación se tomaron utilizando soluciones con una absorbancia a la longitud de onda de excitación, $A_{\lambda_{exc}} \leq 0,1$.

Como se mencionó anteriormente, otro parámetro directamente medible en experimentos de emisión en estado estacionario y de vital importancia para la caracterización del estado excitado emisor de un complejo dado, es el rendimiento cuántico de emisión. Los rendimientos cuánticos dan cuenta de la eficiencia de un proceso en términos de la cantidad de energía lumínica absorbida. El rendimiento cuántico de un proceso fotofísico como la emisión de luz, Φ_{emi} , (**Ecuación 3.5**), se puede expresar como el número de moléculas emisoras respecto de los fotones de luz absorbidos:

$$\Phi_{emi} = \frac{\text{Nro. de moléculas emisoras por unidad de tiempo y por unidad de volumen}}{\text{Nro. de cuantos absorbidos por unidad de tiempo y por unidad de volumen}}$$

(**Ec. 3.5**)

Como el número de fotones absorbidos es proporcional a la intensidad de la radiación absorbida, I_A , y el número de fotones emitidos es proporcional a la intensidad de la radiación emitida, I_{emi} , se puede considerar y escribir que:

$$\Phi_{emi} = \frac{I_{emi}}{I_A} \quad (\text{Ec. 3.6})$$

Nuevamente debemos hacer la siguiente consideración: la **Ecuación 3.6** es estrictamente válida cuando el estado excitado emisor es poblado en forma directa por la absorción de luz, es decir, cuando el rendimiento cuántico coincide con la eficiencia η . Si, por otro lado, el estado excitado emisor es poblado en forma indirecta siguiendo algún camino no radiativo, desde otro estado excitado que absorbió la luz, entonces el Φ_{emi} se obtiene multiplicando la expresión por la eficiencia del camino seguido. Como se mencionó anteriormente, éste es el caso para los estados excitados $^3\text{TCML}$ de los complejos en estudio que son poblados desde el correspondiente singlete a través de un paso de cruzamiento intersistemas. Por lo tanto, la expresión adecuada será:

$$\Phi_{emi} = \eta_{isc} \frac{I_{emi}}{I_A} \quad (\text{Ec. 3.7})$$

pero como $\eta_{isc} \sim 1$ la **Ecuación 3.7** se vuelve a transformar en la expresión original.

Experimentalmente, los rendimientos cuánticos de emisión de la solución muestra en estudio, se determinan por comparación de la intensidad de la emisión, I_{emi} , tomada como el área bajo la curva del espectro de emisión, $I_{muestra}$, y la intensidad de emisión, tomado en iguales condiciones, para una solución de una referencia con rendimiento cuántico conocido, $I_{referencia}$. La referencia a utilizar debería ser ópticamente comparable con la muestra (es decir, tener la misma densidad óptica y camino óptico y similar perfil de energía de emisión). Si la absorbancia de ambas soluciones a la longitud de onda de excitación, $A_{muestra}$ y $A_{referencia}$, es diferente, debe realizarse una corrección teniendo en cuenta esta condición. Finalmente, y tomando ambos espectros con el mismo equipo y en idénticas condiciones de temperatura, celda utilizada,

ancho de las rendijas, etc., los rendimientos cuánticos de emisión relativos fueron calculados de acuerdo a la **Ecuación 3.8**:

$$\Phi_{emi} = \left(\frac{A_{referencia}}{A_{muestra}} \right) \left(\frac{I_{muestra}}{I_{referencia}} \right) \Phi_{emi,referencia} \left(\frac{n_{muestra}}{n_{referencia}} \right)^2 \quad (\text{Ec. 3.8})$$

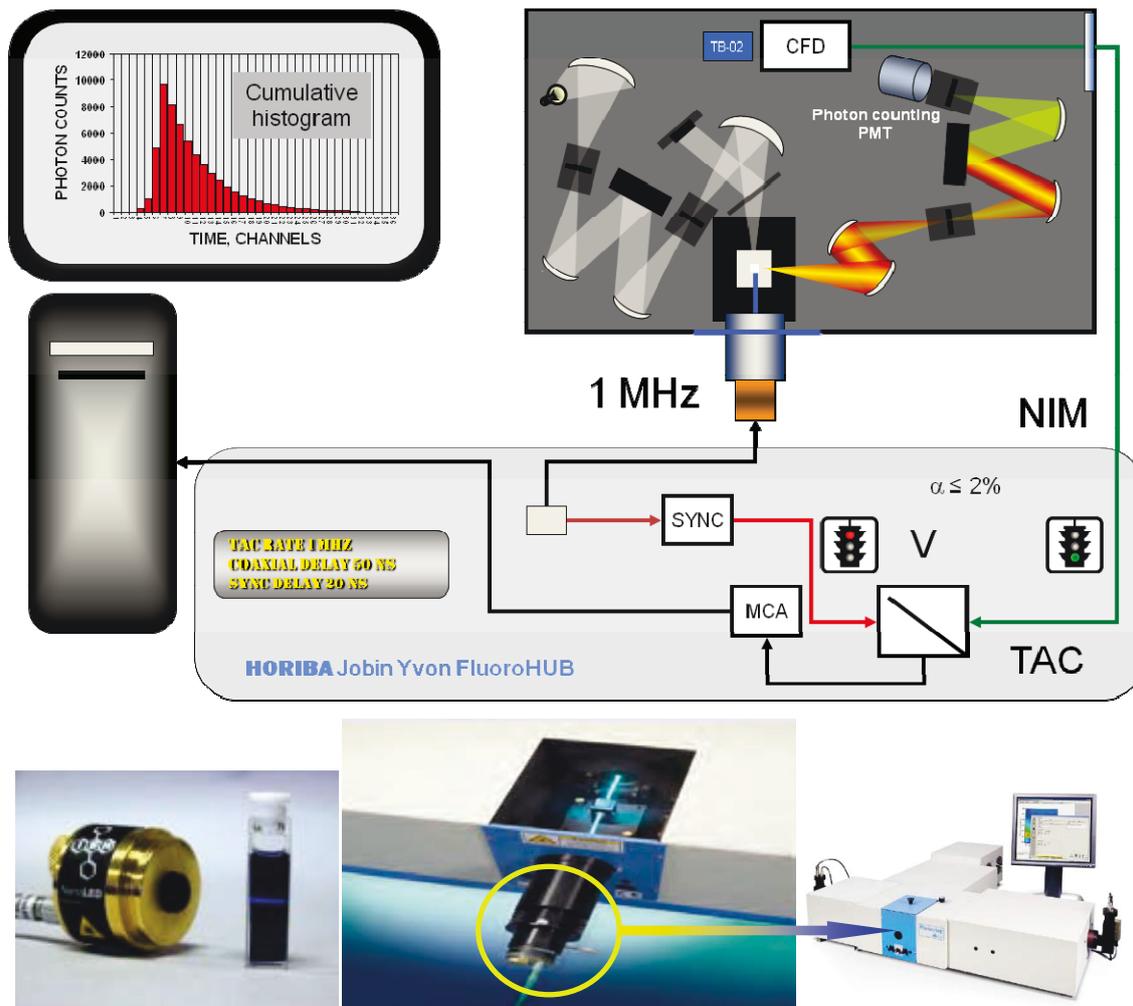
donde n es el índice de refracción del solvente puro empleado en cada una de las soluciones. Estas medidas requieren, como mencionamos más arriba, que las soluciones sean ópticamente diluidas ($A_{\lambda_{exc}} \leq 0,1$) permitiendo, además, despreciar las diferencias entre los n del solvente puro y la solución.

3.3.1.2 EMISIÓN RESUELTA EN EL TIEMPO

Mientras que de las medidas de emisión en estado estacionario se obtiene información sobre los rasgos espectrales de la emisión (es decir, máximo de emisión, intensidad integrada, dependencia con la temperatura ó el solvente), de los experimentos de emisión resuelta en el tiempo se adquiere información cinética a una longitud de onda, normalmente la correspondiente al máximo de emisión.

Existen distintos métodos con los cuales es posible realizar medidas de la emisión resuelta en el tiempo que incluye a los de modulación de fase, los de excitación pulsada y los de conteo de fotones (Time Correlated single photon counting, TCSPC). La mayoría de las medidas realizadas en este trabajo de tesis se llevaron a cabo utilizando el método TCSPC cuya fuente de excitación fue un nanoled de 341 nm, en un sistema que se describe en el **Esquema 3.8**.

Para obtener información cinética a partir de la medida del decaimiento de una traza de emisión, es necesario que el ancho del pulso de excitación sea estable, reproducible y más corto que el tiempo de vida del estado excitado en estudio.



Esquema 3.8. Sistema óptico del equipo utilizado para los experimentos de emisión resuelta en el tiempo

Además, debe ser de energía suficiente como para generar una cantidad detectable de fotones emitidos, pero no tan elevada como para inducir eventos multifotónicos. También, la velocidad en la repetición del pulso de excitación debe ser lo suficientemente baja como para permitir un completo retorno, entre pulsos, al estado fundamental. La solución muestra, se coloca en una celda de cuarzo de calidad óptica. El detector está ubicado a 90° del haz de excitación y en el monocromador se selecciona la λ_{obs} . La señal de salida es promediada convenientemente con el fin de obtener una buena relación señal/ruido. La mayoría de las medidas de los tiempos de vida de un estado excitado involucran procesos de primer orden ó de pseudo-primer orden. Un proceso de estas características puede describirse con la **Ecuación 3.9**:

$$-\frac{d[*D]}{dt} = k[*D] \quad (\text{Ec. 3.9})$$

donde *D representa al estado excitado, $d[^*D]/dt$ su velocidad de desaparición y k es la constante de velocidad específica de primer orden en s^{-1} para la desaparición de *D . Cuando se monitorea la luminiscencia de *D , la señal de emisión es frecuentemente proporcional a la concentración de *D , $[^*D]$, es decir,

$$\text{velocidad de emisión de fotones} = -k_r[^*D] \quad (\text{Ec. 3.10})$$

donde ahora k_r es la constante de velocidad específica de emisión ó radiativa. La resolución de la **Ecuación 3.10** permite obtener la siguiente expresión:

$$[^*D] = [^*D]_0 e^{-kt} \quad (\text{Ec. 3.11})$$

donde $[^*D]_0$ es la $[^*D]$ inicial. En función de la **Ecuación 3.11** se espera que los decaimientos radiativos sean de tipo exponencial. El tiempo que debe transcurrir para que el número de moléculas excitadas disminuya desde *D_0 hasta $^*D_0/2$, se denomina tiempo de vida media ó $t_{1/2}$. En medidas de emisión, será el tiempo necesario para que la intensidad de emisión decaiga a la mitad. A pesar de que el $t_{1/2}$ se puede determinar fácilmente desde una traza del osciloscopio, este parámetro tiene una significancia teórica limitada. Una cantidad fundamental y de mayor significancia, es el tiempo de vida promedio en el cual el número de moléculas excitadas disminuye desde *D_0 hasta $^*D_0/e$. A este parámetro se lo denomina usualmente como τ . Así, cuando la intensidad de la emisión alcance un valor de $1/e$ de su valor inicial, el tiempo de vida de la luminiscencia será el τ_{emi} (**Ecuación 3.12**) y por lo tanto, en una situación donde el radiativo sea el único camino de desactivación, se puede establecer que,

$$\tau_{\text{emi}} = \frac{1}{k_r} \quad (\text{Ec. 3.12})$$

Un ejemplo de las trazas obtenidas para determinar los tiempos de vida de las especies estudiadas se puede ver en el **Esquema 3.9**, los cuales se logran por medio del programa *Data Station* y se procesan con el software *DAS6*.

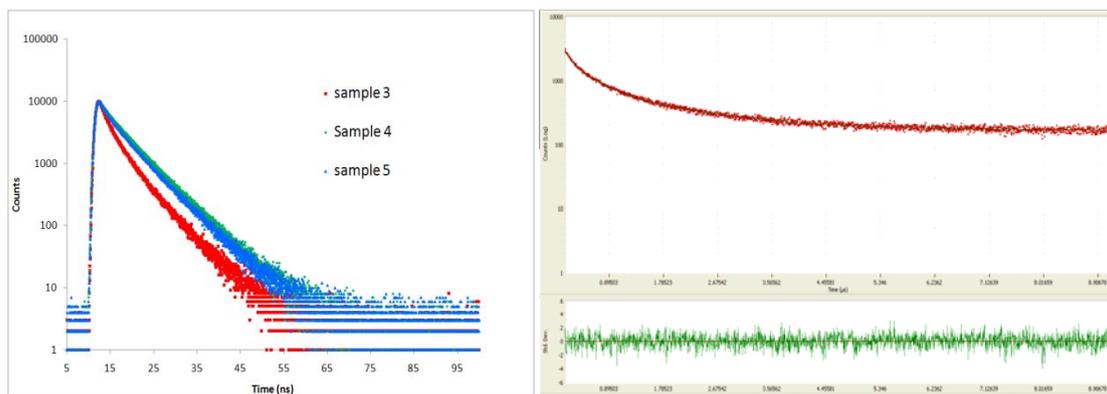


Figura 3.2. Ejemplo de los datos obtenidos para las medidas de fluorescencia resuelta en el tiempo con *Data Station* (figura izquierda) y procesados con *DAS6* (Figura derecha)

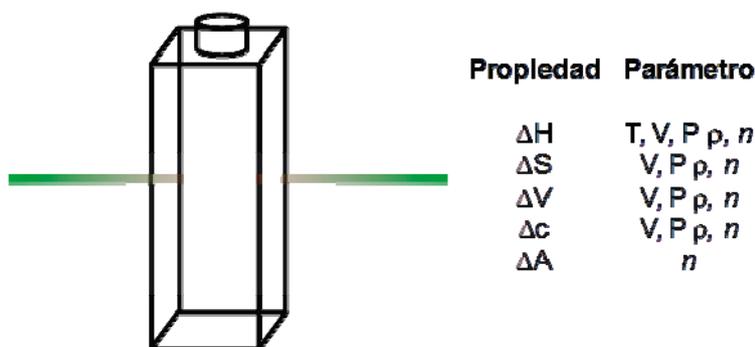
3.3.2 MÉTODOS FOTOTÉRMICOS

Los métodos fototérmicos están siendo empleados actualmente en diferentes áreas de la investigación, que van desde la ciencia de los materiales hasta el monitoreo ambiental. Así pues, las implementaciones de estas técnicas son tan diversas como los campos de aplicación. En esta sección se describirán las recientes aplicaciones relacionadas con métodos resueltos en el tiempo en fotoquímica y fotobiología.⁹⁷

Cuando los métodos fototérmicos se empezaron a utilizar en estudios fotoquímicos y fotobiológicos, su relevancia y su potencial estaban, en gran medida, por determinarse y su confiabilidad aún estaba bajo una intensa evaluación a medida que se seguían tratando nuevos métodos y aplicaciones basadas en efectos fototérmicos.⁹⁷ El énfasis de este capítulo se centrará principalmente sobre la calidad de la información que se puede obtener de los experimentos. Más de 20 años después de los primeros estudios en este campo,⁹⁸⁻¹⁰¹ los métodos fototérmicos están siendo usados de manera confiable para cuantificar los parámetros termodinámicos y las constantes de velocidad de reacciones iniciadas por luz, ya sea por fotorreacciones directas o por cambios ambientales inducidos por luz (por ejemplo, saltos de pH), con cinéticas comprendidas en un amplio rango de escalas temporales, extendiéndose desde los picosegundos a algunos milisegundos.¹⁰²⁻¹⁰⁶ Estos parámetros no se obtienen usando otros métodos espectroscópicos y, con

respecto a esto, los métodos fototérmicos son esenciales para terminar de entender los mecanismos y la redistribución de energía entre los pasos de los procesos fotoinducidos.

Un hecho particularmente fascinante ha sido el uso de métodos fototérmicos para determinar cambios de volumen resueltos en el tiempo durante reacciones fotoiniciadas,⁹⁸ lo que nos permite, por ejemplo, “escuchar” el movimiento de las proteínas durante sus funciones en una escala de tiempo entre picosegundos y milisegundos.^{102,105-106} Ahora, el reto es relacionar los parámetros medidos (**Esquema 3.9**) con cantidades físicas y químicas fundamentales e interpretarlas en el contexto molecular.¹⁰⁷⁻¹⁰⁹



Esquema 3.9. Propiedades principales de los efectos fototérmicos y los correspondientes parámetros monitoreados por métodos fototérmicos. Los símbolos usados se representan como: T , temperatura; V , volumen; P , presión; H , entalpía; S , entropía; ρ , densidad; n , índice de refracción; c , concentración molar; A , absorbancia.

Los métodos fototérmicos son un grupo de procedimientos que fueron desarrollados, y siguen siendo ampliamente usados, para medir absorción óptica,¹⁰⁰ pero con el potencial de permitir el acceso a una variedad de parámetros termodinámicos y cinéticos para los eventos iniciados en una muestra por absorción de luz. La base del término general “*fototérmico*” para estas técnicas proviene de la detección de la relajación térmica del exceso de energía asociado con la fotoexcitación de la muestra. Es de remarcar que esta terminología, que respeta antecedentes históricos, probablemente no es del todo correcta ya que muchos de los efectos detectados en la fotobiología moderna y en aplicaciones fotoquímicas no son de origen térmico.^{102,106} Los cambios de volumen se basan en la onda de presión detectada por fotoacústica resuelta en el tiempo y estos cambios de volumen pueden ser tanto de origen térmico como no térmico. Las técnicas de lente fototérmica, deflexión de haz y

de rejilla detectan cambios en el índice de refracción provenientes de cambios en la densidad (resultantes de un cambio en el volumen tanto de origen térmico como estructural), en la absorbancia (a través de la relación Kramers-Kroning) y en la temperatura. Cuando la energía de la luz es absorbida y subsecuentemente disipada como calor sin ningún otro efecto (cambios de volumen estructural e índice refractivo debido a absorción transitoria), el resultado es el calentamiento de la muestra. Este calentamiento lleva a un cambio de temperatura así como también a cambios en los parámetros termodinámicos de la muestra los cuales están relacionados con la temperatura. Las medidas de temperatura, presión o cambios en la densidad que ocurren debido a la absorción óptica, son actualmente la base de todos los métodos espectroscópicos fototérmicos. La existencia de señales de origen no térmico superpuestas sobre aquellas originadas a partir de cambios entálpicos es una posible fuente de complejidad para el análisis de los datos. Sin embargo, en lugar de ser una desventaja, esto ha resultado ser una característica única de estos métodos, lo que en principio produce una gran cantidad de información que no se podría obtener de otra manera. El precio a pagar es que el análisis de datos en los experimentos modernos es a menudo más complicado de lo que solía ser en las etapas tempranas del desarrollo de las técnicas y, en muchos casos, requiere aproximaciones complejas. Sin embargo, en cierto número de situaciones de interés práctico, el análisis de datos se puede simplificar realizando algunas suposiciones simples. Los cambios de volumen de origen no térmico podrían reflejar varios posibles efectos, tales como cambios en el número de cargas en solución, cambios en el momento dipolar de los solutos, cambios en la interacción entre moléculas de soluto y solvente, y cambios en la concentración de un componente en particular, entre otros. A continuación, nos referiremos a estos cambios de volumen como cambios de volumen estructural, independientemente del mecanismo específico que les subyace. La magnitud de los cambios de volumen molecular y su injerencia en la generación de la señal, se espera sean relevantes para las reacciones fotoinducidas que implican un cambio en el número de moléculas de reactivos y productos o grandes cambios en las distribuciones de carga entre reactivos y productos.¹¹⁰⁻¹¹² Es en estos casos donde las contribuciones estructurales se deben tomar en cuenta al calcular los

cambios entálpicos, que de otra manera se verán afectados por errores sistemáticos.

Los métodos fototérmicos con alta resolución temporal que se han desarrollado hasta ahora son principalmente adecuados para estudios de muestras líquidas, pero las técnicas de lentes y de rejilla transitoria son, en principio, aplicables a muestras sólidas ópticamente transparentes. Podemos dividir los métodos fototérmicos en dos grupos principales de acuerdo a los parámetros que están siendo monitoreados: los métodos optoacústicos están basados en la detección de la onda de presión generada en solución por los cambios volumétricos posteriores a los cambios térmicos o estructurales inducidos por la absorción de luz; los métodos de rejilla y lentes detectan cambios en el índice de refracción de una solución debido a los cambios térmicos, volumétricos o de absorbancia inducidos por la absorción de luz.

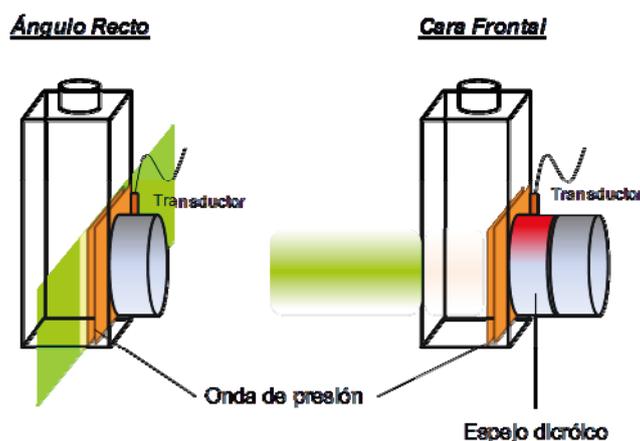
Los métodos fototérmicos son usualmente aplicados usando fuentes de luz láser. El alto poder y pureza espectral y el perfil espacial del haz, permiten obtener señales más intensas que con fuentes de luz convencional. Finalmente, el corto tiempo de duración de los pulsos de la luz láser permite tiempos de resolución por debajo de la escala de los picosegundos, lo cual no se puede conseguir con fuentes convencionales de arco pulsado.

En los últimos diez años se han publicado varias reseñas relacionadas con los principios y las aplicaciones de métodos fototérmicos en fotoquímica y fotobiología demostrando el interés en estos métodos. La exhaustiva reseña realizada por Braslavsky y Heibel¹⁰² se mantiene como la piedra angular cuando hay que referirse a las aplicaciones de los métodos fototérmicos en fotoquímica y fotobiología. Después de esta reseña, aparecieron muchas otras tratando las aplicaciones a sistemas supramoleculares,¹⁰⁵ fotosíntesis¹¹³⁻¹¹⁵ y diferentes moléculas biológicas.^{106,116-117}

A continuación se describirán las técnicas fototérmicas resueltas en el tiempo usadas principalmente en fotoquímica y fotobiología.

3.3.2.1 ESPECTROSCOPIA FOTOACÚSTICA RESUELTA EN EL TIEMPO

La espectroscopía fotoacústica resuelta en el tiempo inducida por láser (PAS por sus siglas en inglés), también conocida como espectroscopía optoacústica inducida por láser (LIOAS por sus siglas en inglés), monitorea los cambios de presión inducidos en una muestra líquida posteriores a la excitación con un láser pulsado (comúnmente nanosegundos).^{102,118} la evolución en el tiempo del pulso de presión es monitoreado por rápidos transductores piezoeléctricos, frecuentemente ubicados en un plano paralelo a la dirección del haz láser (arreglo de ángulo recto; **Esquema 3.10**).¹⁰⁰⁻¹⁰² También es muy usada la geometría de cara frontal (**Esquema 3.10**), especialmente con muestras de elevada absorción. Este arreglo consiste de un espejo dicróico ubicado entre la cubeta y el transductor para evitar señales generadas por absorción directa de la luz incidente por la superficie del transductor.¹¹⁹⁻¹²³

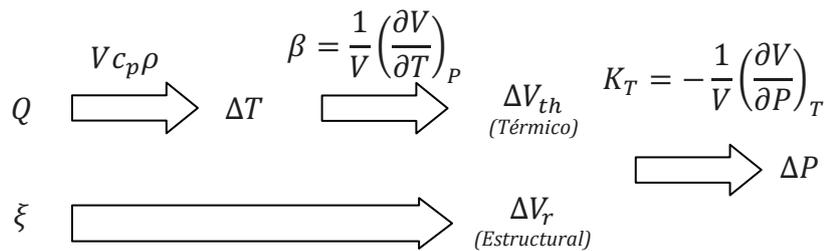


Esquema 3.10. Comparación de la generación de la señal fotoacústica a partir de las geometrías en ángulo recto (Izquierda) y cara frontal (derecha). En la geometría de ángulo recto, el camino del haz (en verde) está conformado por una ranura para obtener un frente de onda acústica plano.

3.3.2.1.1 Descripción de la generación de la señal fotoacústica

Como lo propusieron por primera vez Callis *et al.*,⁹⁸ los pulsos de presión en la muestra iluminada, provienen de los cambios de volumen producidos por relajación no radiativa (ΔV_{th}) y rearrreglos estructurales a nivel molecular (ΔV_r). La relajación en reacciones fotoiniciadas se origina tanto por el decaimiento no radiativo de los estados excitados como por el calor liberado (cambio de entalpía), incluyendo el calor involucrado en el rearrreglo del solvente

(Esquema 3.11). Los cambios en el volumen estructural reflejan el movimiento de las moléculas excitadas y/o del solvente circundante en respuesta a eventos tales como el cambio de momento dipolar, transferencia de carga y fotoisomerización. Recientemente se han desarrollado aproximaciones teóricas para entender mejor la generación de la señal fotoacústica y tener en cuenta tanto arreglos experimentales (cara frontal y ángulo recto) como la cinética de relajaciones no radiativas.^{121-122,124-125}



Esquema 3.11. Los cambios entálpicos (calor, Q) se convierten a cambios en la temperatura a través de la capacidad calórica ($VC_p\rho$), y a cambios de volumen en la solución a través del coeficiente de expansión isobárica (β). ξ representa todos los reordenamientos moleculares, atómicos y electrónicos del soluto y de las moléculas de solvente que conducen a un cambio de volumen estructural. Los cambios de presión provenientes de las variaciones volumétricas son mediados por la compresibilidad isotérmica (K_T).

Usando una aproximación heurística, los cambios de presión total pueden ser expresados como^{102,105,126}

$$\Delta P = -\frac{1}{K_T} \left(\frac{\Delta V}{V} \right)_T = -\frac{1}{K_T} \left(\frac{\Delta V_{th} + \Delta V_r}{V} \right)_T \quad (\text{Ec. 3.13})$$

Donde ΔP es el cambio de presión, V el volumen iluminado y K_T la compresibilidad isotérmica. Una señal eléctrica se produce en el transductor la cual es proporcional al cambio de presión.

La señal también está relacionada linealmente con la cantidad de fotones absorbidos, n_{abs} :

$$n_{\text{abs}} = \frac{N_{\text{ph}}}{N_A} (1 - 10^{-A}) \quad (\text{Ec. 3.14})$$

Donde A es la absorbancia de la solución a la longitud de onda de excitación λ , N_A la constante de Avogadro y N_{ph} el número de fotones incidentes. La señal total para la muestra, H^S , está dada por:

$$H^S = kn_{abs}^S \left(\alpha \frac{\beta}{C_p \rho} E_\lambda + \Delta V_e \right) \quad (\text{Ec. 3.15})$$

Donde $E_\lambda = N_A hc / \lambda$ es la energía de un mol de fotones de longitud de onda λ (= 1 Einstein), $\alpha = Q/E_\lambda$ es la fracción de la energía absorbida, E_λ , liberada como calor, Q , ΔV_e es el cambio de volumen estructural por cada Einstein absorbido, C_p es la capacidad calorífica a presión constante, ρ la densidad y β el coeficiente cúbico de expansión térmica de la solución. Para soluciones diluidas, estas propiedades son las mismas del solvente. Se debe tener en cuenta que ΔV_e y Q son cantidades molares calculadas por mol de fotones absorbidos. Para obtener α y ΔV_e , la constante instrumental (k) se debe determinar por comparación de la señal de la muestra con aquella correspondiente a la señal calorimétrica, es decir, un sistema el cual libere toda la energía absorbida como calor en un tiempo más corto que la respuesta instrumental. Vale la pena recordar que la constante instrumental (k) es inversamente proporcional a la compresibilidad isotérmica (κ_T). Los compuestos que trabajan como referencias calorimétricas son sustancias que no presentan ni fluorescencia ni muestran transientes con tiempos de vida más largos que unos pocos nanosegundos, son fotoquímicamente estables y son 100% eficientes en entregar la energía absorbida al medio como calor cuando las moléculas excitadas regresan a sus estados fundamentales. No deberían exhibir efectos de desnaturalización multifotónica o del estado fundamental por acción de la fluencia del láser usado en el experimento. Se han identificado varios compuestos referencia tanto para soluciones acuosas como para solventes orgánicos.^{102,127} Se debe tener mucho cuidado de no usar sustancias con bajos coeficientes de extinción a la longitud de onda de excitación ya que se necesitarían altas concentraciones (mM a M) de estos, lo cual podría afectar el coeficiente de expansión térmico. De esta manera se podrían introducir errores sistemáticos en los datos y llevar a determinaciones erróneas de los

cambios entálpicos y volumétricos.¹²⁸⁻¹²⁹ La referencia calorimétrica y la solución muestra deben ser medidas bajo condiciones experimentales idénticas, es decir, igual solvente, temperatura, longitud de onda de excitación y geometría. La señal para la referencia calorimétrica está dada por

$$H^R = kn_{\text{abs}}^R \frac{\beta}{C_P \rho} E_\lambda \quad (\text{Ec. 3.16})$$

En el caso de que productos permanentes o especies transitorias que se caractericen por tener tiempos de vida mayores a los 10 μs sean los únicos productos de la fotorreacción, las amplitudes de las señales fotoacústicas sirven para determinar el calor liberado y los cambios de volumen estructural aplicando la **Ecuación 3.17** (obtenida a partir de la relación entre las **ecuaciones 3.15** y **3.16**), relacionando las amplitudes de las señales LIOAS de fluencia normalizada para la muestra y para la referencia, H_n^S y H_n^R , respectivamente.

$$\frac{H_n^S}{H_n^R} = \alpha + \frac{\Delta V_e C_P \rho}{E_\lambda \beta} \quad (\text{Ec. 3.17})$$

3.3.2.1.2 Separación del calor liberado y del cambio de volumen estructural

Esta separación entre la disipación de calor y los términos estructurales se logra por la medida de la señal como función de la relación $C_P \rho / \beta$.^{98,102,126} En solución acuosa, $C_P \rho / \beta$ depende fuertemente de la temperatura (eso se debe principalmente a los cambios en β). Así, la separación de las contribuciones térmicas y volumétricas se obtiene mediante la realización de mediciones a diferentes temperaturas en un rango relativamente pequeño cercano a la temperatura ambiente. La relación $(C_P \rho / \beta)_T$ para el agua pura se obtiene de valores tabulados. En particular, $\beta_{\text{H}_2\text{O}} = 0$ a 3,9 °C ($T_{\beta=0}$), mientras que es positivo por encima y negativo por debajo de esta temperatura. A $T_{\beta=0}$ el calor liberado no da lugar a ninguna señal. Esta característica en particular permite la evaluación directa de la existencia de cambios en el volumen estructural. Para soluciones acuosas de sales u otros aditivos a concentraciones mM o mayores,

$(C_p\rho/\beta)_T$ y $T_{\beta=0}$ se debe determinar por comparación de la señal obtenida para una referencia calorimétrica en el solvente de interés y en agua.¹⁰²

3.3.2.1.3 Cálculos calorimétricos

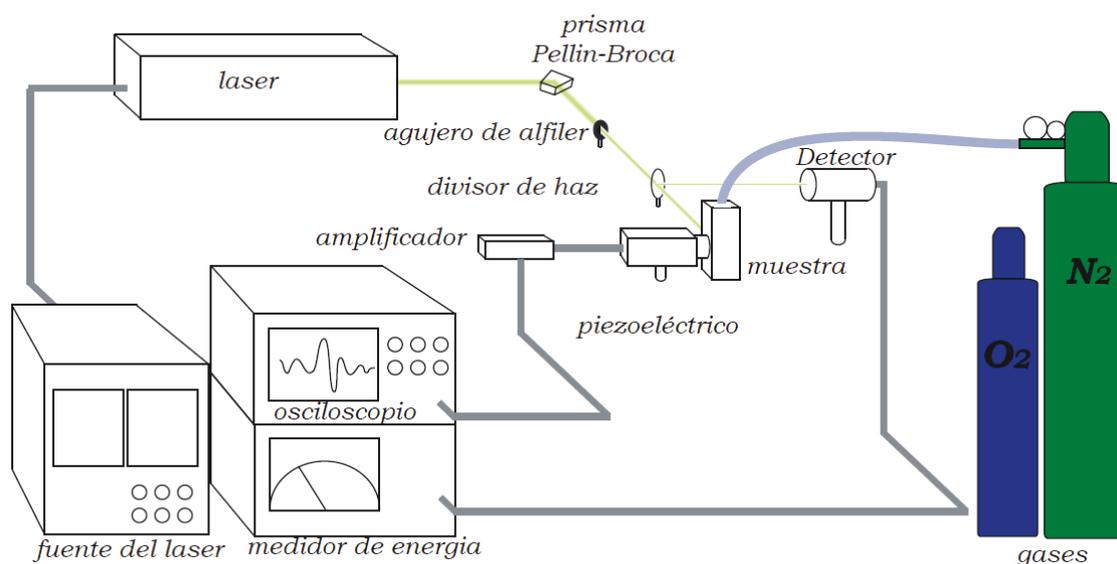
El calor liberado en cada etapa (Q_i) es interpretado en términos de los cambios de entalpía usando el balance de energía de la **Ecuación 3.6**,^{102,118} donde la energía de entrada (E_λ) es igual al total de la energía liberada como emisión (es decir, fluorescencia; Φ_i y E_λ son los rendimientos cuánticos de emisión y energía del estado emisor respectivamente; la fosforescencia no se tiene en cuenta) y el calor disipado (cambios en el contenido de energía de los estados excitados más la energía asociada con las interacciones soluto-solvente) en cada una de las etapas. $E_{\text{almacenada}}$ representa la energía acumulada en las especies que viven más tiempo que el de presión-integración del experimento.

$$E_\lambda = \phi_f E_f + \sum_i Q_i + E_{\text{almacenada}} \quad (\text{Ec. 3.6})$$

El análisis de la información calorimétrica requiere conocer el esquema de reacción y los parámetros asociados con el proceso tales como rendimientos cuánticos y niveles de energía derivados, por ejemplo, de medidas ópticas.

3.3.2.1.4 Detalles Instrumentales

Recientemente se han propuestos algunos modelos instrumentales, principalmente dirigidos a reducir el volumen de la muestra y a incrementar la sensibilidad. Como se mencionó anteriormente, las dos geometrías experimentales más comunes usadas en Espectrometría Fotoacústica pulsada son la de celda tradicional con detector piezoeléctrico acústicamente acoplado en dirección paralela al haz de excitación incidente, y en la cual nos concentraremos (**Esquema 3.12**) y, la desarrollada recientemente, irradiación de cara frontal con el detector piezoeléctrico acústicamente acoplado a un reflector dieléctrico normal al haz de excitación incidente.



Esquema 3.12. Descripción del equipo usado para medidas de LIOAS y, con mínimas variaciones, para determinación de producción de 1O_2 .

Como fuente de excitación (1 mm de diámetro en la celda), se usó un láser Nd:YAG Q-conmutado (7 ns fwhm) operando a 355 nm. Para detectar las señales acústicas, se utilizó un transductor piezoeléctrico casero de cerámica basado en PZT ($Pb[Zr_xTi_{1-x}]O_3$) (4 x 4 mm) con su respectivo amplificador. El tiempo de resolución de los experimentos, determinado por nuestra configuración experimental, fue de $\tau_R = 1 \mu s$. Las medidas fueron interpretadas promediando las señales acústicas generadas por 64 disparos del láser para una mejor relación señal-ruido. Los espectros UV-vis de las soluciones fueron chequeados antes y después de cada serie de irradiación láser. Como referencia calorimétrica se empleó 2-Hidroxibenzofenona.¹³⁰ Para los experimentos, las soluciones muestra y referencia se igualaron dentro de un 2% para valores de absorbancia entre 0,1 y 0,2 a la longitud de onda del láser. Los experimentos se realizaron bajo atmósfera controlada, burbujeando N_2 u O_2 a la solución por 15 min. En principio, todas las especies excitadas con tiempos de vida $\tau \leq 1/5\tau_R$ liberaron su calor como calor rápido, mientras que las especies excitadas con vida más larga que $5\tau_R$, es decir, con un tiempo de vida $\tau \geq 5\tau_R$, funcionan como depósitos de calor ($E_{almacenada}$) dentro del tiempo de resolución del experimento LIOAS.

4 CAPÍTULO I. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA Y COMPUTACIONAL DEL NUEVO COMPLEJO $\text{BU}_4\text{N}[(\text{BPY})\text{RE}(\text{CO})_3(\text{DCBPY})]$

4.1 RESUMEN

Un nuevo complejo de Re(I) con estructura zwitteriónica y soluble en agua, $\text{Bu}_4\text{N}[(\text{bpy})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dcbpy})]$ (donde Bu = butil; bpy = 4,4'-bipiridina; dcbpy = 2,2'-bipiridina-5-5'-dicarboxilato) se sintetizó exitosamente y se caracterizó por análisis elemental, ^1H NMR, FTIR y ESI. Los estudios de protonación de este complejo de Re(I) mostraron tres equilibrios ácido-base con un $\text{p}k_{\text{a}1} = 5.0$, un $\text{p}k_{\text{a}2} = 3.0$ y un $\text{p}k_{\text{a}3} = 2.0$. El $\text{p}k_{\text{a}1}$ fue asignado al equilibrio de protonación en bpy, mientras que $\text{p}k_{\text{a}2}$ y $\text{p}k_{\text{a}3}$ pudieron ser asignados a la protonación/desprotonación de los dos grupos carboxilatos del ligando dcbpy. Con la ayuda de cálculos TD-DFT se pudo identificar la naturaleza de las transiciones electrónicas responsables de los cambios observados por espectroscopía UV-Vis del complejo de Re(I) dependientes del pH. A pH = 7 la banda de menor energía del complejo tiene un carácter $\text{MLLCT}_{\text{Re}(\text{CO})_3\text{-dcbpy}}$ (transferencia de carga con contribución del metal y del ligando hacia el ligando), mientras que a pH < 2 esta cambia a $\text{MLLCT}_{\text{Re}(\text{CO})_3\text{-bpy}}$. Este cambio en la naturaleza de la banda de menor energía es responsable de los cambios espectrales en el rango de los 350-500 nm asociados a la protonación del complejo de Re(I).

4.2 INTRODUCCIÓN

Los complejos luminiscentes de metales de transición han sido usados como fotosensibilizadores en áreas como la conversión de energía solar, estudios de transferencia de electrones, sistemas quimio y electroluminiscentes, dinámicas de enlace de medios heterogéneos y sondas de estructura macromolecular.¹⁵ En este aspecto, la espectroscopía, fotoquímica y fotofísica de los complejos tricarbónílicos de Re(I)-diimina del tipo *fac*-ReX(CO)₃(α -diimina) continúan despertando enorme interés en su investigación desde que se empezaron a develar, a mediados de los 70's, las atractivas propiedades de sus estados excitados.¹³¹

Dependiendo de la naturaleza del ligando axial X, los complejos *fac*-ReX(CO)₃(α -diimina) pueden llegar a ser fuertes luminóforos tanto en soluciones fluidas como en vidrios a bajas temperaturas. Los estados excitados accesibles, transferencia de carga metal a ligando (MLCT) del Re(I) a la α -diimina, transferencia de carga metal-ligando a ligando (MLLCT), transferencia de carga ligando a ligando y/o estados excitados intraligando (IL), están generalmente relacionados con la luminiscencia observada en estos complejos a temperatura ambiente. Para la síntesis de los ligandos α -diimina se usó un diseño pertinente con el cual poder adecuar las propiedades fotoquímicas y fotofísicas de los complejos metálicos y así llegar a obtener fotosensibilizadores que puedan ser utilizados en un número amplio de áreas de investigación tales como estudios de transferencia electrónica¹³², conversión de energía solar^{9,133-134} y catálisis¹³⁵. También se están presentando posibles aplicaciones como sensores luminiscentes¹³⁶⁻¹³⁸, materiales moleculares para óptica no lineal¹³⁹⁻¹⁴⁰ o interruptores ópticos.¹⁴¹ En particular, los complejos luminiscentes de Re(I) y Ru(II) con ligandos polipiridínicos han sido reconocidos como buenos candidatos para el desarrollo de dispositivos sensores de pH.¹⁴²⁻¹⁴⁴ Gracias a que estos complejos muestran un comportamiento excepcionalmente rico en sus estados excitados y en su química redox, así como también en su estabilidad térmica y fotoquímica,¹⁴⁵⁻¹⁴⁶ también están siendo usados como marcadores biológicos y como sondas no covalentes para iones y

biomoléculas.¹⁴⁷⁻¹⁴⁸ Además, existen posibles aplicaciones bioquímicas y técnicas basadas en la formación de aductos entre complejos metálicos de transición de Re(I) y macromoléculas biológicas como el ADN.^{85,149}

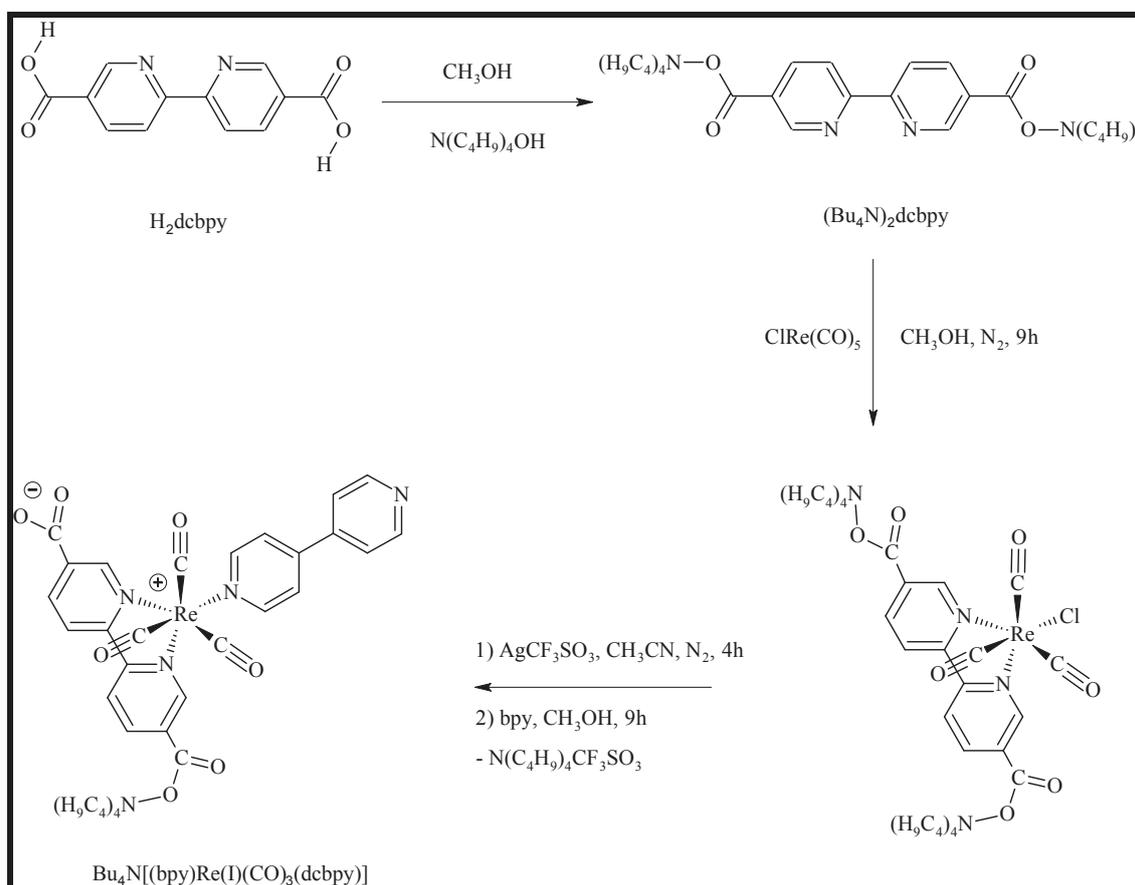
Una de las mayores desventajas de los complejos *fac*-ReX(CO)₃(α -diimina) cuando de acoplarlos a medios biológicos se trata, está relacionado con su característica baja solubilidad en agua a pH fisiológico. De hecho, hay un número limitado de estos complejos que son solubles en agua^{142,144,150-155} comparado con la gran cantidad de complejos tricarbónicos de Re(I)-diimina reportados como exclusivamente solubles en solventes orgánicos. En un trabajo previo, en nuestro grupo de investigación se ha caracterizado un complejo tricarbónico de Re(I) soluble en agua incluyendo en su estructura un ligando de relevancia biológica como es la pterina¹⁵⁵. En este capítulo se presenta la síntesis de un nuevo complejo tricarbónico de Re(I) coordinado al ligando 2,2'-bipiridina-5,5'-dicarboxilato (dcbpy) y soluble en agua. Este complejo, llamado Bu₄N[(bpy)Re(CO)₃(dcbpy)] (donde bpy = 4,4'-bipiridina) fue caracterizado por ¹H NMR, FTIR, ESI y análisis elemental. Tiene una estructura zwitteriónica donde las dos cargas negativas de los grupos carboxilato están balanceadas por las cargas positivas del átomo central de Re(I) y por la del catión tetrabutilamonio. Para completar la caracterización del complejo de Re(I), se llevó a cabo un estudio de la protonación de Bu₄N[(bpy)Re(CO)₃(dcbpy)] siguiendo los cambios del espectro UV-visible del mismo como función del pH en un rango entre pH = 1 y pH = 7. Con la ayuda de métodos quimiométricos, se pudieron obtener de los estudios de protonación tres valores de *pka* los cuales fueron asignados a la protonación de la bpy (*pka*₁ = 5.0) y al equilibrio ácido-base de los dos grupos carboxilato (*pka*₂ = 3.0 y *pka*₃ = 2.0). Los cálculos TD-DFT nos ayudaron a identificar la naturaleza de las transiciones electrónicas del complejo de Re(I) en solución acuosa. A pH neutro la banda de menor energía del complejo tiene un carácter MLLCT_{Re(CO)₃,dcbpy} mientras que a pH = 1 cambia a MLLCT_{Re(CO)₃,bpy}. Este cambio en la naturaleza de la banda de menor energía es el responsable de los cambios espectrales en el rango de los 350-500 nm asociados a de la protonación del complejo de Re(I).

4.3 MATERIALES Y MÉTODOS

Tanto metanol, etanol, éter etílico, iso-octano como acetonitrilo, todos grado HPLC (J.T. Baker, USA), fueron usados sin purificación adicional. El ácido 2,2'-bipiridina-5,5'-dicarboxílico (H_2dcbpy), 4,4'-bipiridina (bpy), NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , solución metanólica (1 M) de hidróxido de tetrabutil amonio (Bu_4NOH) y $ClRe(CO)_5$ fueron comprados a Sigma-Aldrich Chemical Co., USA con la pureza más alta disponible y usados tal como se recibieron. Se usó agua de muy baja conductividad (grado Mili-Q). Los Espectros UV-Vis fueron tomados en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1800. Las medidas de pH se realizaron con un pH-metro ADWA modelo AD8000 con electrodo de vidrio A1131B (rango de pH: 0-13). Los espectros FTIR se tomaron en un equipo Nicolet 8700 Thermo Scientific. Los espectros 1H NMR de las soluciones del complejo de Re(I) fueron medidas a 300 K con un espectrómetro Bruker AM-500 operando a 500 MHz con DMSO-D6 como solvente y los desplazamientos químicos fueron referenciados en relación con el $(CH_3)_2SO$ en $[D_6]DMSO$ ($\delta = 2.54$ ppm). Todas las soluciones se midieron en tubos de 5 mm de diámetro.

4.4 SÍNTESIS

Las estructuras químicas de los materiales usados en este trabajo y las rutas sintéticas están representadas en el **Esquema 4.1**. El complejo Re(I) dcbpy fue preparado basado en una modificación de procedimientos reportados para la síntesis de complejos de Re similares.^{142,151,154,156} Se pusieron 150 mg (6.1×10^{-4} mol) de H₂dcbpy, 85 mL de metanol y 1,35 mL ($1,35 \times 10^{-3}$ mol) de solución metanólica (1 M) de Bu₄NOH en un balón de fondo redondo de 100 mL. De esta manera, el H₂dcbpy, insoluble en un número considerable de solventes orgánicos,¹⁵⁴ fue fácilmente disuelto en metanol gracias a la formación de su respectiva sal de tetrabutilamonio, (Bu₄N)₂dcbpy.



Esquema 4.1. Reactivos y rutas sintéticas para la obtención de Bu₄N[(bpy)Re(CO)₃(dcbpy)]

La solución incolora resultante fue calentada a 70 °C. Posteriormente, se adicionaron lentamente 221 mg ($6,1 \times 10^{-4}$ mol) de ClRe(CO)₅ a la solución metanólica caliente y con agitación vigorosa constante. El líquido incoloro inicial pasó a rojo durante las 9 h en las que la mezcla de reacción estuvo en reflujo,

cubierto de la luz con papel metálico y en atmósfera de N₂. Se procedió a enfriar la solución a temperatura ambiente y a evaporarla hasta obtener unos 2 mL de una solución naranja de aspecto aceitoso. Esta última solución fue disuelta en acetonitrilo (220 mL) junto con 164.5 mg (6,1 x 10⁻⁴ mol) de AgCF₃SO₃. La mezcla se llevó a reflujo durante 4 h, a 70 °C, aislada de la luz con papel metálico y en atmósfera de N₂. Después de evaporar a sequedad la mezcla de reacción, el sólido marrón resultante fue suspendido en 60 mL de metanol y luego filtrado obteniendo como residuo un sólido oscuro el cual se lavó varias veces con metanol. A los aproximadamente 100 mL obtenidos como filtrado de solución metanólica de color rojo se le agregaron 952 mg (6,1 x 10⁻³ mol) de bpy. La mezcla resultante se llevó a reflujo durante 18 h, aislada de la luz, a 70 °C y en atmósfera de N₂. Después de evaporar la solución hasta sequedad, el sólido amarillo-naranja obtenido fue lavado repetidamente con éter etílico para eliminar el exceso del ligando bpy. El sólido resultante fue redisolto en un mínimo volumen de diclorometano y el complejo final fue precipitado por adición lenta de iso-octano frío. El proceso de recristalización se repitió hasta obtener un valor constante de coeficiente de absorción molar. El sólido amarillo obtenido se secó al vacío con un rendimiento de 500 mg (60%).

La confirmación de la obtención del complejo esperado se vio reflejada en los resultados del Análisis Elemental, los cuales están listados en la **Tabla 4.1**.

Tabla 4.1. Resultados calculados y medidos del Análisis Elemental para el complejo Bu₄N[(bpy)Re(CO)₃(dcbpy)].4H₂O

		Complejo	Bu ₄ N[(bpy)Re(CO) ₃ (dcbpy)].4H ₂ O
Análisis Elemental	Calculado	F.M.	C ₄₁ H ₅₈ N ₅ O ₁₁ Re
		C (%)	50.09
		H (%)	5.95
		N (%)	7.12
	Medido	C (%)	50.5 ± 0.3
		H (%)	6.0 ± 0.2
		N (%)	6.9 ± 0.3

4.5 ANÁLISIS ESI-MS

Este análisis se realizó en modo ión positivo usando un espectrómetro de masas BRUKER MICROTOF-Q II equipado con CID. La temperatura capilar fue 180 °C. Las soluciones stock del complejo fueron preparadas en metanol a una concentración 10^{-4} M. Las soluciones diluidas fueron preparadas a partir de las anteriores. Para evitar la descomposición (intercambio de ligandos y solvente) del complejo de Re(I) y para inducir la ionización de analitos neutros se usó electrospray de alto flujo con una descarga en corona ubicada en la punta del capilar de electrospray¹⁵⁷⁻¹⁵⁹. Cada experimento se repitió por lo menos tres veces con el fin de asegurar reproducibilidad. Los espectros fueron obtenidos y analizados con el programa Thermo XcaliburQual Browser en el Centro de Investigaciones en Hidratos de Carbono (CIHIDECAR-CONICET) perteneciente a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires.

4.6 ESTUDIOS DE PROTONACIÓN Y ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICOS

Los valores de pK_a para este complejo se determinaron por valoración espectrofotométrica dependiente del pH empleando buffer $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (0.1 M c/u). En cada experimento, 50 ml de solución del complejo de Re(I) ($[\text{Re}] = 3 \times 10^{-5}$ M), con un pH inicial de 6.7, fueron llevados a pH = 7 por adición de NaOH 3M. Después de esto, el pH se disminuyó gradualmente hasta pH = 1 por adición de HClO_4 en alícuotas de 50 o 100 μL tomando simultáneamente el espectro de absorción de cada solución. El proceso resultó ser reversible, de modo que pudo revertirse, de pH 1 a pH 7, adicionando alícuotas de 50 ó 100 μL de NaOH 3M. Cuando fue necesario, las absorbancias fueron corregidas por medio de los respectivos factores de dilución. También usamos técnicas quimiométricas¹⁶⁰ con el fin de obtener, a partir de la matriz de absorbancia, los perfiles de concentración y los espectros de cada una de las especies contribuyentes¹⁶¹⁻¹⁶². Estos métodos pueden ser aplicados a datos de espectroscopía bilineal de reacciones químicas los cuales nos pueden brindar información acerca de los cambios composicionales dados en un sistema en desarrollo.

En este aparte se usó el algoritmo de los mínimos cuadrados alternantes o ALS, por sus siglas en inglés, para estimar simultáneamente concentraciones y perfiles espectrales.¹⁶³ El algoritmo ALS extrae información útil de la matriz de datos experimentales $\mathbf{A}(i \times j)$ gracias a la aplicación repetitiva del siguiente producto de matriz: $\mathbf{A} = \mathbf{C}\mathbf{S}^T + \mathbf{E}$ donde $\mathbf{C}(i \times n)$ es la matriz para los perfiles de concentración; $\mathbf{S}^T(n \times j)$ es quien contiene los perfiles espectrales y $\mathbf{E}(i \times j)$ representa la matriz de error. Los índices i , n y j demuestran el muestreo de pH's, especies absorbentes y longitudes de onda medidas, respectivamente. Resolver la matriz \mathbf{A} podría llegar a ser una tarea bastante difícil¹⁶⁴ ya que, por una parte, n es usualmente desconocida¹⁶⁵ y, por otra parte, los métodos de resolución por curva no pueden arrojar un resultado simple debido a las ambigüedades rotacionales y de escala.¹⁶⁶ Hemos aplicado el Análisis de

Factores y la Descomposición en Valores Singulares de la matriz experimental para la estimación de n . Para reducir las ambigüedades rotacionales usamos algunas restricciones químicamente relevantes¹⁶⁷ tales como la no negatividad y la unimodalidad de los perfiles.¹⁶⁸

4.7 DETALLES COMPUTACIONALES

La estructura electrónica del complejo tricarbónico de Re(I) fue determinada usando herramientas DFT¹⁶⁹⁻¹⁷¹ implementadas en el paquete Gaussian 09¹⁷², usando el funcional híbrido de tres parámetros desarrollado por Becke¹⁷³ en conjunto con el potencial de intercambio LYP¹⁷⁴ (B3LYP), con el conjunto de bases LanL2DZ el cual usa el conjunto de bases Dunning D95V C, N, O, H¹⁷⁵ y Los Alamos ECP plus DZ en Re.¹⁷⁶⁻¹⁷⁸ Las frecuencias vibracionales fueron computadas al mismo nivel de la teoría para confirmar que estas estructuras eran mínimos sobre las superficies de energía. Las energías de transición vertical fueron calculadas a la geometría del estado fundamental optimizado usando TD-DFT¹⁷⁹⁻¹⁸¹ al mismo nivel de la teoría para los cuatro estados de protonación de los complejos de Re(I). Tanto las geometrías optimizadas como los cálculos de las transiciones electrónicas fueron realizados incluyendo los efectos del solvente (agua) con la ayuda del modelo continuo polarizable¹⁸²⁻¹⁸⁴ tal y como se implementó en el paquete Gaussian 09 para producir un número de 80 transiciones singlete-singlete.

4.8 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.8.1 CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA

El complejo de Re fue obtenido con un buen rendimiento y se caracterizó por análisis elemental, FTIR, ^1H NMR y espectrometría de masas de ionización por electrospray. La presencia de dos bandas intensas de absorción que se pueden observar en la región de los $2050\text{-}1880\text{ cm}^{-1}$ reveló que el espectro IR de la sustancia es consistente tanto con la configuración facial de los ligandos carbonilo como con el grupo de simetría al cual pertenece (C_s). De acuerdo con reportes previos de compuestos similares, la banda intensa a altas frecuencias (por los 2019 cm^{-1}) se le puede atribuir al modo $1A'$ (estiramiento en fase totalmente simétrico de los tres ligandos CO) mientras que las bandas restantes a frecuencias intermedias y bajas (1915 y 1890 cm^{-1}) se pueden asignar a los modos $2A'$ (estiramiento totalmente simétrico fuera de fase) y A'' (estiramiento asimétrico de los ligandos CO ecuatoriales).^{143,155,185} La presencia del Bu_4N^+ en la estructura del complejo está sustentada por las frecuencias a 1344 y 2963 cm^{-1} lo que corresponde a la vibración de estiramiento C-H del CH_3 y por aquella a 1624 cm^{-1} que indica flexión y estiramiento de los grupos amonio cuaternarios¹⁸⁶. La banda ancha a 3415 cm^{-1} es indicativa del estiramiento $-\text{OH}$ debido a la presencia de moléculas de agua cristalizada.

Los espectros de ^1H NMR muestran, entre otras, las dos típicas señales doblete de bpy a δ 8,74 y 7,85 ppm que, acorde a la literatura,²² pueden ser asignadas a H_δ y H_γ respectivamente. Las señales ^1H NMR correspondientes a los 6H del anillo dcbpy y a los 4H (H_α y H_β) del anillo bpy aparecieron como una banda amplia y de mala resolución en el rango de $\delta = 8,43 - 9,40$ ppm y no pudo ser asignada inequívocamente a la estructura del complejo de Re(I). Las señales del ligando Bu_4N^+ fueron detectadas a $\delta = 3,13 - 1,54$ y $1,27$ ppm para cada metilen y $\delta = 0,88$ ppm correspondiente al grupo metil. La relación de integración en superficie entre las señales H_δ : H_γ : $\text{N}-(\text{CH}_2)_4$ - fue 1:1:4.

La **Figura 4.1** muestra el espectro de masa ESI en modo ión positivo del $\text{Bu}_4\text{N}[(\text{bpy})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dcbpy})]$, (M), en metanol. El ión molecular intacto del complejo, M, fue detectado en forma protonada $[\text{M} + \text{H}^+]$ y sodiada $[\text{M} + \text{Na}^+]$ a $m/z = 912,33$ y $m/z = 934,31$ respectivamente. Además, el complejo de Re con un Bu_4N^+ adicional, es decir $[\text{M} + \text{Bu}_4\text{N}^+]$, se observó a $m/z = 1153,61$. Adicionalmente, las señales observadas a $m/z = 693,03$ y $m/z = 715,01$ corresponden a $[\text{M} - \text{Bu}_4\text{N}^+ + \text{Na}^+]$ y $[\text{M} - \text{Bu}_4\text{N}^+ + 2\text{Na}^+]$ respectivamente. Se tomaron espectros MS-MS. La señal más intensa producida por fragmentación de $m/z = 934,31$ fue observada a $m/z = 796,25$.

Por otra parte, los espectros ESI fueron tomados después de la adición de Bu_4NPF_6 a la solución metanólica del complejo de renio. En este experimento las señales detectadas con mayor intensidad fueron $m/z = 1153,61$; $m/z = 968,88$ (grupo de 4 Bu_4N^+) y $m/z = 934,31$.

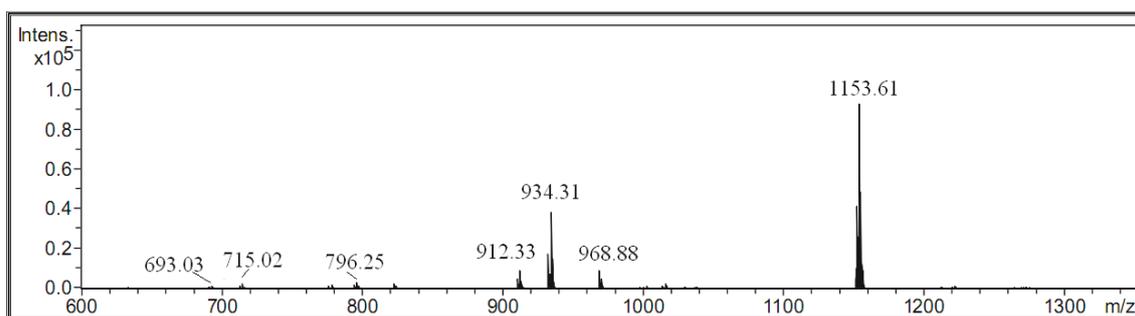


Figura 4.1. Espectro de masas ESI modo ion positivo del complejo $\text{Bu}_4\text{N}[(\text{bpy})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dcbpy})]$ en MeOH.

La señal más intensa fue observada a $m/z = 1153,61$ y corresponde a la fórmula química de $\text{C}_{57}\text{H}_{86}\text{O}_7\text{N}_6\text{Re}$. Como se dijo antes, esta señal corresponde al complejo de Re con un Bu_4N^+ adicional. Los estudios por Análisis Elemental y ^1H NMR mostraron que el complejo tiene en su estructura solo una unidad Bu_4N^+ . Las especies detectadas por ESI-MS a $m/z = 1153,61$ se podrían haber formado en la solución debido a un intercambio del catión Bu_4N^+ entre dos moléculas del complejo antes de que se diera la ionización como se muestra en el siguiente esquema reacción.



4.8.2 ESPECTROSCOPIA UV-VIS

Los espectros Uv-vis de $\text{Bu}_4\text{N}[(\text{bpy})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dcbpy})]$ se midieron en una solución buffer de $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ a temperatura ambiente y las valoraciones se llevaron a cabo por adición de HClO_4 para poder observar los diferentes cambios espectrales (ver **Figura 4.2**).

El espectro de absorción de $\text{Bu}_4\text{N}[(\text{bpy})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dcbpy})]$ en soluciones neutras, es decir, a $\text{pH} = 7$, consiste de cuatro bandas de absorción fuertes ($\epsilon \sim 2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) ubicadas a $\lambda_{\text{max}} = 251, 290, 316$ y 332 nm y una de mediana intensidad ($\epsilon \sim 3 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) que aparece como un hombro ubicada $\sim 362 \text{ nm}$. En medio ácido ($\text{pH} = 1$) la banda a $\lambda_{\text{max}} = 290 \text{ nm}$ se desplaza a los 295 nm y experimenta un aumento en su intensidad comparada con la solución neutra, mientras que las bandas a $251, 316$ y 332 nm apenas experimentan algún corrimiento aunque sí sufren un incremento notable en su intensidad. En el caso del hombro de baja energía se puede observar un corrimiento hacia los 376 nm a pH ácido. En los espectros UV-vis del complejo de $\text{Re}(\text{I})$ se encontró un comportamiento reversible de protonación/desprotonación en función del pH por adición de HClO_4 desde $\text{pH} = 7$ hasta $\text{pH} = 1$. Estos cambios espectrales son reversibles por adición de NaOH desde $\text{pH} = 1$ hasta $\text{pH} = 7$.

La **Figura 4.2** muestra los cambios espectrales observados entre $\text{pH} 7 =$ y $\text{pH} = 4$, región en la cual los cambios espectrales fueron muy moderados. Sin embargo, sí se pudieron identificar 3 puntos isobésticos a $242, 287$ y 314 nm . Los cambios espectrales observados entre $\text{pH} = 4$ y $\text{pH} = 1$ (**Figura 4.2 b**) fueron más notables que aquellos entre $\text{pH} = 7$ y $\text{pH} = 4$. Entre $\text{pH} = 2,8$ y $\text{pH} = 1$, se pudo identificar un punto isobéstico a 285 nm , mientras que a pH 's intermedios, es decir, entre $\text{pH} = 3$ y $\text{pH} = 4$, no se presentaron puntos isobésticos. Este comportamiento indica la presencia de varias especies protonadas/desprotonadas en equilibrios simultáneos. Por lo tanto, decidimos aplicar técnicas quimiométricas en el análisis de la matriz completa de los espectros UV-vis de la **Figura 4.2 a y b** para conseguir una estimación de los valores de pK_a para los correspondientes equilibrios ácido/base. Tanto el Análisis de Factores como la Descomposición en Valores Singulares (SVD) se

usaron para la estimación del número de contribuciones independientes obteniendo un número de 4. La aproximación de Proyección Ortogonal fue usada para obtener estimaciones iniciales de los espectros correspondientes a las especies contribuyentes.¹⁸⁷

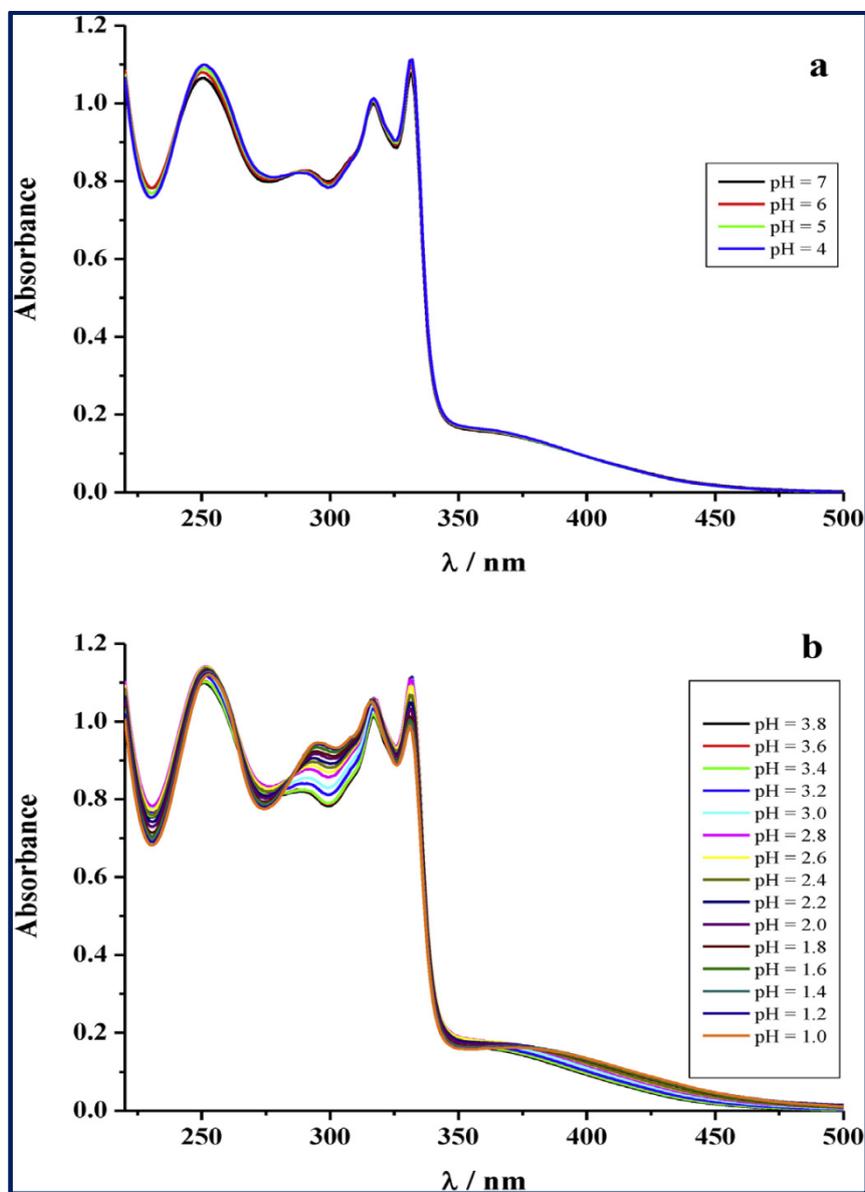


Figura 4.2. Cambios espectrales UV-vis experimentados por el complejo $\text{Bu}_4\text{N}[(\text{bpy})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dcbpy})]$ en estudios de protonación. **a.** Cambios espectrales en el rango de pH 4-7. **b.** Cambios espectrales en el rango de pH 3,8-1. Ver texto para más detalles

Las formas espectrales, obtenidas por el método de Resolución Multivariado de Curvas por Mínimos Cuadrados Alternados (MCR-ALS), de las cuatro especies se muestran en la **Figura 4.3** donde también se pueden ver las funciones de distribución para las cuatro especies sobre todo el rango de pH estudiado. De esta figura se logran obtener tres valores de pK_a , ellos son 2,0; 3,0; y 5,0. De acuerdo a los reportes en la literatura, se supone que el nitrógeno libre

piridínico de los ligandos bpy coordinados es más básico que los sustituyentes carboxilato ubicados en los ligandos dcbpy coordinados. Por ejemplo, se encontró que la disociación de los protones carboxílicos del ácido 2,2'-bpy-4,4'-dicarboxílico en complejos de Ru(II) ocurre en dos pasos con un pK_{a1} ubicado entre 2,8 y 3; y un pK_{a2} en el rango de 1,5 – 1,8¹⁸⁸⁻¹⁸⁹ mientras que para el ácido 2,2'-bpy-5,5'- dicarboxílico en complejos de Ru(II) se identificó un solo $pK_a \sim 2,8$.¹⁸⁸

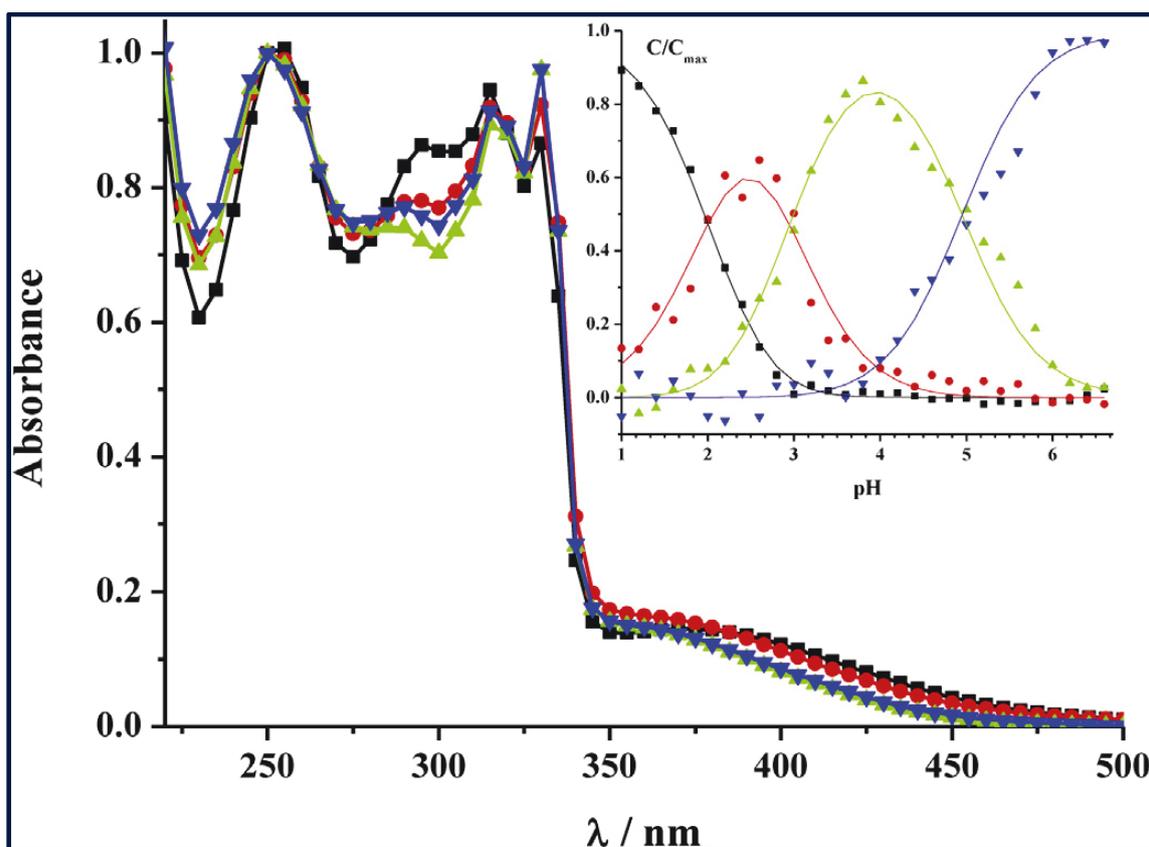


Figura 4.3. Perfiles espectrales y funciones de distribución obtenidos de los análisis quemométricos de las figuras a y b para las especies dependientes del pH del complejo de Re(I): (ReL) (▼), (ReL)H (▲), (ReL)H₂⁺ (●) y (ReL)H₃²⁺ (■).

Por otro lado, el pK_a de disociación del protón en complejos heterolépticos de Ru(II) coordinando al ligando bpy, fue reportado como 4,5.¹⁹⁰ Basados en lo anterior, los tres valores de pK_a obtenidos para $Bu_4N[(bpy)Re(CO)_3(dcbpy)]$ pueden ser asignados a la protonación del ligando bpy ($pK_{a1} = 5,0$) y al equilibrio ácido/base de los dos grupos carboxilato ($pK_{a2} = 3,0$ y $pK_{a3} = 2,0$). Los tres valores de pK_a obtenidos de este modo para el $Bu_4N[(bpy)Re(CO)_3(dcbpy)]$ coinciden con los valores de pK_a reportados para $[(bpy)Re(CO)_3(\text{ácido } 2,2'\text{-bpy-4,4'-dicarboxílico})]CF_3SO_3$.¹⁵¹

4.8.3 CÁLCULOS DFT Y TD-DFT

Recientemente, se han realizado cálculos de las propiedades de los estados fundamentales y de los estados excitados de una serie de complejos tricarbónicos de Re(I) utilizando la Teoría del Funcional de la Densidad (DFT) y la Teoría del Funcional de la Densidad Dependiente del Tiempo para interpretar las bandas de absorción experimentales provenientes del conjunto de transiciones MLCT, LLCT e IL.¹⁹¹⁻¹⁹⁹

4.8.3.1 CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL

La geometría del estado fundamental optimizada (detalles en sección 4.7) se muestra en la **Figura 4.4** para el complejo básico (desprotonado), es decir, $[(bpy)Re(CO)_3(dcbpy)]^-$. El ión Re(I) se encuentra en un ambiente octaédrico ligeramente distorsionado. Las longitudes de enlace, como se muestra en la **Tabla 4.2**, están dentro de los rangos normales encontrados en complejos de Re(I) relacionados.^{22,155,191,194,196,200} La bipyridina planar substituida coordinada al metal que define el plano ecuatorial actúa como un ligando bidentado [$d(Re-N) = 2.176 \text{ \AA}$, $\angle (N-Re-N) = 75,7^\circ$].

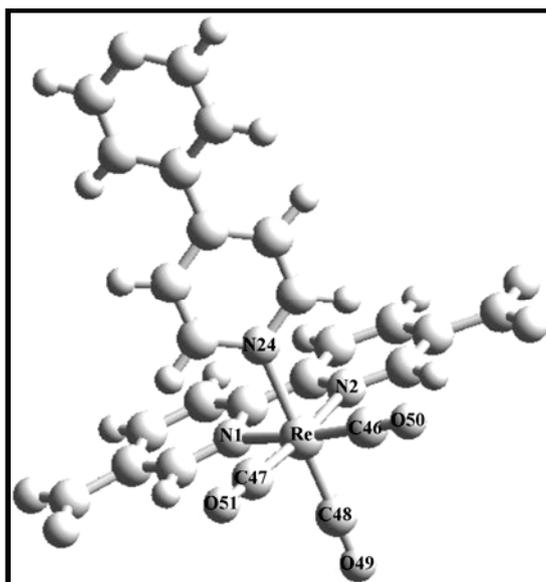


Figura 4.4. Estructura molecular de $[(bpy)Re(CO)_3(dcbpy)]^-$ obtenida por cálculos DFT etiquetado con algunos de los átomos más relevantes que aparecen en la **Tabla 4.2**.

Dos grupos CO están ubicados en posición *cis* a este plano [distancias Re-C de 1,926 y 1,925 Å]. Las posiciones apicales octaédricas están ocupadas por un tercer grupo CO [d(Re-C) 1,924 Å] y una molécula bpy [d(Re-N) = 2,228 Å]. Las longitudes de enlace Re-N son siempre más largas que las de Re-C, siendo la Re-N(bpy) la más larga de todas. Los enlaces Re-(CO) están casi perpendiculares entre ellos [ángulos OC-Re-CO en el rango de los 89,1 - 90,4°]. La geometría optimizada del estado fundamental para el complejo completamente protonado, es decir, [(Hbpy)Re(CO)₃(H₂dcbpy)]²⁺ (no se muestra), es similar a la del [(bpy)Re(CO)₃(dcbpy)]⁻, excepto por un pequeñísimo incremento en la longitud de enlace en Re-N y Re-C (Tabla 4.2). En el complejo completamente protonado, el incremento en las distancias Re-N(dcbpy) (relativo al complejo desprotonado) viene acompañado de una disminución en el ángulo Re(I)-dcbpy mientras que el alargamiento en Re-N24 siempre lleva a un aumento en los ángulos N1-Re-N24 y N2-Re-N24.

Tabla 4.2: Longitudes (Å) y ángulos de enlace (°) calculados por DFT alrededor del ión Re en [(bpy)Re(I)(CO)₃(dcbpy)]⁻, (ReL)⁻, y [(Hbpy)Re(I)(CO)₃(H₂dcbpy)]²⁺, (ReL)H₃²⁺.

	(ReL) ⁻	(ReL)H ₃ ²⁺
Longitudes de enlace (Å)		
Re-N1	2.176	2.182
Re-N2	2.178	2.184
Re-N24	2.228	2.231
Re-C46	1.926	1.926
Re-C47	1.925	1.927
Re-C48	1.924	1.929
Ángulos de enlace (°)		
N1-Re-N2	75.7	75.4
N1-Re-N24	84.6	85.1
N1-Re-C46	172.6	172.9
N1-Re-C47	97.6	97.9
N1-Re-C48	92.6	92.5
N2-Re-N24	84.9	85.5
N2-Re-C46	97.5	97.9
N2-Re-C47	172.9	173.1
N2-Re-C48	92.2	92.1
C46-Re-N24	92.1	92.1
C46-Re-C47	89.1	88.6
C46-Re-C48	90.4	90.1
C47-Re-N24	92.2	92.1
C47-Re-C48	90.3	90
C48-Re-N24	176.4	177

4.8.3.2 ESPECTROSCOPIA IR Y UV-VIS

La geometría optimizada del estado fundamental de $[(bpy)Re(CO)_3(dcbpy)]^-$ se usó para calcular las frecuencias de modo normal las cuales fueron comparadas con las frecuencias IR experimentales observadas para $Bu_4N[(bpy)Re(CO)_3(dcbpy)]$ en la región de estiramiento CO. Las frecuencias IR calculadas coinciden en buena medida con los valores experimentales. Por ejemplo, la frecuencia IR calculada por el modo $1A'$, $1977,3\text{ cm}^{-1}$, se compara con la experimental, 2019 cm^{-1} , con un desplazamiento de $\Delta = (v_{\text{exp}} - v_{\text{calc}}) = 41,7\text{ cm}^{-1}$. Por los modos $2A'$ y $2A''$, los valores predichos son $1889,6\text{ cm}^{-1}$ y 1883 cm^{-1} respectivamente, los cuales pueden ser comparados con las frecuencias IR experimentales, 1915 cm^{-1} ($\Delta = 25,4\text{ cm}^{-1}$) y 1890 cm^{-1} ($\Delta = 7\text{ cm}^{-1}$) respectivamente.

Los cálculos teóricos obtenidos de la literatura han mostrado que el orbital molecular más alto ocupado (HOMO) en complejos *fac*- $ReX(CO)_3(\alpha\text{-diimina})$ corresponde a un orbital principalmente localizado en Re con alguna deslocalización en torno a ligandos X. Esta deslocalización también da cuenta de la mezcla de los estados IL y MLCT. Por otro lado, el orbital molecular desocupado más bajo (LUMO) está localizado exclusivamente sobre el ligando $\alpha\text{-diimina}$.¹⁸⁵ Los resultados calculados por TD-DFT están resumidos y comparados con los datos experimentales en la **Tabla 4.3** para las cuatro especies protonadas del complejo de Re(I): $[(bpy)Re(CO)_3(dcbpy)]^-$, **(ReL)⁻**; $[(Hbpy)Re(CO)_3(dcbpy)]$, **(ReL)H**; $[(Hbpy)Re(CO)_3(Hdcbpy)]^+$, **(ReL)H₂⁺** y $[(Hbpy)Re(CO)_3(H_2dcbpy)]^{2+}$, **(ReL)H₃²⁺**. Se observó que las principales características espectrales (las cuatro absorciones intensas UV y el hombro UV-vis menos intenso) para **(ReL)⁻**, **(ReL)H**, **(ReL)H₂⁺** y **(ReL)H₃²⁺** están predichas por cálculos TD-DFT con gran precisión tanto en posición como en intensidades relativas. De aquí en adelante se comparan los resultados TD-DFT para **(ReL)⁻** y **(ReL)H₃²⁺**, ya que las especies intermedias protonadas, es decir, **(ReL)H** y **(ReL)H₂⁺**, muestran un comportamiento similar. Para **(ReL)⁻** los principales HOMO's involucrados en las transiciones electrónicas más intensas son H-12 (un orbital π deslocalizado entre el Re(I) y el ligando bpy), H-10 (un

orbital molecular del anillo exterior de la molécula bpy), H-9 (un orbital π deslocalizado en el ligando dcbpy), H-8 (un orbital σ deslocalizado en el plano ecuatorial de los enlaces del Re(I)) y H-6 y H-7 (orbital π de los enlaces Re-C). Por otra parte, los principales LUMO's de **(ReL)⁻** son L y L+2 (orbitales π^* del ligando dcbpy), L+1 (orbital π del ligando bpy) y L+4 (orbital π de los tres CO). Los cálculos TD-DFT predicen que la banda de más baja energía de **(ReL)⁻**, alrededor de los 360 nm y estimada a 371 nm, es de naturaleza MLCT con la mayoría de la densidad electrónica transferida desde los enlaces Re-C hasta la parte dcbpy de la molécula (**Figura 4.5**). Ya que H-6 y H-7 consisten principalmente de orbitales π de los enlaces Re-C, esta transición electrónica de baja energía no es una transición MLCT pura y debería ser vista mejor como una transición MLLCT_{Re(CO)₃_dcbpy} (es decir, una transición CT deslocalizada Re(CO)₃→dcbpy). La banda de mayor energía de **(ReL)⁻**, observada a 252 nm y predicha a 255nm, consiste principalmente de transiciones electrónicas intraligando de bpy con algunas contribuciones del centro Re(I). La banda a 332 nm, predicha a 327 nm, es principalmente MLLCT_{Re(CO)₃_bpy}. Para la especie totalmente protonada, **(ReL)H₃²⁺**, los HOMO's relevantes involucrados en las transiciones electrónicas más intensas son H y H-1 (orbitales π deslocalizados entre los enlaces Re-C), H-2 (un orbital σ deslocalizado entre los enlaces re-C y Re-N(dcbpy)), H-3 y H-6 (orbitales π deslocalizados en el ligando dcbpy) y H-7 y H-8 (orbitales π deslocalizados sobre el ligando bpy). Además, los principales LUMO's de **(ReL)H₃²⁺** son L, L+2 y L+3 (orbitales π^* deslocalizados sobre el ligando dcbpy), L+1 (un orbital π^* deslocalizado en el ligando bpy) y L+6 y L+9 (orbitales π^* centrados en los tres CO). Cálculos TD-DFT predicen que la banda de más baja energía de **(ReL)H₃²⁺**, alrededor de los 371 nm y predicha a 389 nm, es de carácter MLLCT_{Re(CO)₃_bpy}. Esta observación contrasta con la predicción para la banda de menor energía para **(ReL)⁻**, la cual es de naturaleza MLLCT_{Re(CO)₃_dcbpy} (**Figuras 4.5 y 4.6**). La banda de mayor energía de **(ReL)H₃²⁺**, observada a 253 nm y predicha a 257 nm, es casi una transición electrónica intraligando pura de bpy con una menor contribución de dcbpy (la contribución del centro Re(I), la cual estuvo presente en la transición electrónica a 252 nm en **(ReL)⁻**, ha desaparecido aquí). Las bandas a 295, 316 y 331 nm, predichas a 296,6; 317 y 329 nm,

respectivamente, son una mezcla de transiciones MLLCT_{Re(CO)₃-dcbpy} e intraligando de dcbpy.

Tabla 4.3. Comparación de los datos de absorción experimentales con los calculados por TD-DFT para (ReL)⁻, (ReL)H, (ReL)H₂⁺ y ReLH₃²⁺.

Especie	λ_{obs}/nm ($\epsilon/10^3 M^{-1} cm^{-1}$)	λ_{calc}/nm (f_{osc})	Transición electrónica (% coeficientes)
(ReL) ⁻	252 (34.5)	255.51 (0.544)	H-12 → L+1 (94%)
		258.53 (0.094)	H-8 → L+4 (36%), H-6 → L+10 (12%), H-13 → L+1 (9%), H-8 → L+3 (4%)
	293 (27.4)	273.39 (0.056)	H-11 → L+1 (19%), H-4 → L+3 (19%), H-3 → L+3 (13%), H-8 → L+2 (6%)
		290.26 (0.063)	H-8 → L+4 (14%), H-7 → L+2 (43%), H-7 → L+6 (19%), H-9 → L (3%)
	317 (33.3)	314.47 (0.155)	H-10 → L+1 (44%), H-9 → L (30%), H-8 → L+1 (18%)
		314.69 (0.245)	H-10 → L+1 (26%), H-9 → L (57%), H-8 → L+1 (7%), H-7 → L+2 (4%)
	332 (35.9)	327.33 (0.160)	H-6 → L+1 (75%), H-7 → L+1 (6%), H-5 → L+1 (5%), H-3 → L+1 (5%)
		337.31 (0.065)	H-6 → L+1 (12%), H-5 → L+1 (26%), H-3 → L+1 (26%), H-2 → L+1 (29%)
	361 (5.2)	370.77 (0.079)	H-6 → L (82%), H-7 → L (9%), H-3 → L (3%), H-2 → L (3%)
	(ReL)H	252 (36.6)	243.24 (0.078)
250.61 (0.071)			H-14 → L (72%)
259.00 (0.202)			H-12 → L (91%)
264.49 (0.252)			H-11 → L (86%)
293 (27.1)		265.31 (0.11)	H-7 → L+5 (14%), H-6 → L+4 (22%), H-6 → L+5 (10%), H-6 → L+8 (13%)
		265.86 (0.057)	H-7 → L+4 (21%), H-8 → L+3 (9%)
		288.99 (0.089)	H-10 → L (25%), H-8 → L+6 (10%), H-6 → L+3 (20%), H-6 → L+8 (15%)
		317 (33.8)	314.89 (0.392)
331 (37.0)		365.71 (0.085)	H-7 → L+1 (91%)
361 (5.4)		410.98 (0.152)	H-7 → L (94%)
(ReL)H ₂ ⁺	252 (38.0)	250.90 (0.087)	H-6 → L+6 (31%), H-6 → L+8 (35%)
		259.22 (0.36)	H-10 → L (58%), H-3 → L+7 (10%)
		259.33 (0.083)	H-9 → L (62%)
		259.59 (0.066)	H-9 → L (15%), H-4 → L+3 (37%)
	293 (29.5)	263.39 (0.061)	H-5 → L+5 (13%), H-4 → L+4 (10%), H-4 → L+9 (11%), H-3 → L+6 (15%)
		263.65 (0.057)	H-8 → L (75%)
		271.00 (0.052)	H-8 → L (15%), H-6 → L+2 (14%)
		301.59 (0.112)	H-5 → L+2 (13%), H-4 → L+2 (47%)
	317 (35.3)	317.28 (0.255)	H-6 → L+1 (36%), H-3 → L+2 (37%), H-1 → L+2 (12%)
		320.12 (0.126)	H-6 → L+1 (15%), H-1 → L+2 (73%)
328.65 (0.098)		H-6 → L+1 (34%), H-3 → L+2 (54%)	
360 (6.0)		389.75 (0.051)	H-5 → L+1 (65%), H-4 → L+1 (30%)
		412.78 (0.199)	H-3 → L (89%)
(ReL)H ₃ ²⁺	253 (37.3)	252.36 (0.07)	H-8 → L+1 (69%)
		254.09 (0.06)	H-3 → L+2 (69%)
		257.41 (0.45)	H-7 → L+1 (73%)
		259.11 (0.11)	H-2 → L+9 (15%), H-1 → L+5 (19%), H → L+9 (18%)
	295 (31.5)	260.12 (0.06)	H-6 → L+1 (76%)
		263.90 (0.06)	H-2 → L+6 (20%), H-1 → L+6 (12%), H-1 → L+7 (23%)
		295.59 (0.26)	H-3 → L (12%), H-1 → L+3 (15%), H → L+3 (41%)
		316 (35.0)	317.33 (0.26)
	331 (32.9)	329.27 (0.10)	H-3 → L (38%), H-1 → L+2 (43%)
	371 (5.4)	388.74 (0.17)	H-1 → L+1 (22%), H → L+1 (75%)
		451.72 (0.06)	H-1 → L (27%), H → L (71%)

Del análisis anterior, es evidente que la protonación de $(\text{ReL})^-$ para llegar a $(\text{ReL})\text{H}_3^{2+}$, mueve la transición MLLCT $_{\text{Re}(\text{CO})_3\text{-bpy}}$ desde 327 nm (predicha para $(\text{ReL})^-$) hasta 389 nm (predicha para $(\text{ReL})\text{H}_3^{2+}$).

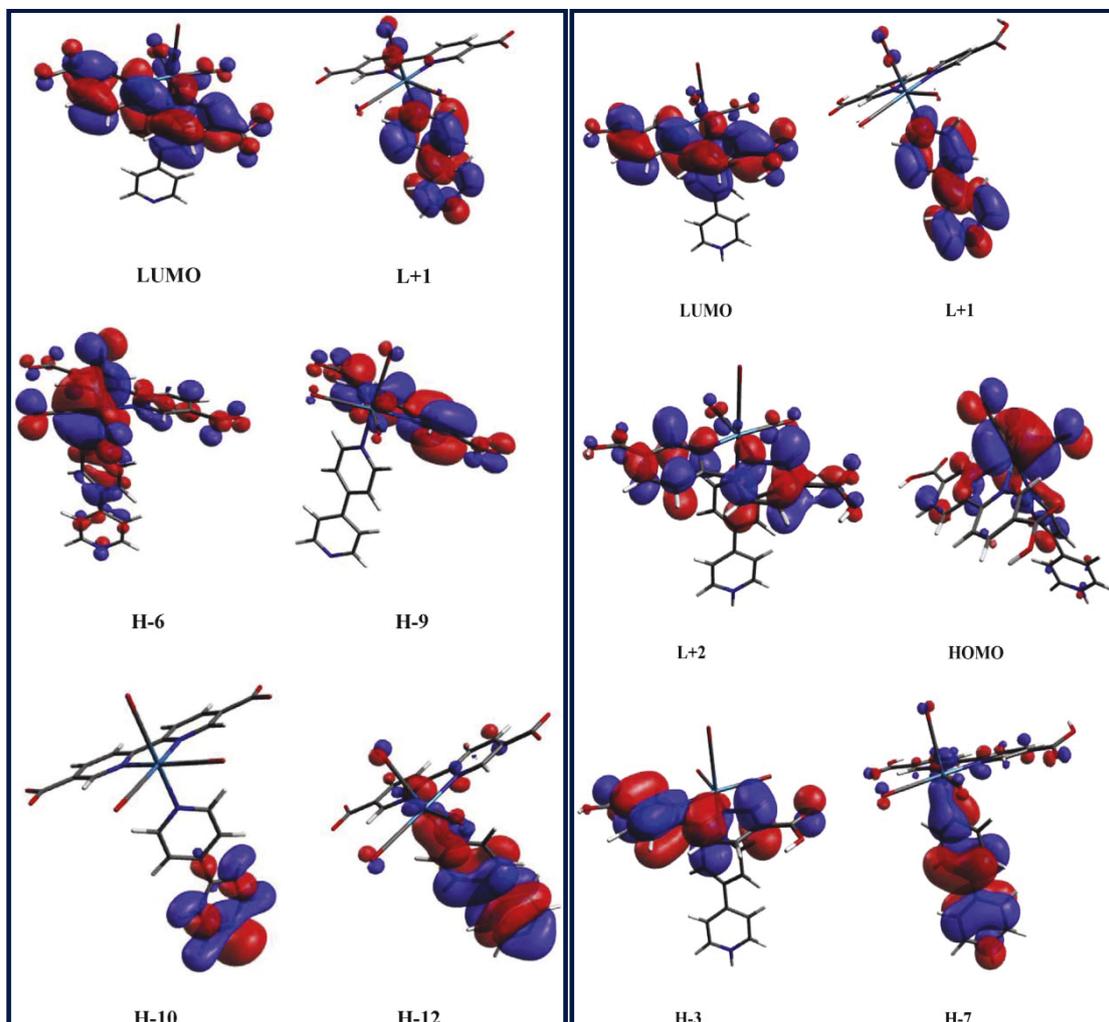


Figura 4.5. Diagramas de orbitales moleculares para el complejo $(\text{ReL})^-$. H-6 y LUMO son los orbitales moleculares que más contribuyen al espectro electrónico en la transición de menor energía ($\lambda_{\text{max}} = 361$ nm), mientras que los orbitales L+1, H-9, H-10 y H-12 son los orbitales moleculares que más contribuyen al espectro electrónico en el rango de los 220 - 350 nm.

Figura 4.6. Diagrama de orbitales moleculares para el complejo $(\text{ReL})\text{H}_3^{2+}$. HOMO y L+1 son los orbitales moleculares que más contribuyen al espectro electrónico en la transición de menor energía ($\lambda_{\text{max}} = 371$ nm), mientras que los orbitales LUMO, L+2, H-3 y H-7 son los orbitales moleculares que más contribuyen al espectro electrónico en el rango de los 220-350 nm.

Los espectros electrónicos calculados de $(\text{ReL})^-$, $(\text{ReL})\text{H}$, $(\text{ReL})\text{H}_2^+$ y $(\text{ReL})\text{H}_3^{2+}$ fueron simulados a partir de los resultados teóricos para facilitar su comparación con los datos experimentales. La simulación fue realizada con las siguientes funciones²⁰¹:

$$I(E) = \frac{1}{\pi} \sum_1 \frac{\sigma \cdot f_i}{\sigma^2 + (E - \varepsilon_i)^2} \quad (\text{Ec. 4.1})$$

donde I es la intensidad del pico en el espectro a una energía dada E , ε_i es la energía calculada de las transiciones electrónicas. Ante la falta de bases teóricas, σ se utiliza a menudo como un parámetro ajustable. Las simulaciones se muestran en la **Figura 4.7** donde se comparan con los espectros de las especies contribuyentes a los de los cambios espectrales en los estudios de protonación (**Figura 4.3**). La comparación es bastante satisfactoria y los espectros simulados de $(\text{ReL})^-$, $(\text{ReL})\text{H}$, $(\text{ReL})\text{H}_2^+$ y $(\text{ReL})\text{H}_3^{2+}$ siguen aproximadamente la tendencia de los cambios espectrales de la **Figura 4.2** en la región UV-vis.

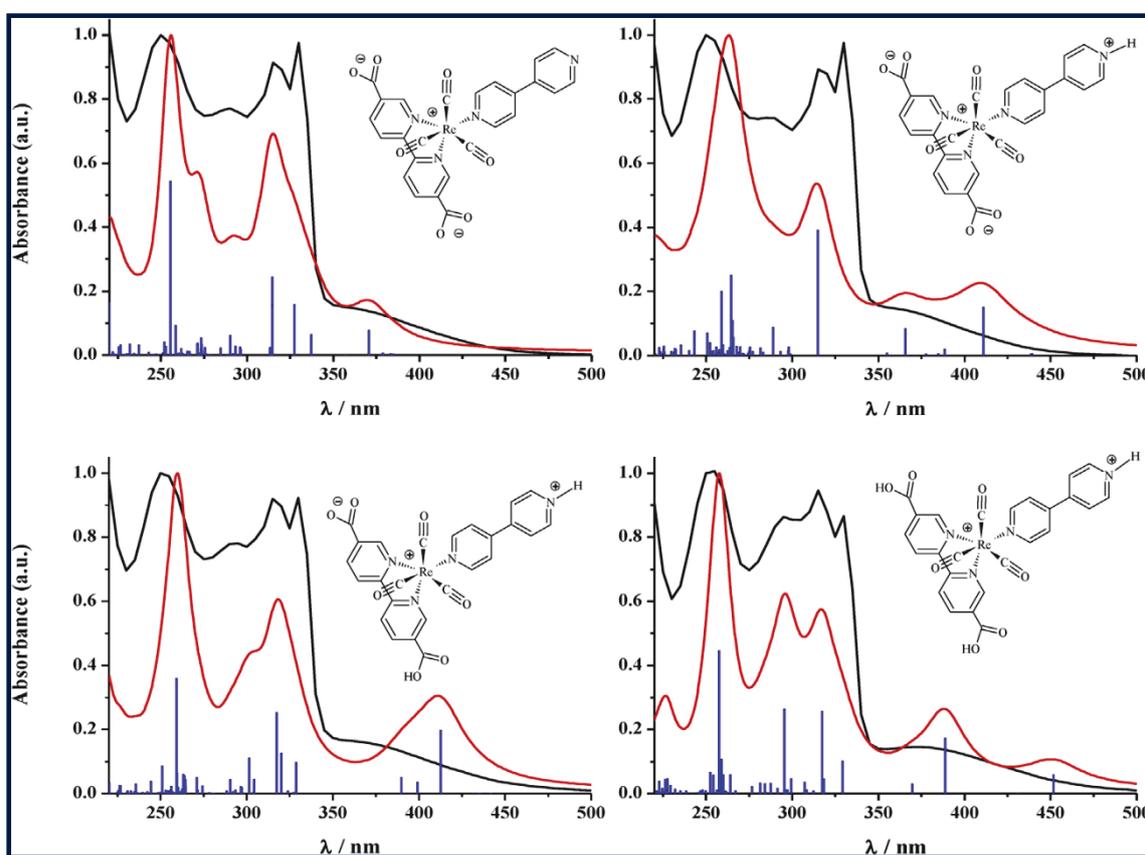


Figura 4.7. Comparación de los perfiles espectrales para las cuatro especies obtenidos de los análisis quemométricos de los cambios espectrales UV-vis de las figuras **a** y **b** (líneas negras) con las transiciones electrónicas calculadas por TD-DFT (líneas azules) y los espectros simulados (líneas rojas) para $(\text{ReL})^-$, $(\text{ReL})\text{H}$, $(\text{ReL})\text{H}_2^+$ y $(\text{ReL})\text{H}_3^{2+}$.

Por otra parte, el desplazamiento de la banda de menor energía, desde ~ 362 nm a pH neutro hasta 376 nm a pH = 1 (**Figura 4.2 b**) coincide con el cambio en la naturaleza de la banda de menor energía (predicha por cálculos TD-DFT) desde la transición $\text{MLLCT}_{\text{Re}(\text{CO})_3\text{-dcbpy}}$ en $(\text{ReL})^-$ ($\lambda_{\text{max}} = 371$ nm) hasta la $\text{MLLCT}_{\text{Re}(\text{CO})_3\text{-bpy}}$ en $(\text{ReL})\text{H}_3^{2+}$ ($\lambda_{\text{max}} = 389$ nm). Es de destacar que el ancho de banda, σ , fue escogido para ajustar aproximadamente los picos de absorción

en la región de los 250-350 nm por las energías calculadas. Con este valor de σ , se observó una razonable concordancia entre la teoría y los resultados observados en esta región de longitudes de onda aunque también se encontró una coincidencia menor en la región de la banda de menor energía ($\lambda > 350$ nm). Al elegir un valor de σ mayor, se puede alcanzar una mejor concordancia en la región de la banda de menor energía pero perdiendo la sincronía relativamente buena entre los espectros calculados y observados en la región de los 250-350 nm. Esto es consecuencia del hecho de que el ancho de banda es dependiente de una transición electrónica particular en lugar de ser el mismo para todo el espectro.

4.9 CONCLUSIONES PARCIALES

Se ha obtenido exitosamente un nuevo complejo de Re(I) $\text{Bu}_4\text{N}[(\text{bpy})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dcbpy})]$ y se ha caracterizado por ^1H NMR, FTIR y ESI.

Gracias a su estructura zwitteriónica, tiene una buena solubilidad en agua.

De los estudios de protonación se pudieron obtener 3 valores de pK_a por análisis quimiométricos de los cambios espectrales dependientes del pH. Estos valores de pK_a fueron asignados a la protonación del ligando 4,4'-bipiridina ($pK_{a1} = 5.0$) y al equilibrio ácido-base de los dos grupos carboxilato ($pK_{a2} = 3.0$ y $pK_{a3} = 2.0$) en el ligando dcbpy. Los cálculos TD-DFT mostraron que a pH neutro, donde $(\text{ReL})^-$ es la especie dominante, la banda de menor energía del complejo tiene un carácter $\text{MLLCT}_{\text{Re}(\text{CO})_3\text{-dcbpy}}$ mientras que a $\text{pH} = 1$, donde $(\text{ReL})\text{H}_3^{2+}$ es la especie más abundante, la naturaleza de la banda de menor energía cambia a $\text{MLLCT}_{\text{Re}(\text{CO})_3\text{-bpy}}$. Este cambio en la naturaleza de la banda de menor energía es responsable de los cambios espectrales en el rango de los 350-500 nm después de la protonación del complejo de Re(I). Los espectros electrónicos calculados de $(\text{ReL})^-$, $(\text{ReL})\text{H}$, $(\text{ReL})\text{H}_2^+$ y $(\text{ReL})\text{H}_3^{2+}$ coincidieron en buena medida con los perfiles espectrales de las especies contribuyentes a los cambios espectrales en los estudios de protonación.

5 CAPÍTULO II. ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES FOTOFÍSICAS DEL COMPLEJO $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$ POR TÉCNICAS OPTOACÚSTICAS Y DE LUMINISCENCIA ESTACIONARIA Y RESUELTA EN EL TIEMPO

5.1 RESUMEN

En este capítulo, se estudian las propiedades fotofísicas de un complejo del tipo *fac*- $\text{ReX}(\text{CO})_3(\alpha\text{-diimina})$ en donde el ligando α -diimina es la sal disódica del ácido batocuproindisulfónico, que le da al complejo la propiedad de ser soluble en agua. Las propiedades del complejo, llamado $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{Batocuproindisulfonato})]^{2-}$, se estudian tanto en solventes orgánicos como en medio acuoso usando espectroscopía optoacústica inducida por láser (LIOAS por sus siglas en inglés) y técnicas de luminiscencia estacionarias y resueltas en el tiempo.

Tanto los experimentos de luminiscencia resuelta en el tiempo y en estado estacionario, así como los cálculos de la Teoría Funcional de la Densidad Dependiente del Tiempo realizados al complejo, de aquí en adelante identificado como $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$, muestran que las propiedades fotofísicas de los complejos aniónicos de $\text{Re}(\text{I})$ están determinadas por el balance entre los estados excitados intraligando (^1IL) y el de transferencia de carga metal-ligando a ligando ($^3\text{MLLCT}$). En solventes orgánicos, prevalecen los estados $^3\text{MLLCT}$ y se observa el comportamiento usual en estos complejos: el desplazamiento batocrómico del máximo de emisión, una reducción en el rendimiento cuántico de emisión y una disminución de los tiempos de vida del estado excitado conforme aumenta la polaridad del solvente. Además, se genera oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) con un rendimiento cuántico alto ($\Phi_\Delta \approx 0,5$ en CH_3CN) debido al *quenching* de la luminiscencia $^3\text{MLLCT}$ por el $^3\text{O}_2$. Para los

solventes orgánicos estudiados, la constante de velocidad de *quenching* total del estado triplete por parte del oxígeno, k_q , alcanza valores entre 2,2 y 2,4 x 10⁹ M⁻¹ s⁻¹. En CH₃CN, la fracción de los estados triplete desactivados por el O₂ que producen ¹O₂, $f_{O_2}^T$, está cerca a la unidad. En solución acuosa, donde no se genera oxígeno singlete, la luminiscencia de los complejos de Re(I) es de carácter ¹IL con un rendimiento cuántico de emisión (Φ_{em}) que depende fuertemente del pH: $\Phi_{em,(pH=2)} / \Phi_{em,(pH=10)} \approx 5,6$. La variación del pH de la solución modifica las propiedades fotofísicas del complejo de Re(I) debido al cambio en las cantidades relativas de las diferentes especies existentes en la solución acuosa: [ClRe(CO)₃(BCS)]²⁻, [(OH)Re(CO)₃(BCS)]²⁻ y [(H₂O)Re(CO)₃(BCS)]⁻. Los cálculos TD-DFT muestran que el porcentaje de transferencia de carga de las transiciones electrónicas es sustancialmente más alto en los solventes orgánicos que en solución acuosa, en acuerdo con el incremento del carácter ¹IL del HOMO en [(H₂O)Re(CO)₃(BCS)]⁻ con respecto a [ClRe(CO)₃(BCS)]²⁻

5.2 INTRODUCCIÓN

En trabajos previos en nuestro grupo de investigación, se han caracterizado un par de complejos tricarbónicos de Re(I) solubles en agua, uno de ellos incluyendo en su estructura un ligando de gran relevancia biológica como lo es la pterina.^{155,202} Continuando con la línea desarrollada en nuestro grupo, en este capítulo de tesis se estudian las propiedades fotofísicas de un complejo del tipo *fac*-ReX(CO)₃(α -diimina) soportando el ligando soluble en agua (BCS) el cual está cargado y no es permeable a través de membranas, estas características permiten usarlo a menudo en estudios celulares.²⁰³ Las propiedades fotofísicas intrínsecas comunes a muchos complejos de Re(I), tales como amplios desplazamientos de Stokes, largos tiempos de vida de luminiscencia y resistencia al fotoblanqueo, resultan atractivas ya que hacen de estos unos excelentes candidatos para aplicaciones en microscopía celular.

En los solventes orgánicos, los estados ³MLLCT gobiernan las propiedades fotofísicas de los complejos de Re(I) con el usual comportamiento esperado: la emisión muestra un desplazamiento batocrómico, una reducción en su rendimiento cuántico de luminiscencia y se acortan los tiempos de vida del estado excitado al aumentar la polaridad del solvente. Además, el *quenching* de luminiscencia del estado ³MLLCT por oxígeno molecular lleva a la generación de oxígeno singlete con altos rendimientos cuánticos ($\Phi_{\Delta} \approx 0,5$ en CH₃CN). Por otro lado, el equilibrio dependiente del solvente entre los estados excitados ¹IL y ³MLCT, el cual modifica las propiedades fotofísicas del complejo de Re(I), está liderado por la sustitución de Cl por H₂O en medio acuoso. De hecho, este reemplazo de Cl por H₂O en la estructura del complejo genera una reducción del porcentaje de transferencia de carga en los estados excitados emisores, como lo muestran los cálculos TD-DFT, y consecuentemente el balance entre MLLCT e IL se inclina hacia esta última en solución acuosa y la luminiscencia del complejo de Re(I) se ve gobernada por los estados IL. En efecto, las propiedades fotofísicas del complejo de Re(I) son aquellas del Batocuproindisulfonato coordinado, con un rendimiento cuántico de fluorescencia dependiente del pH análogo al del ligando libre, sin dependencia

de la concentración de oxígeno disuelto para los tiempos de vida de luminiscencia y sin generación detectable de oxígeno singlete.

5.3 PARTE EXPERIMENTAL

5.3.1 MATERIALES

El complejo aniónico $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$ estuvo disponible gracias a un trabajo anterior de nuestro grupo de investigación.²⁰⁴ Acetonitrilo grado HPLC y grado espectro, metanol (MeOH, Sigma Aldrich) y etanol (EtOH, Sigma Aldrich) fueron usados sin posteriores purificaciones. 2-Hidroxibenofenona, fenalenona, New coccine, D_2O , NaOH y HClO_4 fueron proporcionados por Sigma Aldrich a la mayor pureza disponible y se usaron tal cual se recibieron. El agua desionizada ($>18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$, $<20 \text{ ppb}$ de carbón orgánico) se obtuvo gracias al sistema Millipore.

5.3.2 MEDIDAS FOTOFÍSICAS

Los espectros UV-vis se obtuvieron en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1800. Los espectros de emisión se midieron con un espectrofluorómetro de investigación Fluorolog-3 de IR-cercano con computador interconectado y fueron corregidos por diferencias de la respuesta espectral y la dispersión de luz. Las soluciones fueron burbujeadas con nitrógeno libre de O_2 con un sistema regulador de gas, antes de que los espectros fueran obtenidos.

Como referencia para determinar los rendimientos cuánticos de emisión se utilizó la Rodamina B en etanol, con $\Phi_{\text{ref}} = 0,69$.

Las medidas de los tiempos de vida fueron realizadas empleando la unidad de Recuento de Fotón Único Correlacionado con el Tiempo (TCSPC, por sus siglas en inglés) del Fluorolog-3 junto con fuentes de excitación NanoLEDs de 341 y/o 388 nm.

Las medidas fotoacústicas se realizaron usando una configuración ya descrita. (Ver apartado 3.3.2.1.4)

Para el tratamiento de las señales LIOAS, se usó la **Ecuación 5.1**, la cual relaciona la amplitud pico a pico de la primera señal fotoacústica (H) con la fracción de la fluencia del láser de excitación (F) absorbida por la muestra²⁰⁵

$$H = K \alpha F(1 - 10^{-A}) \quad (\text{Ec. 5.1})$$

En esta ecuación la constante experimental K contiene los parámetros termoelásticos de la solución como también los factores instrumentales, A es la absorbancia de la muestra a la longitud de onda de excitación y α es la fracción de energía liberada al medio como calor rápido, es decir, dentro del tiempo de resolución del experimento.

La eficiencia de los complejos de Re(I) en la sensibilización de oxígeno singlete fue evaluada por la medición directa de luminiscencia IR-cercano de $^1\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$). Después de la irradiación de las soluciones burbujeadas del complejo la generación de $^1\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$) se evidenció por la aparición de la fosforescencia característica de $^1\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$) a 1270 nm. La detección de la fosforescencia resuelta en el tiempo se usó para la detección de oxígeno singlete. La luminiscencia de IR-cercano de $^1\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$) fue observada a 90° a través de un filtro metálico antirreflectivo recubierto de silicona de 5 mm de ancho con un paso de longitud de onda $> 1,1 \mu\text{m}$ y un filtro de interferencia a $1,27 \mu\text{m}$ por medio de un fotodiodo de Germanio (Applied Detector Corporation, tiempo de resolución $1 \mu\text{s}$) preamplificado (baja impedancia). El análisis exponencial simple del decaimiento de la emisión se desarrolló con la exclusión de la parte inicial de la señal. El rendimiento cuántico de formación de $^1\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$), Φ_Δ , se determinó midiendo su intensidad de fosforescencia usando una solución ópticamente igualada de fenalenona ($\Phi_\Delta = 0,98$)²⁰⁶ como sensibilizador de referencia.

5.3.3 ESTUDIOS DE PROTONACIÓN Y ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICOS

Los valores de pK_a se determinaron por valoración espectrofotométrica en función del pH usando *buffer* $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (0,1 M cada uno). En cada experimento 50 mL de solución de complejo de Re(I) ($[\text{Re}] = 3 \times 10^{-5}$ M), inicialmente a pH = 6,7; fueron llevados a pH = 10 por adición de NaOH 3 M. Después de esto, se bajó gradualmente hasta pH = 2 por adición de alícuotas de 50-100 μL de HClO_4 3 M tomando los espectros de absorción de cada solución. El proceso mostró un comportamiento reversible (sin cambios de forma en los espectros), de modo que pudo revertirse de pH 2 a 10, adicionando alícuotas de 50 ó 100 μL de NaOH 3 M. Cuando fue necesario, las absorbancias fueron corregidas por sus respectivos factores de dilución.

A la matriz de absorción experimental se le aplicó un análisis de regresión bilineal²⁰⁷ con el fin de obtener información en los espectros de las especies absorbentes.

5.3.4 MÉTODOS COMPUTACIONALES

La estructura electrónica del complejo tricarbonílico de Re(I) se determinó usando herramientas de DFT con el programa Gaussian 09. La optimización de la geometría del estado fundamental se llevó a cabo por medio del funcional híbrido B3LYP con el conjunto de bases LanL2DZ. Las frecuencias vibracionales fueron computadas al mismo nivel de la teoría para confirmar que estas estructuras eran mínimos sobre las superficies de energía. Las energías de transición vertical fueron calculadas para la geometría del estado fundamental optimizado usando TD-DFT y el funcional híbrido PBE0. En todos los cálculos TD-DFT, se usó el conjunto de bases 6-311G para los átomos de C, N, O y H, el conjunto de bases 6-311*G se usó para átomos de Cl y S mientras que LanL2TZ(f)²⁰⁸⁻²⁰⁹ (conjunto de bases triple zeta para un ECP más polarización f) se usó para el átomo de Re. Tanto geometrías optimizadas como cálculos TD-DFT se llevaron a cabo incluyendo el efecto del solvente

(agua o metanol) a través del modelo continuo polarizable PCM por sus siglas en inglés)¹⁸²⁻¹⁸⁴ para producir un número de 110 transiciones singlete-singlete.

Los archivos de salida del Gaussian 09 fueron analizados utilizando el programa AOMix.²¹⁰⁻²¹¹ De esta manera, con este último programa se obtuvieron los espectros de densidad de estados (DOS) y la contribución porcentual de los diferentes fragmentos moleculares a los distintos orbitales moleculares (MOs). Los espectros de absorción se simularon con distribuciones gaussianas con un ancho completo a mitad del máximo (fwhm por sus siglas en inglés) configurado a 3000 cm^{-1} con la ayuda del programa GaussSum 2.2.5.

5.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.4.1 ORIGEN DE LA ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN DE LOS COMPLEJOS TIPO *FAC*-XRE(CO)₃L

Las bandas de absorción de más baja energía de los complejos tipo *fac*-XRe(CO)₃L se presentan en la región del UV-cercano. Varias transiciones electrónicas para estos complejos son posibles en la espectroscopía UV-cercana tales como campo-ligando (LF), transferencia de carga metal-ligando (MLCT), transferencia de carga ligando-ligando (LLCT) y transiciones intraligando (IL). En la mayoría de los casos, las bandas de transferencia de carga (CT), que usualmente aparecen a $\lambda_{\max} \sim 330\text{-}400$ nm y tienen coeficientes de extinción molar del orden de $\epsilon \sim (2\text{-}5) \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, aparecen a longitudes de onda algo más largas que las bandas más intensas IL, cuyos picos usualmente están a $\lambda_{\max} \sim 240\text{-}320$ nm con $\epsilon \sim 2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.¹⁴⁵

Estudios recientes TD-DFT han cuestionado las propiedades de estos modelos simplificados. Debido a que suele ocurrir una mezcla entre MLCT/LLCT o MLCT/XLCT, a estas transiciones en la jerga actual se les llama generalmente transferencia de carga metal-ligando a ligando. Por ejemplo, en complejos como [Re(bpy)(CO)₃Cl] y [Re(bpy)(CO)₃(py)]⁺ (bpy = 2,2'-bipiridina, py = piridina), el HOMO puede ser descrito como que tiene más de un 50% de carácter Re, con contribuciones alrededor del 20% de CO y Cl cada una en el caso de [Re(bpy)(CO)₃Cl] y 20% de CO para [Re(bpy)(CO)₃(py)]⁺. A pesar de esto, el LUMO está compuesto por más de un 80% de carácter de bpy en ambos casos.¹⁴⁶ Por consiguiente, a la transición óptica de menor energía se le puede atribuir un carácter MLLCT. Además, nuestros recientes cálculos TD-DFT en dos complejos similares de Re(I) solubles en agua, también han mostrado que sus bandas de absorción de menor energía se pueden describir como de carácter MLLCT.^{202,212} Los estados excitados LLCT usualmente se presentan en complejos que soportan tanto ligandos de tipo oxidante como de tipo reductor como resultado de la transferencia de carga desde un ligando

donor a un ligando aceptor. Hay varios ejemplos de complejos tricarbónicos de Re(I) que presentan sus estados excitados de más baja energía de carácter LLCT.¹⁴⁶ Los coeficientes de extinción para estas bandas LLCT son comúnmente muy bajos debido a la interacción electrónica muy débil entre donador-aceptor en estos complejos. De esta manera, contrario a las transiciones MLCT, las transiciones LLCT no suelen ser observadas directamente de la espectroscopía de absorción UV-vis. Como por lo general los estados LLCT son no emisivos, sus estados excitados característicos pueden ser estudiados solo por espectroscopía de transientes.¹⁴⁶ Gracias a las últimas observaciones, los estados LLCT suelen ser elusivos comparados con los estados MLCT.

5.4.2 ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN DE [ClRe(CO)₃(BCS)]²⁻

El espectro de absorción del complejo [ClRe(CO)₃(BCS)]²⁻ en solución acuosa neutra, es decir a pH = 7,0, consiste de una banda de absorción intensa ($\epsilon \sim 2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) centrada a $\lambda_{\text{max}} = 296 \text{ nm}$ con un hombro a 333 nm. Entre 350 y 400 nm, hay un segmento achatado del espectro que consiste de al menos dos bandas de intensidad media ($\epsilon \sim 3 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) que están centrados alrededor de los 376 nm. En medio ácido (pH = 2,0), el espectro casi no experimenta algún cambio entre 290 y 400 nm aunque hay un aumento de intensidad en el rango de los 220-290 nm comparado con la solución neutra. En medio alcalino (pH = 10), la banda de mayor energía se desplaza hacia $\lambda_{\text{max}} = 291 \text{ nm}$ mientras que las bandas de menor energía, comparadas con la solución neutra, se desplazan a longitudes de onda más largas. En el espectro UV-vis del complejo de Re(I) en el rango de pH = 2,0-10,0 se detectó un intercambio reversible de ligando dependiente del pH. Se midió el espectro UV-vis de [ClRe(CO)₃(BCS)]²⁻ en soluciones buffer NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ a temperatura ambiente y llevando a cabo valoraciones por adición de HClO₄ para observar los cambios espectrales (**Figura 5.1a**). La **Figura 5.1a** se puede dividir en dos rangos de pH: (i) los cambios espectrales observados entre pH = 10 y pH = 7 donde se pueden percibir dos puntos isobésticos a 255 y 345 nm y (ii) los cambios espectrales observados entre pH = 7 y pH = 2 donde no se

presentaron puntos isobésticos. Este comportamiento general indica la existencia de varias especies en equilibrios simultáneos. Por tanto, decidimos aplicar técnicas de análisis por regresión bilineal en la evaluación de la matriz completa de los espectros UV-vis de la **Figura 5.1a** para poder entender la influencia del pH en los equilibrios correspondientes entre las diferentes especies. La estimación del número de contribuciones independientes arrojó un $n = 3$.

En el recuadro de la **Figura 5.1a** se muestran las funciones de distribución para las tres especies a lo largo de todo el rango de pH. De esta figura, podemos decir que hay dos valores de pH a los cuales cada par de especies tiene la misma concentración, es decir, 5,6 y 8,6. De acuerdo con lo reportado en la literatura,²¹³⁻²¹⁴ $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$ podría sufrir una hidrólisis en solución acuosa para dar como resultado $[(\text{H}_2\text{O})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^-$. Cabe destacar que con un complejo de Re(I) similar, $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{pterina})(\text{H}_2\text{O})]$, encontramos previamente que la desprotonación de la molécula de agua para dar el hidroxocomplejo ocurre con un pK_a de 8,8.¹⁵⁵ Consecuentemente, las tres especies que deberían ser consideradas como contribuyentes a los cambios espectrales observados en la **Figura 5.1a** son $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$, $[(\text{OH})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$ y $[(\text{H}_2\text{O})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^-$. Por lo tanto, al $\text{pH} = 8,6$ se le puede atribuir el equilibrio entre las especies $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$ y $[(\text{OH})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$. Con respecto al valor de $\text{pH} = 5,6$; podría ser relacionado con el reemplazo del Cl por el H_2O en la esfera de coordinación del complejo de Re(I), ver **Ecuaciones 5.2 y 5.3**.



La **Figura 5.1b** muestra la comparación del espectro de absorción UV-vis de $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$ en soluciones de agua, acetonitrilo, metanol y etanol. Aquí se pudo observar que las bandas de absorción de alta energía se desplazaron de $\lambda_{\text{max}} = 296$ nm en agua a $\lambda_{\text{max}} = 291-293$ nm en los solventes orgánicos. Adicionalmente, la banda de menor energía se ensancha y desplaza a longitudes de onda más largas.

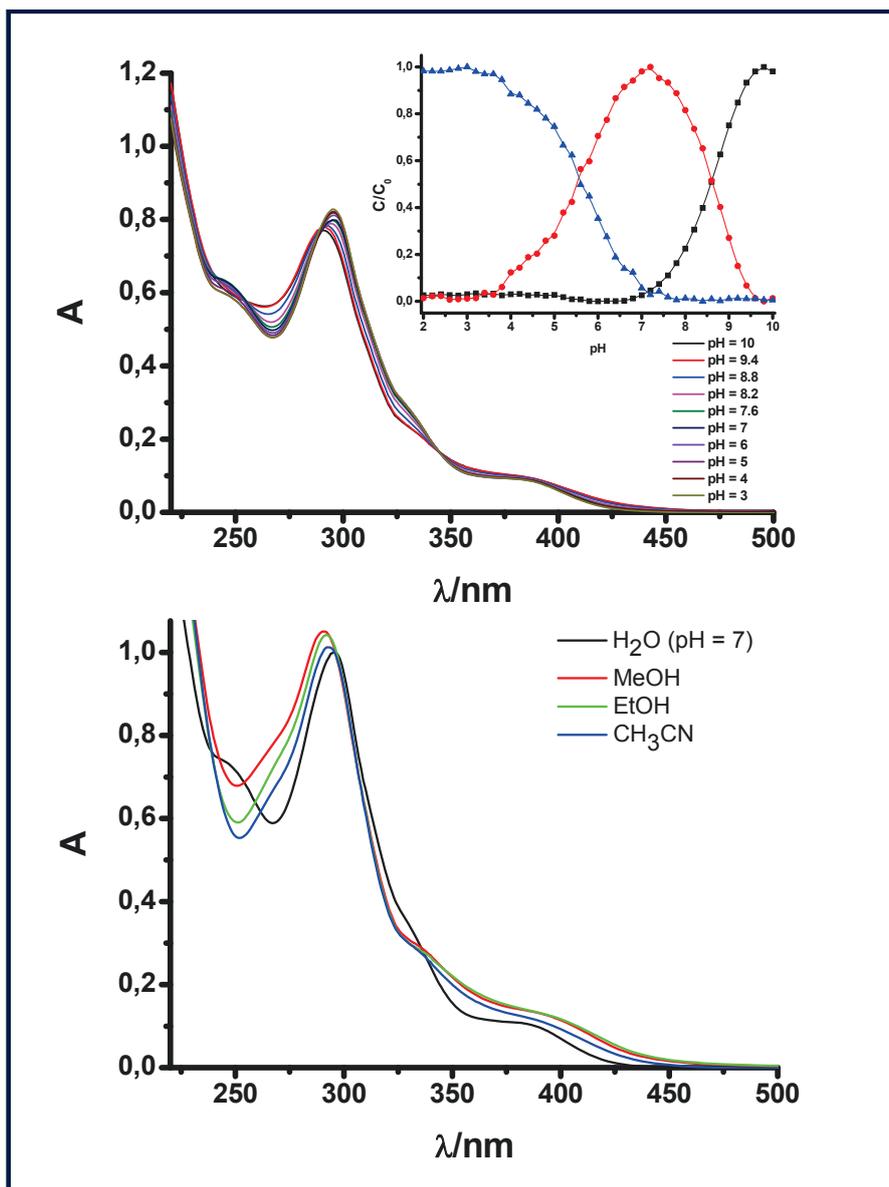


Figura 5.1. a. Espectros de absorción UV-vis dependientes del pH para $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$ en soluciones buffer $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ a temperatura ambiente. b. Espectros de absorción UV-vis de $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$ en soluciones de agua, acetonitrilo, metanol y etanol.

5.4.3 CÁLCULOS TD-DFT

Los cálculos TD-DFT fueron desarrollados para $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$ (PCM/MeOH y PCM /H₂O) y $[(\text{H}_2\text{O})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^-$ (PCM /H₂O). Ya que los resultados para $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$ fueron muy similares bajo el Modelo Continuo Polarizable (PCM por sus siglas en inglés) en H₂O y en MeOH, solo serán discutidos los resultados TD-DFT calculados para $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$ (PCM/MeOH) y $[(\text{H}_2\text{O})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^-$ (PCM/H₂O). Los resultados TD-DFT calculados están resumidos y comparados con los datos experimentales en la **Tabla 5.1** para $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$ (en MeOH) y $[(\text{H}_2\text{O})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^-$ (en H₂O).

Se observó entonces que las principales características espectrales se predicen con gran precisión, tanto en posición como en intensidades relativas, por cálculos TD-DFT. Los principales orbitales moleculares (MOs por sus siglas en inglés) involucrados en las transiciones electrónicas más intensas de $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$ y $[(\text{H}_2\text{O})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^-$ en la región de los 340-400 nm (es decir, la región espectral correspondiente a las longitudes de onda de excitación usadas en los experimentos de luminiscencia que se describen más adelante) son H, H-1, L y L+1. Las **Figuras 5.2 y 5.3** muestran los planos espaciales de estos MOs para $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$ y $[(\text{H}_2\text{O})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^-$. La forma tridimensional de L y L+1 es muy similar en ambos, $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$ y $[(\text{H}_2\text{O})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^-$. La diferencia radica en el H. Para $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$, H está espacialmente limitado por los alrededores del Re, el Cl y los tres carbonilos. Para $[(\text{H}_2\text{O})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^-$, por el contrario, H se extiende a través de toda la molécula incluyendo también a los sulfonatos distantes.

Los cálculos de la estructura electrónica de un estado electrónico dado dan como resultado su correspondiente energía molecular y función de onda (ψ). Dado que ψ es dependiente de las coordenadas de todos los electrones, es de muy difícil interpretación. Así, son necesarias características y nociones simplificadas de ψ para tener una visión más profunda de la estructura electrónica de las moléculas.

Tabla 5.1. Resultados TD-DFT calculados y comparados con los datos experimentales para $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$ (en MeOH) y $[(\text{H}_2\text{O})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^-$ (en H_2O).

Solvente / Especie	$\lambda_{\text{obs}}/\text{nm}$ (ϵ / $10^4 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)	$\lambda_{\text{calc}}/\text{nm}$ (f_{osc})	Mayor contribución a las transiciones electrónicas (% coeficientes)	
MeOH	385 (4.9)	390.9 (0.112)	H-1→L (92%)	
		358.2 (0.1223)	H→L+1 (85%)	
		346.0 (0.1617)	H-1→L+1 (95%)	
	329 (11.2)	330.3 (0.0644)	H-7→L (15%), H-5→L (69%)	
		325.4 (0.1344)	H-2→L+1 (93%)	
		300.7 (0.2059)	H-7→L (35%), H-6→L+1 (21%), H-5→L (14%)	
	291 (37.8)	294.1 (0.4402)	H-8→L (67%), H-5→L+1 (11%)	
		285.9 (0.1676)	H-8→L+1 (10%), H-7→L (28%), H-6→L+1 (41%)	
		273.2 (0.0577)	H-8→L+1 (40%)	
	263 (27.0)	272.8 (0.0797)	H-15→L (60%)	
		263.5 (0.1688)	H→L+2 (30%), H→L+4 (28%), H→L+8 (11%)	
		252.2 (0.0569)	H-18→L (62%)	
		233.2 (0.0724)	H-19→L (15%), H-6→L+2 (15%), H→L+11 (15%), H→L+14 (12%)	
		232.3 (0.1012)	H-23→L (16%), H-1→L+8 (20%), H-1→L+11 (18%), H-1→L+14 (10%)	
		232.1 (0.071)	H-21→L (21%), H-6→L+2 (15%), H-3→L+2 (13%)	
		231.9 (0.0524)	H-22→L (13%), H-21→L (31%)	
		231.7 (0.0522)	H-22→L (40%), H-4→L+2 (14%)	
		227.8 (0.0536)	H-6→L+3 (13%), H→L+7 (28%)	
		224.9 (0.0735)	H-7→L+4 (13%), H-6→L+3 (26%), H-5→L+4 (12%)	
		Agua	378 (5.2)	385.7 (0.1943)
337.2 (0.2897)				H→L+1 (89%)
324 (17.5)			320.9 (0.2831)	H-5→L (21%), H-3→L+1 (36%), H-1→L+1 (33%)
			312.3 (0.067)	H-6→L (76%)
295 (44.6)	297.1 (0.1105)		H-10→L (33%), H-8→L (22%), H-7→L+1 (16%)	
	293.4 (0.1468)		H-3→L+2 (10%), H-1→L+2 (10%), H→L+3 (22%), H→L+5 (12%)	
	291.1 (0.2785)		H-7→L+1 (13%), H-5→L+1 (49%)	
250 (32.0)	283.5 (0.076)		H-6→L+1 (64%)	
	259.2 (0.0669)		H-15→L (69%)	
	249.1 (0.1093)		H-3→L+4 (16%), H-1→L+4 (18%), H→L+3 (15%), H→L+5 (20%)	
	246.0 (0.0882)		H-13→L+1 (17%), H-3→L+4 (13%), H→L+3 (12%), H→L+5 (20%)	
	234.9 (0.0608)		H-4→L+9 (14%), H-3→L+11 (21%), H-1→L+11 (19%)	
	234.0 (0.1626)		H-3→L+5 (17%), H-1→L+5 (15%), H→L+6 (13%)	
	230.4 (0.0924)		H-6→L+2 (52%), H-6→L+4 (15%)	
	226.1 (0.0832)		H-6→L+3 (11%), H-6→L+5 (10%), H-5→L+4 (20%)	
	225.4 (0.0759)		H-4→L+3 (13%), H-4→L+5 (11%), H→L+9 (10%)	
	218.9 (0.0511)		H-7→L+4 (12%), H-6→L+3 (22%), H-6→L+5 (10%)	
	216.8 (0.0663)		H-10→L+2 (10%), H-6→L+4 (15%), H-5→L+3 (10%)	
	210.8 (0.0639)		H-10→L+3 (17%), H-6→L+5 (23%)	

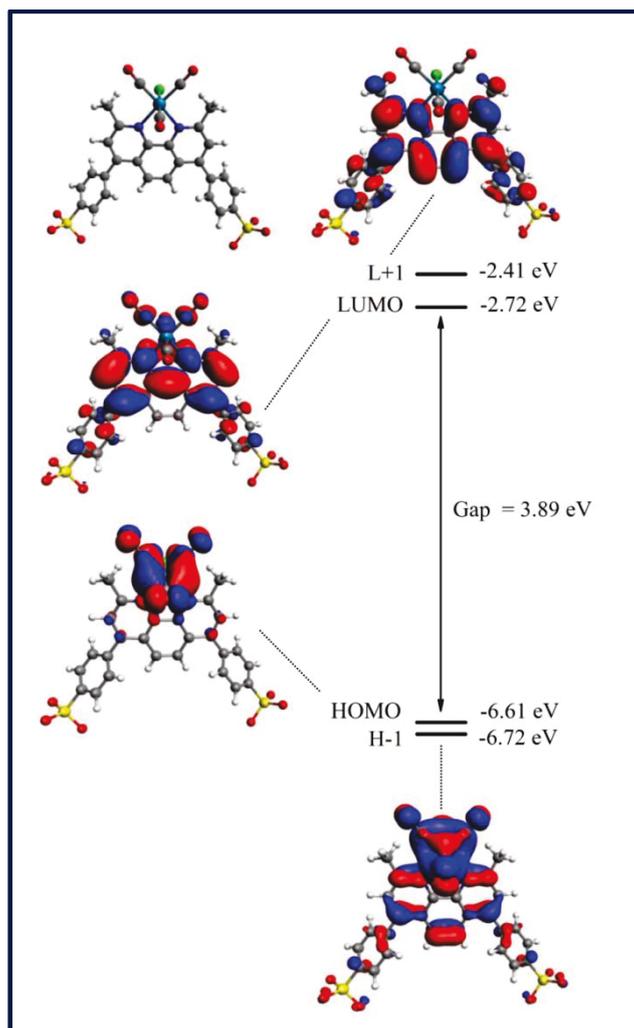


Figura 5.2. Diagrama de orbitales moleculares para $[\text{CIRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]_2^2/\text{PCM}/\text{MeOH}$ (isovalor = 0.02). $\text{H-1} \rightarrow \text{L}$, $\text{H-1} \rightarrow \text{L+1}$ y $\text{H} \rightarrow \text{L+1}$ son las principales transiciones involucradas en las bandas de baja energía del complejo en MeOH.

El análisis de población de Mulliken (MPA por sus siglas en inglés) es el procedimiento más ampliamente usado para obtener información acerca de la estructura electrónica de las moléculas. El programa AOMIX utiliza el análisis MPA para calcular, por ejemplo, la densidad de estados (DOS).²¹² Los gráficos de DOS proveen una representación pictórica de la composición de los MOs basada en las contribuciones de los diferentes fragmentos en los cuales la molécula completa puede ser dividida para su análisis. Un fragmento en particular que contribuya a un MO de manera muy significativa, tendrá una densidad de estados parcial (PDOS) muy alta (cercana a la densidad de estados total, TDOS) a la energía correspondiente a ese MO en particular.

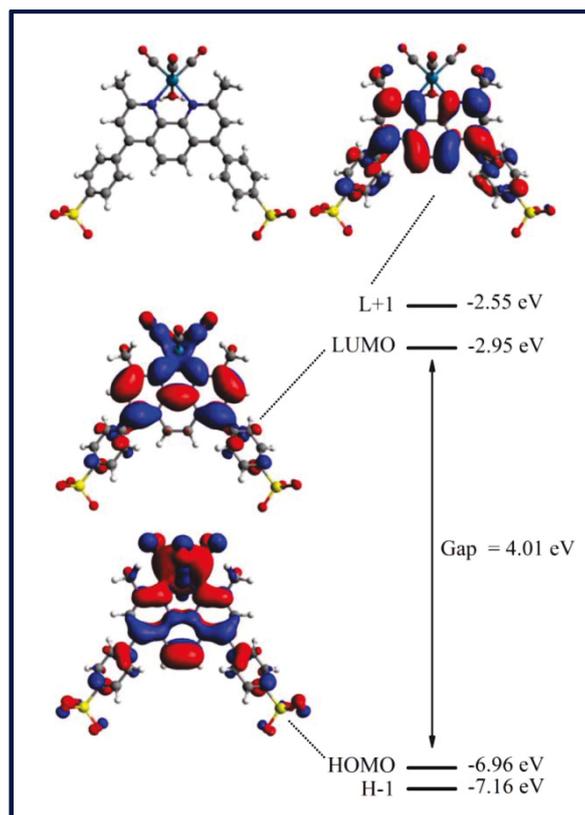


Figura 5.3. Diagrama de orbitales moleculares para $[(\text{H}_2\text{O})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{BCS})]/\text{PCM}/\text{H}_2\text{O}$ (isovalor = 0.02). $\text{H} \rightarrow \text{L}$ y $\text{H} \rightarrow \text{L}+1$ son las principales transiciones involucradas en la banda de absorción de baja energía del complejo en solución acuosa.

En la **Figura 5.4** podemos ver los espectros DOS para $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$ y $[(\text{H}_2\text{O})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^-$. Estos espectros fueron generados a partir de las contribuciones de seis fragmentos: (i) átomo de Re, (ii) los tres carbonilos, (iii) átomo de Cl o molécula de H_2O , (iv) $(\text{CH}_3)_2$ -fenantrolina, (v) los dos grupos fenilo y (vi) los dos sulfonatos. La **Tabla 5.2** lista la composición porcentual de orbitales atómicos para los MOs más relevantes de $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$ y $[(\text{H}_2\text{O})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^-$ calculados con el programa AOMIX (**Figura 5.4**).

En MeOH, la banda de menor energía del $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$, la cual se observa a 385 nm, se predijo por TD-DFT a 390,9 nm como una transición $\text{H}-1 \rightarrow \text{L}$. Dada la composición porcentual de orbital de H-1 y L (**Tabla 5.2**), la transición $\text{H}-1 \rightarrow \text{L}$ está compuesta por dos clases de transiciones electrónicas. Una de ellas es una transición $\text{MLLCT}_{\text{ClRe}(\text{CO})_3 \rightarrow \text{BCS}}$ (es decir, una transición CT deslocalizada $\text{ClRe}(\text{CO})_3 \rightarrow \text{BCS}$) con la mayoría de la densidad electrónica transferida desde los enlaces Re-C y Re-Cl a los fragmentos $(\text{CH}_3)_2$ -

fenantrolina de CBS. La otra es una transición IL que involucra transferencia de carga desde los sulfonatos hacia los fragmentos fenil de BSC.

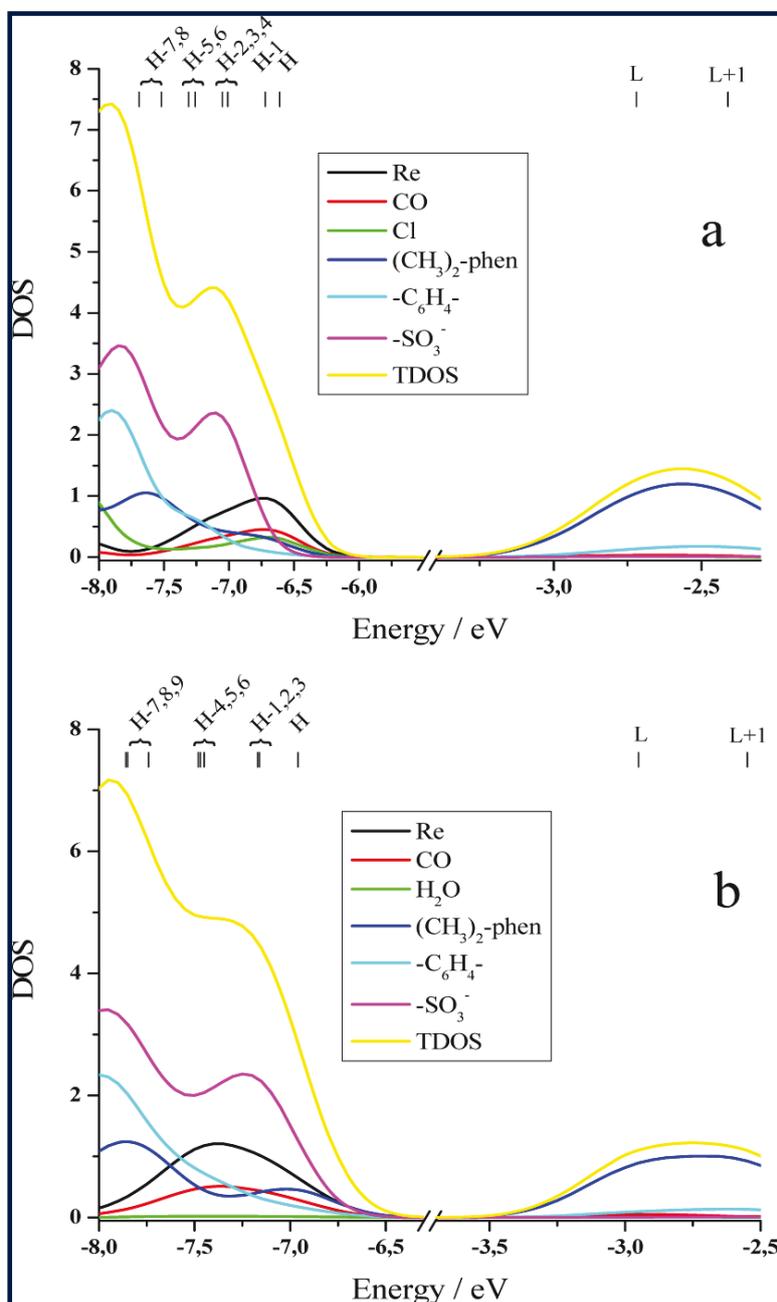


Figura 5.4. Gráficos de la densidad total de los estados (TDOS) y densidad parcial de los estados para: **a.** $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}/\text{PCM}/\text{MeOH}$ y **b.** $[(\text{H}_2\text{O})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{-}/\text{PCM}/\text{H}_2\text{O}$ generados a partir de las contribuciones de seis fragmentos: (i) átomo de Re, (ii) los tres carbonilos, (iii) el átomo de Cl o molécula de H_2O , (iv) $(\text{CH}_3)_2$ -fenantrolina, (v) los dos grupos fenilo y (vi) los dos sulfonatos. Las líneas marcan la posición en energía de los diferentes MO's. Las geometrías optimizadas y los cálculos TD-DFT fueron llevados a cabo incluyendo los efectos del solvente a través del Modelo Continuo Polarizable (PCM).

La transición $\text{H-1} \rightarrow \text{L+1}$, la cual se predijo a 346,0 nm es muy similar en su naturaleza a la transición electrónica $\text{H-1} \rightarrow \text{L}$. La diferencia radica en la

contribución porcentual de los grupos fenilo el Re y el Cl a los MOs L+1 y L. L+1 tiene una mayor contribución porcentual de los grupos fenilos que L.

Tabla 5.2. Composición (% carácter) de los orbitales moleculares relevantes de $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$ y $[(\text{H}_2\text{O})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^-$ tal como se extrajeron de de los análisis DOS y TDOS de la **Figura 5.4**. Las energías de MO fueron computadas al nivel de la teoría PBE0-CPM/LanL2TZ(f)/6-311G/6-311G*

Complejo	OM (energía/eV)	Re	CO	Cl/H ₂ O	(CH ₃) ₂ -phen	Fenilos	Sulfonatos
$[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$	H-1 (-6.72)	40,3	18,5	14,0	19,9	5,8	1,5
	HOMO (-6.61)	50,4	24,4	18,5	5,0	1,4	0,3
	LUMO (-2.72)	3,3	3,4	1,0	82,5	9,2	0,6
	L+1 (-2.41)	0,3	0,8	0,0	83,3	14,6	1,1
$[(\text{H}_2\text{O})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^-$	HOMO (-6.96)	31,0	14,7	1,3	39,0	10,5	3,5
	LUMO (-2.95)	4,6	5,7	0,8	80,3	8,1	0,6
	L+1 (-2.55)	0,4	0,8	0,0	85,0	12,9	0,9

Por otra parte, la contribución de los fragmentos Re y Cl es menor en L+1 que en L. La transición electrónica predicha a 358,2 nm es una transición H→L+1. Ya que el átomo de Re contribuye con porcentajes más altos a H que a H-1, la transición H→L+1 tiene un mayor carácter de transferencia de carga que las transiciones H-1→L y H-1→L+1. Para la caracterización de las transiciones electrónicas como transiciones CT parciales, se pueden usar las siguientes definiciones del carácter CT:²¹⁵

$$CT_i(\%) = 100 (P_g(M) - P_i(M)) \quad (\text{Ec. 5.4})$$

Donde $P_g(M)$ y $P_i(M)$ son las densidades electrónicas en el metal en el estado electrónico fundamental y el i ésimo estado excitado, respectivamente. Cabe destacar que con esta definición, los valores positivos de $CT_i(M)$ corresponden a transiciones MLCT, los valores negativos a transiciones LMCT.²¹⁵

Por lo tanto, el carácter CT para una excitación H-n→L+m es:

$$CT(\%) = \%(\text{Re})_{\text{H-n}} - \%(\text{Re})_{\text{L+m}} \quad (\text{Ec. 5.5})$$

Si el estado excitado está formado por más de una excitación de un electrón, entonces el carácter de CT de este estado excitado se expresa como una suma de los caracteres CT de cada excitación participante, $i \rightarrow j$:²¹⁵

$$CT_1(\%) = \sum_i [C_1(i \rightarrow j)]^2 [\%(M)_i - \%(M)_j] \quad (\text{Ec. 5.6})$$

Donde $C_1(i \rightarrow j)$ son los coeficientes propios de la i ésima transición que dan la contribución porcentual de una configuración a la función de onda TD-DFT del estado excitado resultante. Por consiguiente, con la ayuda de las **Ecuaciones 5.4-5.6** y los porcentajes de orbitales de la **Tabla 5.2** se pudo calcular un 47% de CT para la transición $H \rightarrow L+1$. Por otro lado, las transiciones $H-1 \rightarrow L$ y $H-1 \rightarrow L+1$ tienen 37 y 38% de CT, respectivamente.

Para el complejo $[(H_2O)Re(CO)_3(BCS)]^-$, en H_2O , los cálculos de TD-DFT predicen dos transiciones electrónicas de baja energía en la región espectral de los 340-390 nm: la transición $H \rightarrow L$ a 385,6 nm y la transición $H \rightarrow L+1$ a 337,2 nm. Ambas se pueden describir como la mezcla de transiciones electrónicas MLLCT e IL. Para las transiciones $H \rightarrow L$ y $H \rightarrow L+1$, se puede calcular un 25 y 27% de CT, respectivamente. Por lo anterior, el balance entre MLLCT e IL se inclina hacia éste último y los estados IL parecen jugar un papel predominante en los procesos fotofísicos en soluciones acuosas. Los espectros electrónicos calculados para $[ClRe(CO)_3(BCS)]^{2-}$ y $[(H_2O)Re(CO)_3(BCS)]^-$ fueron simulados a partir de resultados teóricos para facilitar su comparación con los datos experimentales. Estos son comparados con sus espectros calculados, obtenidos por la suma de las funciones gaussianas centradas a cada longitud de onda calculada con el máximo relacionado al valor de la fuerza del oscilador (la cual también está graficada) usando la **Ecuación 5.7**

$$\varepsilon(\nu) = \frac{2,175 \times 10^8 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-2}}{\Delta_{1/2} \nu} (f_{osc}) \exp \left[-2,772 \left(\frac{\nu - \nu_{i \rightarrow f}}{\Delta_{1/2} \nu} \right)^2 \right] \quad (\text{Ec. 5.7})$$

Esta es la fórmula que usa el software Gaussian para convolucionar espectros.²¹⁶ En esta ecuación, el valor paramétrico de los fwhm de la banda está dado en cm^{-1} y se simbolizó con $\Delta_{1/2} \tilde{\nu}$, f_{osc} es la fuerza del oscilador y $\tilde{\nu}_{i \rightarrow f}$ es la frecuencia (en cm^{-1}) correspondiente a la longitud de onda de la transición electrónica calculada. Las simulaciones se muestran en la **Figura 5.5** comparadas con las absorciones experimentales. Esta comparación es muy satisfactoria y los espectros simulados siguen a las absorciones observadas con gran precisión tanto en posición como en intensidades relativas.

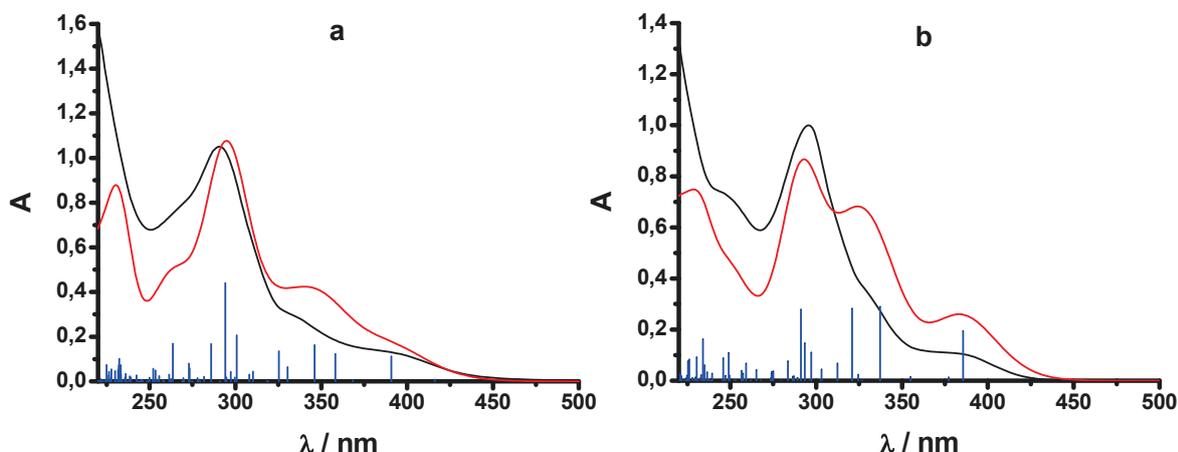


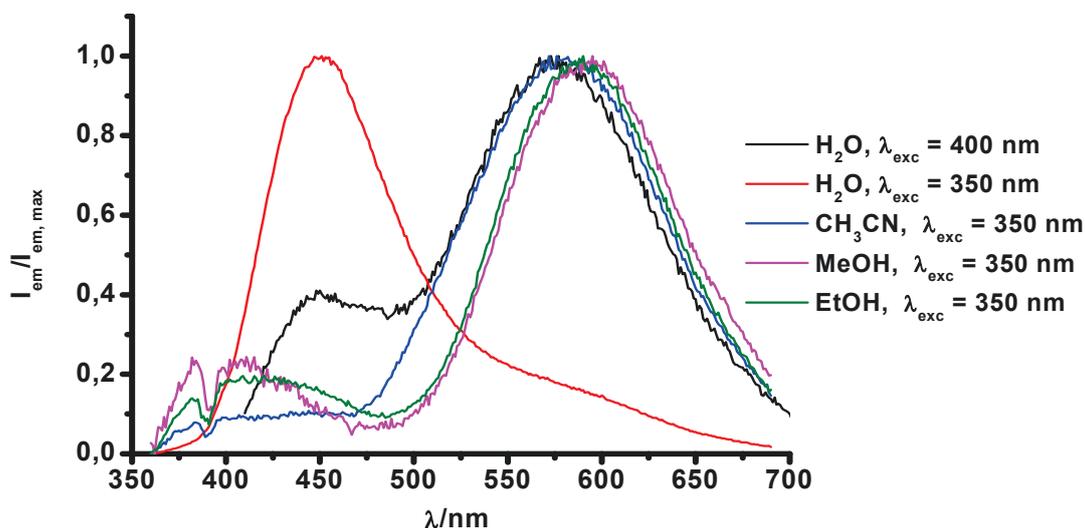
Figura 5.5. Comparación de los espectros de absorción UV-vis (línea negra) con las transiciones electrónicas calculadas por TD-DFT (líneas azules) y los espectros simulados (línea roja) para a. $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}/\text{PCM}/\text{MeOH}$ y b. $[(\text{H}_2\text{O})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{-}/\text{PCM}/\text{H}_2\text{O}$

5.4.4 LUMINISCENCIA ESTACIONARIA Y RESUELTA EN EL TIEMPO

La luminiscencia estacionaria de $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$ muestra una fuerte dependencia al solvente y a longitud de onda de excitación. La **Figura 5.6** muestra los espectros de emisión de soluciones burbujeadas con N_2 del complejo de Re(I) en H_2O , CH_3CN , MeOH y EtOH con $\lambda_{exc} = 350$ y 400 nm. Cuando el espectro fue medido en agua a $\lambda_{exc} = 350$ nm, la emisión observada mostró un máximo a $\lambda_{max} = 451$ nm y un hombro a longitudes de onda más largas centrado alrededor de los 570 nm. Sin embargo, en el mismo solvente, cuando la longitud de onda de excitación fue de 400 nm, el máximo de emisión se observó a 577 nm y solo se observaron vestigios de la banda de alta energía centrada a 451 nm. En CH_3CN , EtOH y MeOH , con $\lambda_{exc} = 350$ nm, los máximos de los espectros de luminiscencia se observaron a 576, 590 y 595

nm, respectivamente. Cuando la longitud de onda de excitación fue de 400 nm, los máximos de emisión se dieron a 585, 591 y 590 nm en CH₃CN, EtOH y MeOH, respectivamente (no se muestran estos espectros en la figura).

Figura 5.6. Dependencia del solvente y la longitud de onda de excitación de los espectros de emisión de [ClRe(CO)₃(BCS)]²⁻. Las soluciones fueron deaireadas burbujeando N₂.



Simultáneamente, para las medidas de luminiscencia resuelta en el tiempo, se requirió la suma de dos exponenciales para lograr un ajuste satisfactorio de los perfiles de decaimiento de emisión de las soluciones del complejo de Re(I) libre de O₂ en los solventes orgánicos ya mencionados. La especie de decaimiento rápido, $\tau_{\text{short}} \approx 5$ ns, fue prácticamente independiente del solvente. Sin embargo, el tiempo de vida de la especie de decaimiento lento, τ_{long} fue de 148, 131 y 95 ns en CH₃CN, EtOH y MeOH, respectivamente. La presencia de O₂ en las soluciones *sofocó* tanto la luminiscencia estacionaria como la resuelta en el tiempo del complejo de Re(I) en solventes orgánicos. Por ejemplo, en MeOH $\tau_{\text{long}} = 63,0$ ns en soluciones medidas en atmósfera de aire mientras que $\tau_{\text{long}} = 30,0$ ns en soluciones saturadas en O₂. También se observó una disminución similar del τ_{long} con el incremento de la concentración de O₂ en soluciones de CH₃CN y/o EtOH, ver **Tabla 5.3**.

El efecto del pH en la luminiscencia del complejo de Re(I) se estudió en soluciones *buffer* NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ en atmósfera de aire entre pH = 2,0 y pH

= 10,0 bajo condiciones experimentales similares a las usadas para investigar el efecto del pH sobre el espectro de absorción UV-vis (ver **Figura 5.7a**).

Tabla 5.3. Tiempos de vida de luminiscencia del complejo de Re(I) ($\lambda_{ob} = 570$ nm), rendimientos cuánticos y constantes de velocidad bimolecular (k_q) para el quenching de emisión por oxígeno molecular, en solventes orgánicos y en solución acuosa *buffer* (pH = 7,0).

Solvente	τ_{corto} (N ₂) /ns	τ_{largo} (N ₂) /ns	τ_{corto} (aire) /ns	τ_{largo} (aire) /ns	τ_{corto} (O ₂) /ns	τ_{largo} (O ₂) /ns	$k_q/10^9 M^{-1} s^{-1}$	$\Phi_{em}(aire)$ ($\pm 10\%$)
MeOH	7 \pm 2	95 \pm 8	7 \pm 2	63 \pm 2	5 \pm 1	30 \pm 2	2.2 \pm 0.1	8.8x10 ⁻³
EtOH	4.6 \pm 0.1	131 \pm 2	4.5 \pm 0.6	81 \pm 4	3.9 \pm 0.1	33.7 \pm 0.4	2.20 \pm 0.05	1.3x10 ⁻²
CH ₃ CN	5 \pm 1	148 \pm 11	8 \pm 2	80 \pm 11	8 \pm 2	35 \pm 1	2.4 \pm 0.1	2.6x10 ⁻²
H ₂ O	10 \pm 2	105 \pm 10	8 \pm 2	96 \pm 10	9 \pm 2	71 \pm 7	3.7 \pm 0.1	1.3x10 ⁻²

En un rango de pH entre 10,0 y 7,5; el espectro de luminiscencia muestra dos bandas centradas en 410 y 570 nm y el rendimiento cuántico de luminiscencia se mantiene prácticamente constante, es decir, $\Phi_{em} \approx 0,012$. Con un descenso del pH de la solución desde 7,0 hasta 2,0 se produce un incremento dramático en el rendimiento cuántico de luminiscencia (de casi 6 veces, ver recuadro **Figura 5.7a**) así como también un desplazamiento batocrómico del máximo de emisión de 410 a 451 nm. Por otro lado, la emisión centrada a 570 nm, la cual se evidenció a pH < 7, se mantiene presente como un hombro en la cola de longitudes de onda largas. Cuando se llevó a cabo el mismo experimento en presencia de NaCl 0,1 M, el descenso de pH de la solución desde 7,0 hasta 2,0 produjo un incremento en el rendimiento cuántico de luminiscencia solamente en un factor de 2 (el espectro no se muestra en la figura).

Cuando se monitoreó el decaimiento de luminiscencia en solución acuosa saturada en aire, a $\lambda_{em} = 451$ nm, τ_{short} y τ_{long} fueron dependientes del pH. Entre pH = 2,0 y pH = 7,0; $\tau_{long} \approx 7$ ns y posteriormente se observó que a pH = 10,0 decreció a $\tau_{long} \approx 4$ ns. No obstante, la especie de decaimiento rápido se mantiene constante entre pH = 2,0 y pH = 5,5 ($\tau_{short} = 2,2$ ns), después alcanza un valor máximo de 3,0 ns a pH = 7; y posteriormente, a pHs más altos, decrece a $\tau_{short} \approx 1,1 - 1,3$ ns (**Tabla 5.4**).

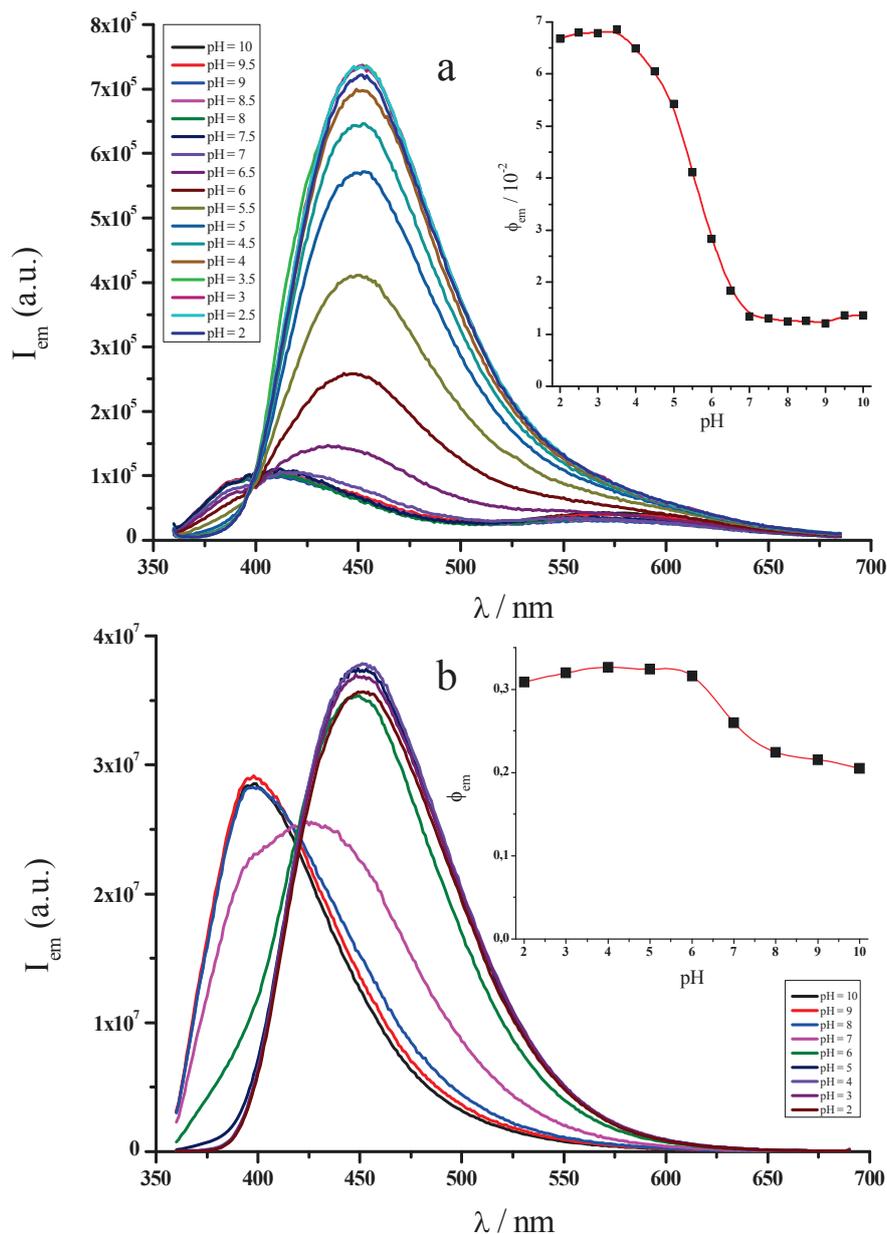


Figura 5.7. Espectros de emisión dependientes del pH para soluciones equilibradas en aire de: **a.** Complejo de Re(I) y **b.** BCS. Cada recuadro muestra la dependencia del pH de los correspondientes rendimientos cuánticos de emisión.

Estos tiempos de vida fueron casi independientes de la concentración de O_2 . Por ejemplo, para las soluciones a $pH = 7$ y saturadas en N_2 , aire y O_2 , respectivamente, $\tau_{short} = 2,9; 3,0$ y $2,6$ ns y $\tau_{long} = 6,6; 6,5$ y $6,0$ ns, respectivamente. Sin embargo, cuando se monitorearon los decaimientos de luminiscencia a $\lambda_{em} = 570$ nm, τ_{short} y τ_{long} , en soluciones saturadas en N_2 , fueron 10 y 105 ns, respectivamente, con un descenso de τ_{long} al incrementarse la concentración de O_2 , ver **Tabla 5.3**.

Tabla 5.4. Tiempos de vida de luminiscencia del complejo de Re(I) ($\lambda_{ob} = 451$ nm) y rendimientos cuánticos en solución acuosa *buffer* saturada en aire y a diferentes pHs.

pH	τ_{short} /ns ($\pm 25\%$)	τ_{long} /ns ($\pm 5\%$)	ϕ_{em} ($\pm 10\%$)
2	2.2	7.1	6.7×10^{-2}
2.5	2.2	7.0	6.8×10^{-2}
3	2.1	7.0	6.7×10^{-2}
3.5	2.3	7.0	6.8×10^{-2}
4	2.3	7.1	6.3×10^{-2}
4.5	1.9	7.0	5.8×10^{-2}
5	2.4	7.0	5.3×10^{-2}
5.5	2.2	7.0	3.9×10^{-2}
6	2.7	7.0	2.8×10^{-2}
6.5	2.9	6.9	1.8×10^{-2}
7	3.0	6.5	1.3×10^{-2}
7.5	2.5	5.0	1.3×10^{-2}
8	2.6	4.7	1.2×10^{-2}
8.5	1.9	4.2	1.2×10^{-2}
9	1.3	3.9	1.1×10^{-2}
9.5	1.1	3.8	1.2×10^{-2}
10	1.4	3.9	1.2×10^{-2}

También se llevó a cabo un estudio similar del efecto del pH sobre la luminiscencia del ligando BCS con propósitos comparativos (**Figura 5.7b**). Así como las 2,9-aril-sustituido 1,10-fenantrolinas,²¹⁷ el ligando BSC experimenta un evento de protonación simple sobre N1-N10 con un $pK_a = 5,7 - 5,8$.²¹⁸ La protonación de los sulfonatos en BCS no se espera a $pH > 2,7$.²¹⁸ La forma no protonada de BCS muestra una luminiscencia centrada a 398 nm. Después de la protonación, hay un desplazamiento batocrómico del máximo de emisión a 451 nm con un incremento en el rendimiento cuántico de luminiscencia desde $\Phi_{em} = 0,20$ a $pH = 10,0$ hasta $\Phi_{em} = 0,33$ a $pH = 4,0$ (recuadro **Figura 5.7b**). El comportamiento ácido-base de la luminiscencia de BCS es consistente con el efecto de protonación/desprotonación sobre la luminiscencia de 2,9-aril-sustituido 1,10-fenantrolinas.²¹⁷ En efecto, la luminiscencia de las 2,9-aril-sustituido 1,10-fenantrolinas es de carácter $^1\pi\pi^*$. En diclorometano, los máximos de emisión, tiempos de vida y rendimientos cuánticos de fluorescencia varían entre $\lambda_{max} \approx 374$ y 408 nm, $\tau \approx 1,2$ y 2 ns y $\Phi_{em} \approx 0,08$ y 0,33 respectivamente. Por otro lado, también en diclorometano, las 2,9-aril-sustituido 1,10-fenantrolinas protonadas muestran máximos de emisión, tiempos de vida y rendimientos cuánticos de fluorescencia que varían entre $\lambda_{max} \approx 474$ y 600 nm, $\tau \approx 3,3$ y 8,7 ns y $\Phi_{em} \approx 0,01$ y 0,50 respectivamente.²¹⁷ Aplicamos entonces técnicas de análisis de regresión bilineal en el estudio de la matriz total de los espectros de luminiscencia de las **Figuras 5.7a y b**. Para

BCS la estimación del número de contribuciones independientes arrojó un $n = 2$. La **Figura 5.8a** muestra el espectro de luminiscencia de las dos especies emisoras con las correspondientes funciones de distribución.

De estas funciones de distribución se pudo obtener un pK_a correspondiente a la protonación/desprotonación del estado excitado, es decir, $pK_a^* = 6,6$. Por lo tanto, el estado excitado $^1\pi\pi^*$ de BCS es menos básico que el estado fundamental en casi un orden de magnitud de K_a . Por otro lado, la estimación del número de especies independientes que contribuyen a los cambios espectrales de la **Figura 5.7a** arrojó un $n = 3$. La **Figura 5.8b** muestra los perfiles espectrales de las tres especies emisoras con las correspondientes funciones de distribución. Después de la comparación entre las **Figuras 5.8a y b** se puede concluir que los espectros en ambas figuras correspondientes a las especies Sp2 son prácticamente los mismos, mientras que los correspondientes a la especie Sp1 son muy similares. Sp1 prevalece a pH entre 10,0 y 7,0 mientras Sp2 es más abundante a $pH < 6,0$. Además, el espectro que corresponde a la especie Sp3 en la **Figura 5.8b** es muy similar al espectro de luminiscencia del complejo de Re(I) en solución acuosa después de la excitación con $\lambda_{exc} = 400$ nm (**Figura 5.6**). Esta especie emite en todo el rango de pH.

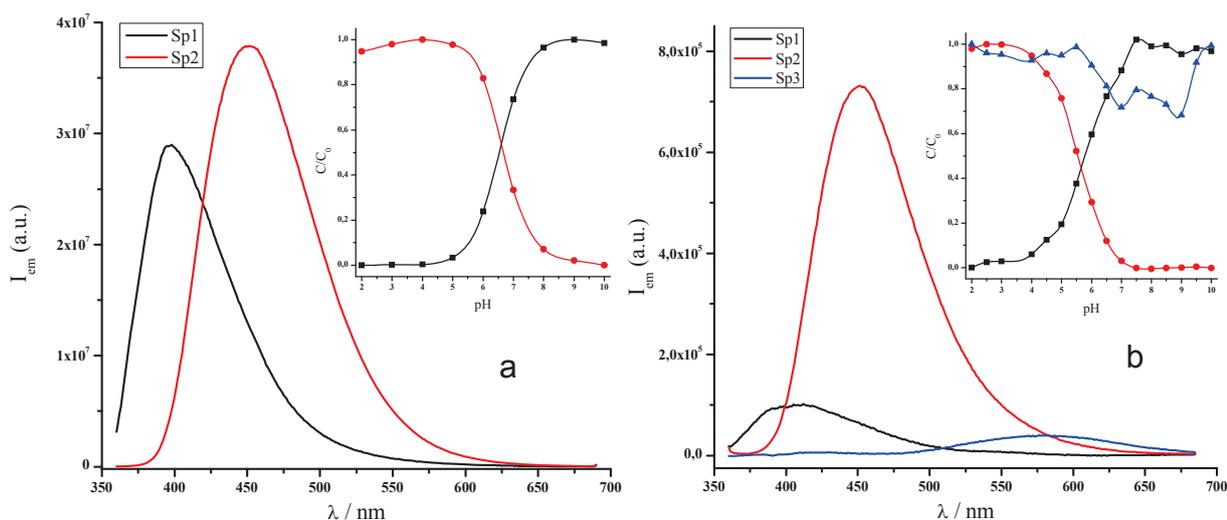


Figura 5.8. a. Espectros de luminiscencia de las dos especies emisoras con sus correspondientes funciones de distribución (ligando BCS y BCS protonado). b. Perfiles espectrales de las tres especies emisoras con las correspondientes funciones de distribución ($[(ClRe(CO)_3(BCS)]^2-$, $[(OH)Re(CO)_3(BCS)]^2-$ y $[(H_2O)Re(CO)_3(BCS)]$).

5.4.5 PROCESOS FOTOFÍSICOS DEL COMPLEJO DE RE(I)

Después de la excitación óptica de los complejos $X\text{Re}(\text{CO})_3\text{L}$ con energías fotónicas ≤ 340 kJ/mol, esto es, en una región de energía donde los estados IL usualmente no son poblados, el primer estado singlete excitado, $^1\text{MLCT}$, da origen a $^3\text{MLCT}$ por cruce intersistemas (ISC) en unos pocos cientos de femtosegundos,¹⁴⁵ dejando decaer al estado $^3\text{MLCT}$ por procesos monomoleculares radiativos y no radiativos, **Ecuaciones 5.8-5.10**,



Las **Ecuaciones 5.8-5.10** reflejan el comportamiento fotofísico de los complejos $X\text{Re}(\text{CO})_3\text{L}$ con $\text{L} = \text{bpy}$ o phen y $\text{X} = \text{CF}_3\text{SO}_3$ y/o py , donde ni bpy , phen , py o CF_3SO_3 tienen estados IL significativos a energías ≤ 340 kJ/mol ($\lambda_{\text{exc}} \geq 350$ nm). Sin embargo, cuando el estado IL tiene una absorción significativa a la energía fotónica usada, su población también tiene que ser tomada en cuenta, **Ecuación 5.11**,



Por comparación con estudios previos,¹⁴⁶ la luminiscencia del complejo $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$ en solventes orgánicos puede ser atribuida a $^3\text{MLCT}$. Además, el carácter triplete del estado excitado emisivo se manifiesta en el efecto de *quenching* intrínseco por el O_2 en solventes orgánicos. La constante de velocidad del *quenching* bimolecular de emisión de $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$ por O_2 (k_q , **Tabla 5.3**) ha sido determinado a partir de las pendientes de los gráficos lineales de Stern-Volmer ($\tau_0/\tau = 1 + k_q\tau_0[\text{O}_2]$) calculados con los valores de los tiempos de vida de emisión en ausencia y presencia de oxígeno (τ_0 en N_2 y τ en aire y en O_2 , respectivamente). La solubilidad del oxígeno a 1,013 bar de aire fue calculada de acuerdo con $[\text{O}_2] = 0,21(P_A - P_v)[\text{O}_2]_{P=1}$,²¹⁹ donde P_A y P_v son la presión atmosférica y la presión de vapor del solvente respectivamente y

$[O_2]_{P=1}$ es la concentración de oxígeno del solvente a 1,013 bar presión parcial de O_2 . La solubilidad del oxígeno saturado a 1,013 bar en solventes orgánicos y agua fue tomada de los valores de la literatura.²²⁰⁻²²¹ Los valores de k_q obtenidos para los tres solventes orgánicos están entre $2,2$ y $2,4 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ mientras $k_q = 3,7 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ en H_2O (**Tabla 5.3**). Estos coinciden con los valores de k_q reportados para complejos similares de $Re(I)$.^{48,220}

Por otra parte, los experimentos de luminiscencia llevados a cabo en medio acuoso son solo compatibles con la presencia de las especies emisivas 1IL y 3MLCT . De hecho, el efecto del pH sobre la luminiscencia del complejo de $Re(I)$ puede ser explicado sobre la base de que coexisten (i) un estado excitado 3MLCT (correspondiente a $Sp3$ en la **Figura 5.8b**) que sigue una moderada dependencia de Φ_{emi} vs. pH y (ii) dos formas de BCS (especies $Sp2/Sp1$ en la **Figura 5.8a**) con un Φ_{emi} fuertemente dependiente del pH. Estas dos formas de BCS coordinado muestran una dependencia sigmoideal de Φ_{emi} vs. pH (similar a la dependencia al pH del Φ_{emi} del ligando BCS, comparación de los recuadros a las **Figuras 5.7a y 5.7b**), con una proporción de $\Phi_{emi, (pH=2)}/\Phi_{emi, (pH=10)} \approx 5,6$. Sin embargo, la proporción de $\Phi_{emi, (pH=2)}/\Phi_{emi, (pH=10)}$ para el ligando BCS libre es solo 1,5. El aumento del Φ_{emi} del complejo de $Re(I)$ a medida que decrece el pH puede ser interpretado en términos de los equilibrios de las **Ecuaciones 5.2-5.3**. En un rango de pH entre 10,0 y 7,0; donde las especies $[ClRe(CO)_3(BCS)]^{2-}$ y $[(OH)Re(CO)_3(BCS)]^{2-}$ están en un equilibrio dependiente del pH, la densidad de carga sobre el Re debería ser casi constante y los BCS coordinados podrían experimentar una carga positiva pequeña y aproximadamente constante, δ^+ . En este rango de pH Φ_{emi} es prácticamente invariable. Hay que notar también que el espectro de emisión de $Sp1$ en la **Figura 5.8b** es más parecido al espectro de BCS a pH = 7,0 que al espectro de BCS a pH = 10,0 (comparar **Figuras 5.7b y 5.8b**), es decir, como si el ligando BCS coordinado hubiera estado experimentando una $\delta^+ \approx +1/2e$ (e = carga electrónica) en el rango de pH entre 10 y 7. En el rango de pH entre 7,0 y 2,0; el reemplazo del Cl por H_2O en la esfera de coordinación del complejo de $Re(I)$ aumenta la carga formal del centro $Re(I)$ a $\delta^+ \approx +1e$, con el consecuente incremento de Φ_{emi} . Es de destacar que cuando el equilibrio de la **Ecuación 5.2**

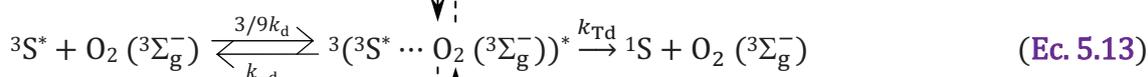
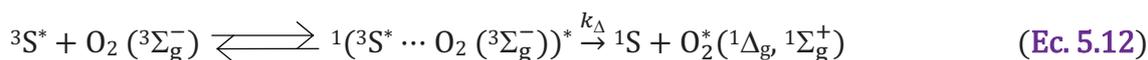
se desplazó hacia la izquierda llevando a cabo el experimento dependiente del pH sobre la luminiscencia del complejo de Re(I) en presencia de un exceso de NaCl, $\Phi_{\text{emi, (pH=2)}} / \Phi_{\text{emi, (pH=10)}}$ fue solo 2, en contraste con el valor $\Phi_{\text{emi, (pH=2)}} / \Phi_{\text{emi, (pH=10)}} = 5,6$ que se observó en ausencia de NaCl. El último experimento claramente demostró que, cuando la concentración del complejo de Re(I) soportando Cl fue aumentada, y por lo tanto la δ^+ media sobre el BCS coordinado se redujo, la emisión de carácter IL centrada en 410 nm se vio favorecida sobre la emisión centrada a 451 nm. El balance dependiente del solvente entre los estados excitados ^1IL y $^3\text{MLCT}$, los cuales modifican las propiedades fotofísicas del complejo de Re(I), es liderado por la sustitución del Cl por el H_2O en medio acuoso. En efecto, los cálculos TD-DFT revelan que en MeOH, donde el complejo de Re(I) tiene la estructura $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$, las transiciones electrónicas singlete-singlete relevantes que conducen a la población de los estados excitados ^1IL y $^3\text{MLCT}$ son $\text{H} \rightarrow \text{L}+1$ (a 358.2 nm), $\text{H}-1 \rightarrow \text{L}$ (a 390.9 nm) y $\text{H}-1 \rightarrow \text{L}+1$ (a 346.0 nm). Los correspondientes porcentajes de transferencia de carga (%CT) para estas transiciones electrónicas son 47, 37 y 38% para $\text{H} \rightarrow \text{L}+1$, $\text{H}-1 \rightarrow \text{L}$ y $\text{H}-1 \rightarrow \text{L}+1$, respectivamente. Bajo PCM, la sustitución del MeOH por H_2O con la misma estructura del complejo de Re(I) tiene mínimos efectos sobre las transiciones electrónicas calculadas por TD-DFT, es decir que $\text{H} \rightarrow \text{L}+1$ (a 357.5 nm), $\text{H}-1 \rightarrow \text{L}$ (a 389.9 nm) y $\text{H}-1 \rightarrow \text{L}+1$ (a 345.2 nm) se obtuvieron con casi el mismo f_{osc} que en el caso de PCM/MeOH. Por otro lado, los cálculos TD-DFT del sistema $[(\text{H}_2\text{O})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^- / \text{PCM}/\text{H}_2\text{O}$ muestran diferencias significativas cuando se compararon con los cálculos TD-DFT de $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-} / \text{PCM}/\text{MeOH}$. Para $[(\text{H}_2\text{O})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^- / \text{PCM}/\text{H}_2\text{O}$, las principales transiciones electrónicas singlete-singlete que conducen a la población de los estados excitados emisores ^1IL y $^3\text{MLLCT}$ son $\text{H} \rightarrow \text{L}$ (a 385.7 nm) y $\text{H} \rightarrow \text{L}+1$ (a 337.2 nm), con 25 y 27 % de CT, respectivamente. Adicionalmente, el descenso importante del % de CT cuando se pasa de $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$ a $[(\text{H}_2\text{O})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^-$ está de acuerdo con el incremento del carácter IL del HOMO en $[(\text{H}_2\text{O})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^-$ (**Tabla 5.2**) relativo a $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$. Por lo tanto, el balance entre $^3\text{MLLCT}$ e ^1IL está inclinado hacia este último en soluciones acuosas y la luminiscencia del complejo de Re(I) está gobernada por los estados ^1IL . En

solventes orgánicos, sin embargo, el resultado es lo contrario y las propiedades fotofísicas del complejo de Re(I) están regidas por los estados excitados $^3\text{MLLCT}$.

5.4.6 GENERACIÓN DE OXÍGENO SINGLETE Y EXPERIMENTOS LIOAS

La generación de oxígeno singlete por el complejo de Re(I) fue estudiada tanto en soluciones de D_2O como de acetonitrilo por medidas de fosforescencia resuelta en el tiempo. La fosforescencia de las soluciones de CH_3CN mostró evidencia clara de la formación de oxígeno singlete. No obstante, la generación de oxígeno singlete no pudo ser detectada en soluciones de D_2O bajo nuestras condiciones experimentales. Se obtuvieron correlaciones lineales a partir de los gráficos de la dependencia de la intensidad de emisión de fosforescencia de oxígeno singlete a tiempo cero, $S(0)$, como función de la energía del láser para complejo y referencia. A partir de estas pendientes y del procedimiento descrito previamente,²²² el rendimiento cuántico de producción de $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ fue $\Phi_\Delta = 0,50 \pm 0,05$ y $\Phi_\Delta \leq 0,05$ en CH_3CN y D_2O , respectivamente.

Con el fin de encontrar una expresión para el rendimiento cuántico de producción de $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ como función de los parámetros del estado excitado del sensibilizador, deben considerarse las diferentes rutas fotofísicas y fotoquímicas involucradas (**Ecuaciones 5.8-5.11**). En presencia de oxígeno, los complejos $\text{XRe}(\text{CO})_3\text{L}$ podrían ser usados como sensibilizadores y se podría producir $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ por transferencia de energía desde su estado excitado ^3S ($^3\text{MLLCT}$) al oxígeno molecular. El mecanismo de *quenching* por oxígeno del estado triplete excitado de un sensibilizador S ya se ha reportado previamente,²²³ (ver **Ecuaciones 5.12-5.14**)



En este mecanismo ${}^3\text{S}^*$ representa el estado triplete excitado del sensibilizador, k_d y k_{-d} representan las constantes de velocidad de difusión controlada para encuentro y separación, respectivamente, de los complejos ${}^{1,3,5}({}^3\text{S}^* \cdots {}^3\text{O}_2)$ y k_{Td} representa el decaimiento del triplete sofocado por el oxígeno molecular. Los superíndices muestran los valores de multiplicidad de las moléculas individuales y de los complejos de colisión bimolecular. Los complejos de encuentro ${}^{1,3}({}^3\text{S}^* \cdots {}^3\text{O}_2)$ podrían evolucionar eventualmente hacia complejos de transferencia de carga, esto es, ${}^{1,3}({}^2\text{S}^{\delta+} \cdots {}^2\text{O}_2^{\delta-})$, lo cual no está representado en el esquema de las **Ecuaciones 5.12 - 5.14**. Sin embargo, Gijzeman et al.²²⁴ y Wilkinson et al.²²⁵ describieron en sus trabajos originales un modelo que supone que la desactivación de los complejos de encuentro ${}^{1,3}({}^3\text{S}^* \cdots {}^3\text{O}_2)$ ocurre por la competencia entre un proceso de desactivación sin transferencia de carga (llamado nCT) y un proceso de transferencia de carga (llamado CT). Las fracciones 1/9, 3/9 y 5/9 son los factores estadísticos de spin, los cuales reflejan la probabilidad estadística de formación de un estado de spin (singlete, triplete o quintuplete) cuando un complejo de encuentro se forma por colisión de dos moléculas en estado triplete.²²⁴ La **Ecuación 5.12** incluye la producción directa de ${}^1\text{O}_2 ({}^1\Delta_g)$ a partir del *quenching* por oxígeno como también ${}^1\text{O}_2 ({}^1\Delta_g)$ a partir de cualquier ${}^1\text{O}_2 ({}^1\Sigma_g^+)$ generado inicialmente. Las flechas punteadas representan el ISC inducido, posiblemente aumentado por el efecto de átomo pesado ejercido por el ion Re(I) entre los canales singlete, triplete y quintuplete. El rendimiento cuántico de producción de oxígeno singlete Φ_Δ está dado por las **Ecuaciones 5.15-5.17**:

$$\Phi_\Delta = \Phi_T P_{\text{O}_2}^T f_{\text{O}_2}^T \quad (\text{Ec. 5.15})$$

$$P_{O_2}^T = \frac{k_q[O_2]}{k_r + k_{nr} + k_q[O_2]} = \tau k_q[O_2] = 1 - \frac{\tau}{\tau_0} = 1 - \frac{I}{I_0} \quad (\text{Ec. 5.16})$$

$$f_{O_2}^T = \frac{k_\Delta}{k_D} \quad (\text{Ec. 5.17})$$

donde Φ_T es el rendimiento cuántico de formación de triplete; $P_{O_2}^T$ es la proporción de estados triplete *sofocados* por O_2 ; $f_{O_2}^T$ es la fracción del estado triplete *sofocado* por O_2 el cual produce 1O_2 ($^1\Delta_g$) (conocido también como eficiencia de formación de oxígeno singlete); k_q es la constante de velocidad de *quenching* total del estado triplete por el O_2 ; τ_0 y τ son los tiempos de vida del triplete en ausencia y presencia de oxígeno, respectivamente. El mecanismo fue originalmente derivado para la generación de oxígeno singlete a partir de los estados triplete del sensibilizador, y por tanto, el ISC entre los complejos $^{1,3,5}(^3S^* \dots ^3O_2)$ de diferente multiplicidad de spin no fue tenido en cuenta.²²⁴ Usando los tiempos de vida de luminiscencia en N_2 y en aire, el valor de $P_{O_2}^T$ calculado en soluciones de CH_3CN es de 0,46. Ya que se ha reportado que Φ_T es la unidad debido al alto grado de acoplamiento espín-órbita en estos sistemas de metales pesados,⁴⁸ cuando se compara con Φ_Δ , este valor de $P_{O_2}^T$ refleja esencialmente que $f_{O_2}^T$ es la unidad. Debido a que k_d en acetonitrilo está alrededor de $3 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$,^{19,48} todos los valores obtenidos de k_q para los complejos son $\leq 1/9 k_d$. Por esto, se observó una predominancia del canal singlete en el mecanismo de generación de oxígeno singlete cuando este complejo se usó como sensibilizador.^{220,223}

La constante de velocidad total $k_D (= k_\Delta + k_{Td})$ se calcula a partir del valor experimental de k_q por la **Ecuación 5.18**:

$$k_D = \frac{k_{-d}k_q}{k_d - k_q} \quad (\text{Ec. 5.18})$$

La constante de velocidad disociativa, k_{-d} , está calculada de acuerdo a $k_{-d}/k_d = 1 \text{ M}$, donde M es la unidad molar por litro.²¹⁹ El valor calculado de k_D es $2,6 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. La constante de velocidad normalizada por la multiplicidad de spin, es $k_{\Delta E}^{nCT} / m$ (es decir, $k_{\Delta E}^{1\Sigma} / 1$, $k_{\Delta E}^{1\Delta} / 1$ y $k_{\Delta E}^{3\Sigma} / 3$ para la formación de $^1O_2(^1\Sigma_g^+)$, 1O_2

($^1\Delta_g$) y $^3O_2(^3\Sigma_g^-)$, respectivamente). Por otra parte, ΔE es la energía en exceso para la formación de $^1O_2(^1\Sigma_g^+)$, $^1O_2(^1\Delta_g)$ y $^3O_2(^3\Sigma_g^-)$ (la diferencia de energía entre la energía de $^3S^*$ y la energía de dichas especies). Para sensibilizadores $^3S^*$ con altos potenciales de oxidación y con mínimas interacciones CT entre $^3S^*$ y O_2 , $k_{\Delta E}^{nCT} / m$ dependerá de (ΔE) de una forma común.²¹⁹ Con el valor conocido de la energía del sensibilizador triplete, se puede calcular la contribución absoluta de la ruta de desactivación que no involucra transferencia de carga (nCT) a la desactivación (**Ecuación 5.19**) con la ayuda de la expresión polinomial de la **Ecuación 5.20** a través de las correspondientes energías de exceso ΔE (en kJ/mol)²¹⁹:

$$k_{\Delta E}^{nCT} = k_{\Delta E}^{1\Sigma} + k_{\Delta E}^{1\Delta} + k_{\Delta E}^{3\Sigma} \quad (\text{Ec. 5.19})$$

$$\log(k_{\Delta E}^{nCT} / ms^{-1}) = 9,05 + 9 \times 10^{-3} \Delta E - 1,15 \times 10^{-4} \Delta E^2 + 1,15 \times 10^{-7} \Delta E^3 + 9,1 \times 10^{-11} \Delta E^4 \quad (\text{Ec. 5.20})$$

donde las energías en exceso (en kJ/mol) son $\Delta E = E_T - 157$, $\Delta E = E_T - 94$ y $\Delta E = E_T = 207.7$ ($\lambda_{em} = 576$ nm in CH_3CN) para $\log k_{\Delta E}^{1\Sigma}$, $\log k_{\Delta E}^{1\Delta}$, y $\log k_{\Delta E}^{3\Sigma}$, respectivamente.²¹⁹ La importancia relativa entre los mecanismos de desactivación por transferencia de carga (CT) y por no transferencia de carga (nCT) se puede evaluar por medio de la cantidad p_{CT} que está definida por la **Ecuación 5.21**, como el peso relativo de desactivación por transferencia de carga referida a la desactivación total del estado excitado por O_2 .

$$p_{CT} = \frac{k_D - k_{\Delta E}^{nCT}}{k_D} \quad (\text{Ec. 5.21})$$

El valor calculado de $k_{\Delta E}^{nCT}$ es $2,1 \times 10^9$ s⁻¹. De esta manera, el valor calculado de $k_{\Delta E}^{nCT}$ es muy cercano al experimental k_D , con un $p_{CT} \sim 0,11$; implicando una dominancia del mecanismo nCT en la desactivación total del estado excitado por el O_2 .

El hecho de que no se genere $^1O_2(^1\Delta_g)$ en solución acuosa está relacionado con dos factores: (i) la baja emisión 3MLLCT (ver que en la **Tabla 5.4** el $\Phi_{emi}(Sp3)$ está siempre por debajo de 5×10^{-3}) y (ii) la baja proporción de estados triplete desactivados por O_2 en ese solvente (a partir de los tiempos de

vida de luminiscencia de la **Tabla 5.3**, se puede calcular un valor de solo $P_{O_2}^T = 0,09$). Esto coincide con nuestros resultados previos en relación con la generación fotosensibilizada de oxígeno singlete a partir de complejos de Re(I) relacionados estructuralmente: cuando los rendimientos cuánticos de luminiscencia fueron más bajos que $\Phi_{emi} \sim 10^{-3}$ no se observó generación de $^1O_2(^1\Delta_g)$.²²⁰

En cuanto a los experimentos LIOAS, pudimos ver que la señal fotoacústica en ambos solventes mostró el mismo comportamiento: sin desplazamientos del tiempo o cambios de forma, con respecto a la señal de la referencia calorimétrica (Recuadro **Figura 5.9** para soluciones acuosas *buffer*). Se obtuvieron relaciones lineales entre H y la fluencia de excitación del láser (F) tanto para muestras como para referencias en ambos solventes a diferentes absorbancias (A), en un rango de fluencia entre 1 y 30 J/m². La relación entre las pendientes de estas líneas para muestra y referencia arrojó los valores de α para las muestras. Para el complejo en solución de CH₃CN, las pendientes dependieron de la atmósfera específica y fueron diferentes del compuesto referencia (CR) en presencia de oxígeno, mientras que para las soluciones acuosas estas fueron independientes de la concentración de O₂, como se muestra en la **Figura 5.9**. De estos gráficos, considerando que $\alpha_R = 1$ para CR, los valores de α fueron calculados para el complejo en ambos solventes. Para el caso de la solución acuosa *buffer*, se obtuvo la misma pendiente que para CR medida a las mismas condiciones experimentales como se muestra en la **Figura 5.9**. Un comportamiento similar se observó en las soluciones de complejo de Re(I) en CH₃CN en ausencia de oxígeno. Por tanto, se obtuvo un valor de $\alpha = 1,00 \pm 0,04$ en soluciones acuosas o de CH₃CN en ausencia de oxígeno. Consecuentemente, en estas condiciones, este complejo liberó al medio toda la energía absorbida como calor rápido (integrado por el transductor) en un proceso más rápido que $\tau_R/5$. Para las soluciones de CH₃CN saturadas en oxígeno, las pendientes observadas en los gráficos de H vs F fueron más bajas que las de CR y el valor de α obtenido fue de $0,86 \pm 0,05$.

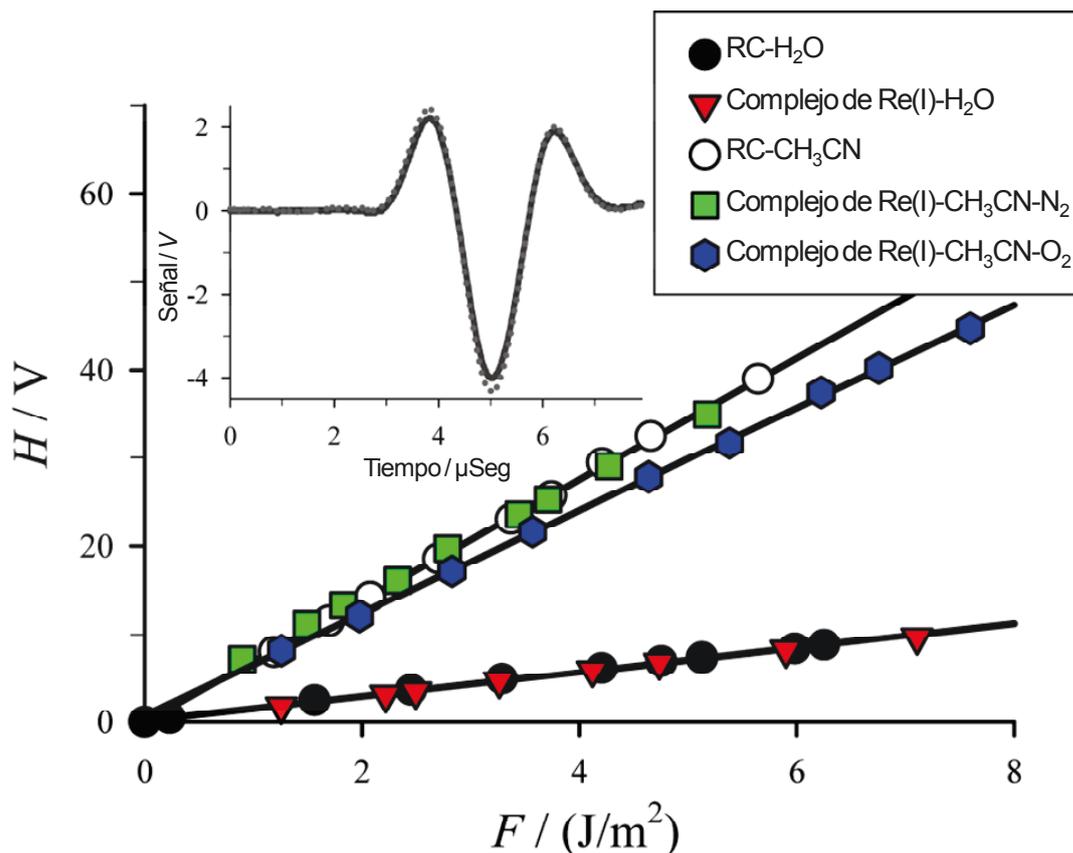


Figura 5.9. Amplitud de la señal fotoacústica como función de la fluencia del láser para (i) solución acuosa buffer a pH = 7,0: New coccine (RC, ●), complejo de Re(I) (▼) y (ii) soluciones en CH₃CN: 2- Hidroxibenzofenona (RC, ○), complejo de Re(I) (N₂, ■; O₂, ◆). Recuadro: señal fotoacústica normalizada de solución buffer a pH = 7 para la RC (New Coccine, línea punteada) y para el complejo de Re(I) (línea sólida) con absorbancias cercanas a 0,105 (± 0,001).

Estos valores combinados con los datos de fluorescencia y rendimiento cuántico de producción de oxígeno singlete completaron el balance de energía que se puede ver en la **Ecuación 5.22**:

$$E_a = \Phi_{\text{emi}} E_{\text{emi}} + \alpha E_a + \Phi_{\text{st}} E_{\text{st}} \quad (\text{Ec. 5.22})$$

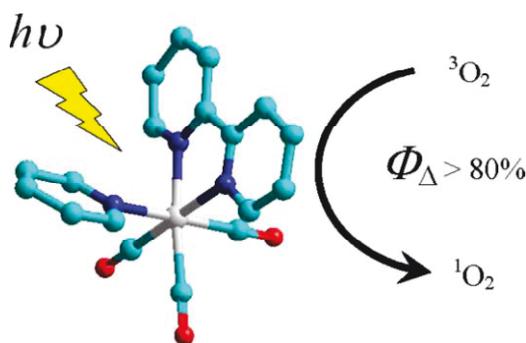
Donde Φ_{emi} es el rendimiento cuántico de emisión, E_{emi} es la energía de luminiscencia 0-0, E_a es la energía molar del pulso láser (hc/λ_{exc}), E_{st} es el contenido de energía molar de las especies formadas con un rendimiento cuántico Φ_{st} que almacena energía por un tiempo más largo que el tiempo de integración de calor y decae con un tiempo de vida τ . Cuando el oxígeno singlete actúa como una especie almacenadora, los valores correspondientes para estas especies son $\Phi_{\text{f}} = 0$, $\Phi_{\text{st}} = \Phi_{\Delta}$ y $\tau = \tau_{\Delta}$. Ya que en acetonitrilo $\tau_{\Delta} \sim 40 \mu\text{s}$,²²³ $^1\text{O}_2$ ($^1\Delta_{\text{g}}$) actúa como almacenador de energía dentro del tiempo de resolución del experimento LIOAS.

5.5 CONCLUSIONES PARCIALES

La luminiscencia estacionaria y resuelta en el tiempo, los estudios calorimétricos, así como también los cálculos TD-DFT, revelaron que las propiedades fotofísicas del complejo $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$ están lideradas por la interacción entre los estados $^3\text{MLLCT}$ e IL. En solventes orgánicos como CH_3CN o MeOH , prevalecen los estados $^3\text{MLLCT}$ y se observó el comportamiento usual esperado: desplazamiento batocrómico del máximo de emisión, y una disminución del rendimiento cuántico de luminiscencia y del tiempo de vida del estado excitado al aumentar la polaridad del solvente. Además, se generó $^1\text{O}_2$ con rendimientos cuánticos altos ($\Phi_\Delta \approx 0.5$ en CH_3CN) por el *quenching* de la luminiscencia de $^3\text{MLLCT}$ por $^3\text{O}_2$. La constante de velocidad de *quenching* total del estado triplete por el oxígeno, k_q , alcanza valores entre $2,2$ y $2,4 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ en los tres solventes orgánicos estudiados. En CH_3CN , la fracción de los estados triplete desactivados por el O_2 que produjo $^1\text{O}_2$, $f_{\text{O}_2}^{\text{T}}$, es casi la unidad. En soluciones acuosas, sin embargo, debido a la hidrólisis del complejo de $\text{Re}(\text{I})$, el comportamiento fotofísico se ve alterado dramáticamente por el reemplazo del Cl por H_2O en la esfera de coordinación del metal. La contribución de la luminiscencia de carácter $^3\text{MLLCT}$ al Φ_{em} cae y el estado IL gobierna el comportamiento fotofísico. Una consecuencia directa es que $^1\text{O}_2$ no se genera en solución acuosa. Además, la variación del pH de la solución modifica las propiedades fotofísicas del complejo de $\text{Re}(\text{I})$ mediante el cambio de las cantidades relativas de las especies $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$, $[(\text{OH})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$ y $[(\text{H}_2\text{O})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^-$. A valores de pH comprendidos entre $10,0$ y $7,0$; donde prevalecen las especies $[(\text{OH})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$ y $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$, la luminiscencia del complejo de $\text{Re}(\text{I})$ es dominada por el estado IL del ligando coordinado BCS. La forma del espectro de emisión en este rango de pH está entre las formas del espectro de fluorescencia del BCS protonado y simple, sugiriendo que en el complejo de $\text{Re}(\text{I})$ el ligando coordinado emisor BCS estaría experimentando una carga positiva de $\delta^+ \approx +\frac{1}{2}e$. Adicionalmente, hay una contribución menor (por debajo del 30%) de los estados $^3\text{MLLCT}$ a la emisión total. En este rango de pH el

rendimiento cuántico de luminiscencia se mantiene prácticamente constante, es decir $\Phi_{em} \approx 0,012$. El descenso del pH de la solución desde 7,0 hasta 2,0 produce un importante incremento en el rendimiento cuántico de luminiscencia $\Phi_{em} \approx 0,067$; en casi unas 6 veces, así como la especie predominante se convierte en $[(H_2O)Re(CO)_3(BCS)]^-$. A $pH < 5$, la emisión es dominada por la fluorescencia del estado IL. Un comportamiento similar se evidencia por la dependencia del pH de los tiempos de vida de luminiscencia del complejo de Re(I). Los cálculos TD-DFT revelan que en MeOH, donde el complejo de Re(I) presenta la estructura $[ClRe(CO)_3(BCS)]^{2-}$, las transiciones electrónicas singlete-singlete relevantes que lideran la población de los estados excitados emisores 1IL y 3MLCT son $H \rightarrow L+1$, $H-1 \rightarrow L$ and $H-1 \rightarrow L+1$. Los porcentajes de transferencia de carga correspondientes (%CT) para estas transiciones electrónicas son 47, 37 y 38%, respectivamente. Por otro lado, los cálculos TD-DFT del sistema $[(H_2O)Re(CO)_3(BCS)]^-/PCM/H_2O$ muestran diferencias significativas cuando se comparan con los cálculos TD-DFT de $[ClRe(CO)_3(BCS)]^{2-}/PCM/MeOH$. El correspondiente %CT de las transiciones electrónicas singlete-singlete relevantes del sistema $[(H_2O)Re(CO)_3(BCS)]^-/PCM/H_2O$ cae a $\sim 25 - 27\%$ en concordancia con el incremento del carácter IL del HOMO en $[(H_2O)Re(CO)_3(BCS)]^-$ relativo a $[ClRe(CO)_3(BCS)]^{2-}$. Por lo tanto, el balance entre 3MLLCT e 1IL en solución acuosa está inclinado hacia este último y la luminiscencia del complejo de Re(I) está gobernada por los estados 1IL . En los solventes orgánicos, sin embargo, el resultado es el contrario y las propiedades fotofísicas del complejo de Re(I) están dictadas por los estados excitados 3MLLCT .

6 CAPÍTULO III. GENERACIÓN FOTOSENSIBILIZADA DE OXÍGENO SINGLETE A PARTIR DE COMPLEJOS DE RE(I): UN ESTUDIO FOTOFÍSICO USANDO LIOAS Y TÉCNICAS LUMINISCENTES



6.1 RESUMEN

En este capítulo se reportan los rendimientos cuánticos y las eficiencias de producción de $^1\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$) de complejos de Re(I) en solución de acetonitrilo junto con algunas de sus propiedades fotofísicas. Se probaron complejos de Re(I) del tipo $\text{L}_S\text{-CO}_2\text{-Re(CO)}_3(\text{bpy})$ ($\text{L}_S = 2\text{-pirazina, 2-naftaleno, 9-antraceno, 1-pireno, 2-antraquinona}$) como fotosensibilizadores para la producción de $^1\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$) en soluciones de acetonitrilo saturadas en aire. Dependiendo de la naturaleza del complejo de Re(I) usado, los estados excitados responsables de la generación de $^1\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$) pueden ser tanto transferencia de carga metal-ligando ($^3\text{MLCT}$) como un estado centrado en el ligando (^3LC). Con los complejos del tipo $\text{L}_S\text{-CO}_2\text{-Re(CO)}_3(\text{bpy})$ que soportan los ligandos antraceno y pireno hay producción de $^1\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$) con altos rendimientos cuánticos debido al *quenching* por oxígeno de los estados ^3LC (Φ_Δ entre 0,8 y 1,0), mientras que los complejos que soportan los ligandos $\text{L}_S = 2\text{-antraquinona, 2-pirazina y 2-naftaleno}$ no producen $^1\text{O}_2$. Todas las eficiencias de oxígeno singlete obtenidas experimentalmente son consistentes con los datos calorimétricos y de

luminiscencia para los complejos estudiados. Con los complejos del tipo L_S - $CO_2-Re(CO)_3(bpy)$ se utilizaron los experimentos calorimétricos en el cálculo de los rendimientos cuánticos de formación de tripletes; esto es $\Phi_T = 0,76$ y $0,83$ para los estados triplete del antraceno y del pireno, respectivamente.

6.2 INTRODUCCIÓN

El oxígeno singlete, $^1\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$), al ser una especie reactiva oxidante muy fuerte, es un intermedio clave en diferentes procesos químicos tales como reacciones de foto-oxidación, así como también en procesos biológicos incluyendo ruptura en el ADN y terapia fotodinámica del cáncer.²²⁶⁻²²⁷ Últimamente, se usa para eliminar tumores malignos y destruir tejidos no deseados. Por lo tanto, es de gran interés la investigación sobre sensibilizadores que puedan producir $^1\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$) con altas eficiencias gracias a su importancia tanto en fotoquímica como en fotobiología.²²⁸⁻²³⁰

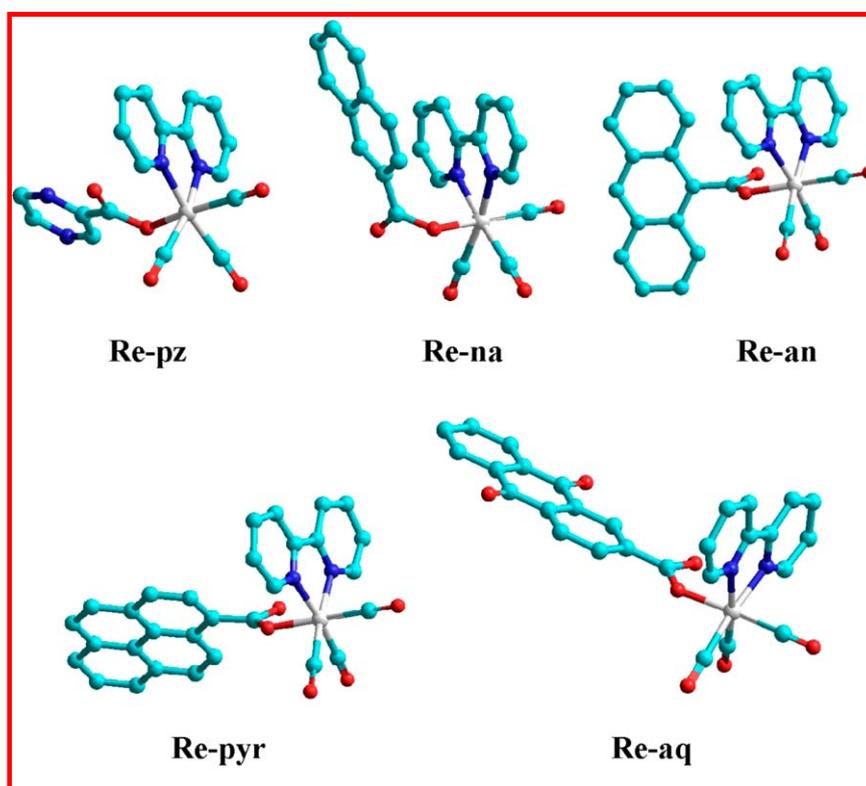
Usualmente, la producción de $^1\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$) involucra transferencia de energía electrónica desde el estado triplete excitado de un sensibilizador, generalmente un colorante orgánico, al estado triplete fundamental del oxígeno molecular. En lo que respecta a complejos de metales de transición, algunos complejos de Cr(III), Ru(II) y Os(II) han sido usados como sensibilizadores en la generación de $^1\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$).²³¹⁻²³⁷ Es interesante resaltar que, en general, los complejos de Ru(II) coordinados a ligandos polipiridínicos han mostrado ser unos eficientes fotosensibilizadores, con eficiencias reportadas $>80\%$.^{227,234} No obstante, la escases de ejemplos encontrados en la literatura de complejos tricarbónicos de Re(I) trabajando como sensibilizadores de $^1\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$) es llamativa ya que estos compuestos continúan siendo muy atractivos debido a su aplicabilidad en un amplio número de áreas de investigación como ya se ha mencionado en secciones anteriores.

En este capítulo exploramos la eficiencia en la producción de $^1\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$) usando complejos no luminiscentes de fórmula general $\text{L}_s\text{-CO}_2\text{-Re(CO)}_3(\text{bpy})$, donde el ligando espectador L_s es un reconocido y altamente eficiente sensibilizador de $^1\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$) como el antraceno, antraquinona o pireno. Además, también se presenta una caracterización fotoacústica y de luminiscencia de los complejos de Re(I) usados como fotosensibilizadores, usando espectroscopía optoacústica inducida por láser (LIOAS, por sus siglas en inglés) y técnicas de

luminiscencia tanto estacionarias como resueltas en el tiempo para entender mejor los factores energéticos que afectan principalmente la eficiencia en la generación de oxígeno singlete con estos complejos. Todas las eficiencias de producción de oxígeno singlete determinadas experimentalmente son consistentes con los datos calorimétricos y de luminiscencia para los complejos estudiados.

6.3 MATERIALES

El acetonitrilo empleado fue grado HPLC de J. T Baker y se usó sin purificación adicional. Los reactivos 2-hidroxibenzofenona, 9-antraceno-COOH, 1-pireno-COOH y 2-antraquinona-COOH fueron proporcionados por Aldrich a la más alta pureza disponible y se usaron tal cual se recibieron. Por otra parte, disponíamos de los complejos *fac*-L_S-CO₂-Re(CO)₃(bpy) (con L_S = 2-pirazina, 2-naftaleno, 9-antraceno, 1-pireno, 2-antraquinona) de trabajos previos de nuestro grupo de investigación.^{24,28,238} De aquí en adelante, y para hacerlo más simple, los complejos y compuestos orgánicos se describirán con los acrónimos mostrados en negrita como se explica a continuación: 2-hidroxibenzofenona (**2-HBP**), 9-antraceno-COOH (**9-an**), 1-pireno-COOH (**1-pyr**), 2-antraquinona-COOH (**2-aq**), 2-pirazina-CO₂-Re-(CO)₃(bpy) (**Re-pz**), 2-naftaleno-CO₂-Re(CO)₃(bpy) (**Re-na**), 9-antraceno-CO₂-Re(CO)₃(bpy) (**Re-an**), 1-pireno-CO₂-Re(CO)₃(bpy) (**Re-pyr**) y 2-antraquinona-CO₂-Re-(CO)₃(bpy) (**Re-aq**), (ver **Esquema 6.1**).



Esquema 6.1. Formulas estructurales y Abreviaciones usadas para los complejos de Re(I) estudiados

6.4 SECCIÓN EXPERIMENTAL

6.4.1 MEDIDAS FOTOFÍSICAS

Los espectros UV-vis fueron tomados en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1800. Todos los experimentos fotofísicos fueron desarrollados a temperatura ambiente (295 ± 3 K). Los espectros de emisión fueron obtenidos con un espectrofluorómetro de investigación Fluorolog-3. Los espectros fueron corregidos como se explicó en el punto 5.3.2. Las soluciones fueron saturadas burbujeando O_2 puro con un sistema regulador del gas antes de que los espectros fueran obtenidos. La instrumentación para la luminiscencia resuelta en el tiempo se ha explicado anteriormente (Ver **Esquema 3.7** y texto correspondiente).

Las medidas fotoacústicas fueron hechas usando una configuración ya especificada (**Esquema 3.12** y texto correspondiente).^{158,239}

Para el procesamiento de las señales LIOAS, usamos la **Ecuación 5.1**, la cual se explica en el apartado 5.3.2.

6.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.5.1 EXPERIMENTOS LIOAS

Las señales optoacústicas de todas las muestras estudiadas mostraron el mismo comportamiento: sin cambios en tiempo ni en forma con respecto a la señal de la referencia calorimétrica ([Figura 6.1](#)).

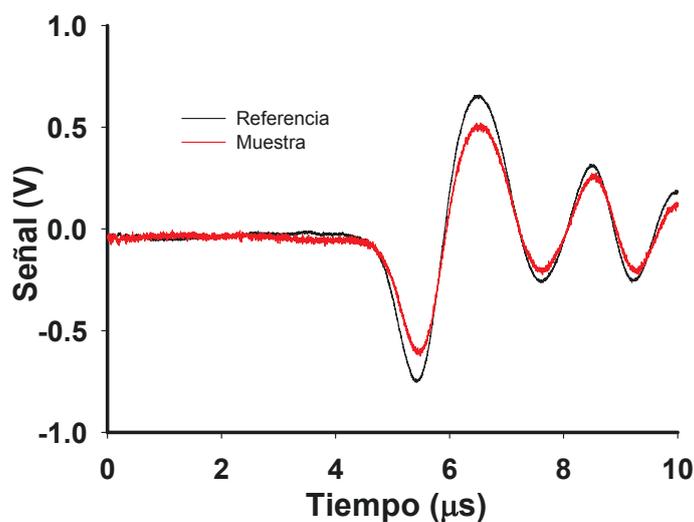


Figura 6.1. Señal acústica para una muestra (Línea roja) sin corrimiento en la fase con respecto al compuesto referencia (Línea negra).

Para los casos de **Re-pz**, **Re-na**, y **Re-aq**, el comportamiento de H Vs F , medido a la misma absorbancia (A) bajo atmósfera de O_2 o N_2 , mostró una dependencia lineal con la misma pendiente. Cuando se comparó con la referencia calorimétrica, **2-HBP**, a la misma A , se obtuvo la misma pendiente como se muestra en la [Figura 6.2](#) para **Re-pz**.

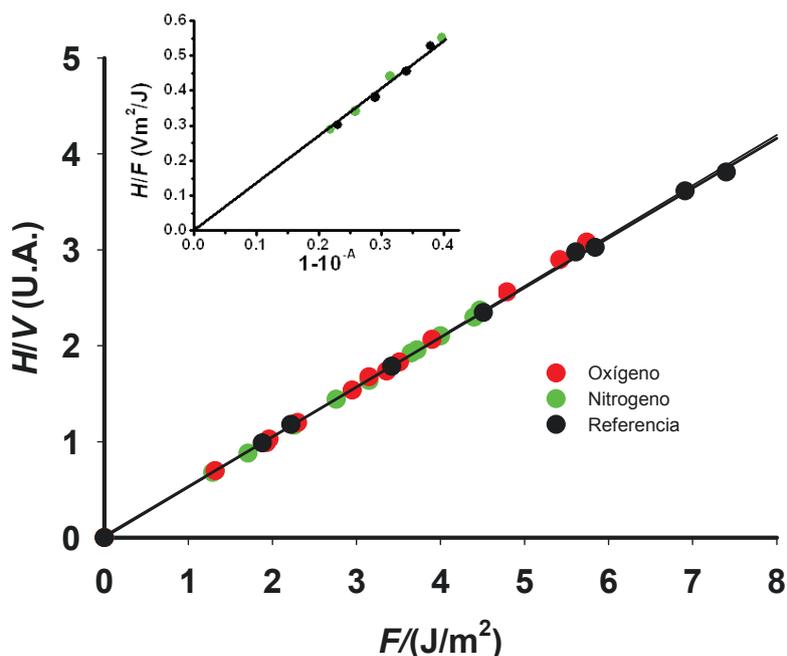


Figura 6.2. Amplitud de las señales fotoacústicas como función de la fluencia del láser para soluciones en acetonitrilo de Re-pz (N₂, ●; O₂, ●) y 2-HBP (aire, ●). Las soluciones de Re-pz y 2-HBP se igualaron dentro de un 2% de absorbancia a 355 nm. **Recuadro:** amplitud de las señales fotoacústicas normalizadas con la fluencia como función de la energía absorbida para soluciones en acetonitrilo de Re-pz (N₂, ●) y 2-HBP (aire, ●).

Estas dependencias lineales mostraron una buena reproducibilidad para diferentes A a fluencias $F \leq 30 \text{ J/m}^2$. Para los complejos **Re-an** y **Re-pyr**, las pendientes dependieron de la atmósfera correspondiente (O₂ o N₂) y/o fueron diferentes de la referencia calorimétrica (**Figura 6.3**).

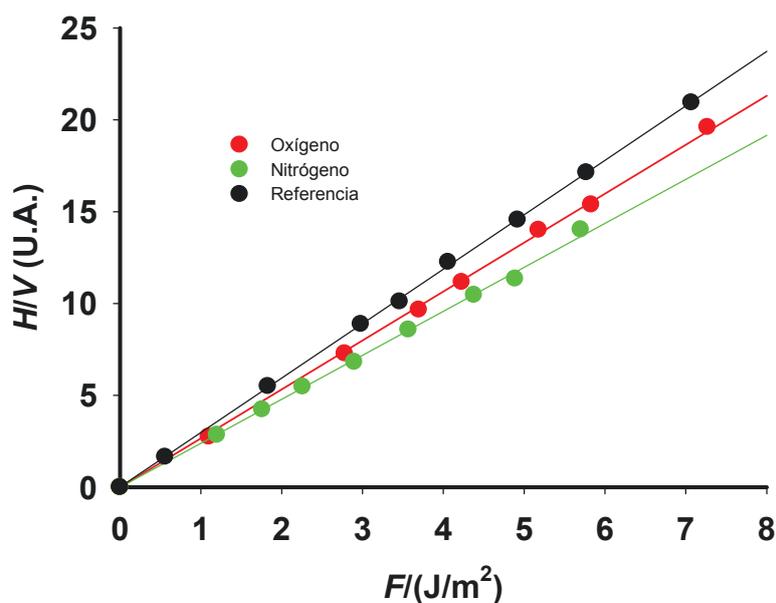


Figura 6.3. Amplitud de las señales fotoacústicas como función de la fluencia del láser para soluciones en acetonitrilo de Re-pyr (N₂, ●; O₂, ●) y 2-HBP (aire, ●). Las soluciones de Re-pyr y 2-HBP se igualaron dentro de un 2% a la absorbancia a 355 nm.

De estos gráficos, considerando que la fracción de la energía liberada al medio como calor rápido (α) es $\alpha_r = 1$ para **2-HBP**, la relación de los valores de H/F obtenidos para muestra y referencia dan los valores de α listados en la **Tabla 6.1**.

Tabla 6.1. Datos calorimétricos de los complejos $L_S\text{-CO}_2\text{-Re(CO)}_3(\text{bpy})$ y ligandos relacionados en acetonitrilo ($\lambda_{\text{exc}} = 355 \text{ nm}$)

Compuesto	$\alpha(\text{N}_2) (\pm 0.05)$	$\alpha(\text{O}_2) (\pm 0.05)$
Re-pz	1.00	1.00
Re-na	1.00	0.95
Re-an	0.60	0.78
Re-pyr	0.50	0.72
Re-aq	0.99	0.99

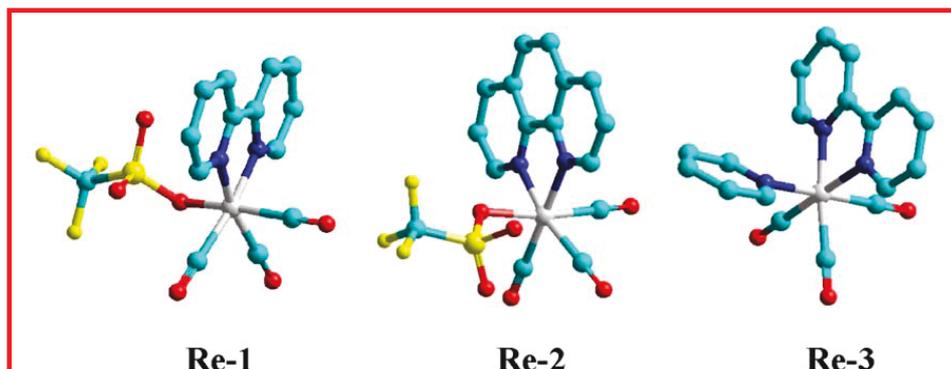
Así, se obtuvieron los valores de $\alpha = 1.00 \pm 0,05$ (tanto en O_2 como en N_2) para **Re-pz**, **Re-na** y **Re-aq**. Consecuentemente, estos complejos liberaron al medio toda la energía absorbida como calor rápido (integrado por el transductor) en un proceso más rápido que $\tau_R/5$. Para **Re-pyr** se obtuvieron valores de $\alpha(\text{O}_2) = 0,72 \pm 0,05$ y $\alpha(\text{N}_2) = 0,50 \pm 0,05$, mientras que para **Re-an** los valores correspondientes fueron $\alpha(\text{O}_2) = 0,78 \pm 0,05$ y $\alpha(\text{N}_2) = 0,60 \pm 0,05$. Estos valores combinados con los datos de fluorescencia y rendimiento cuántico de formación de oxígeno singlete encajan en el balance de energía de la **Ecuación 5.22**,

6.5.2 GENERACIÓN DE OXÍGENO SINGLETE

En esta sección se informan los rendimientos cuánticos de formación de oxígeno singlete para los complejos **Re-pz**, **Re-na**, **Re-aq**, **Re-pyr** y **Re-an**. Asimismo, se establece una comparación de los mismos con tres complejos con altos valores de producción de $^1\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$) (**Tabla 6.2**) del tipo $\text{XRe(CO)}_3\text{L}$, estudiados también por nuestro grupo de investigación y a los cuales denominaremos en este aparte como **Re1**, **Re2** y **Re3** (**Esquema 6.2**) y cuyo comportamiento se ha descrito en el punto 5.4.5 (**Ecuaciones 5.8-5.11**)

Tabla 6.2. Datos calorimétricos y de oxígeno singlete de los complejos XRe(CO)₃L en acetonitrilo ($\lambda_{exc} = 355 \text{ nm}$)²²⁰

Compuesto	$\alpha(\text{N}_2)(\pm 0,05)$	$\alpha(\text{O}_2)(\pm 0,05)$	$\Phi_{\Delta}(\text{aire})(\pm 0,05)$	$P_{\text{O}_2}^T = 1 - \tau/\tau_0$	$P_{\text{O}_2}^T = 1 - I/I_0$	$P_{\text{O}_2}^T$	$f_{\text{O}_2}^T$
Re-1	0.60	0.81	0.63	0.68	0.63	0.66	0.95
Re-2	0.33	0.80	0.89	0.84	0.84	0.84	1.02
Re-3	0.83	0.81	0.51	0.49	0.50	0.50	1.02



Esquema 6.2. Formulas estructurales y Abreviaciones usadas para los complejos de comparación con los complejos de Re(I) estudiados

Sin embargo, este no es el caso dentro de la familia de los complejos con fórmula general fac-L_S-CO₂-Re(CO)₃L, porque **Re-an**, **Re-pyr** y **Re-aq** continúan teniendo absorciones LC significativas^{200,220,238} a energías ≤ 340 kJ/mol; por lo tanto, después de la excitación fotónica, se producen tanto el estado excitado MLCT como el LC (**Ecuaciones 6.6 y 6.7**),



donde ³LC representa el estado excitado triplete del antraceno, pireno y antraquinona en los complejos [L_S-CO₂-Re(CO)₃L]. Debido a que el naftaleno no tiene absorciones significativas a $\lambda_{exc} \geq 350 \text{ nm}$, solamente ¹MLCT es poblado después de la excitación fotónica de **Re-na** con energías $\leq 340 \text{ nm}$ kJ/mol.²³⁸ De hecho, las propiedades fotofísicas de L_S-CO₂-Re(CO)₃(bpy) son muy diferentes de aquellas de **Re-1**, **Re-2** y **Re-3**: mientras que los complejos L_S-CO₂-Re(CO)₃(bpy) son prácticamente no luminiscentes ($\Phi_{lum} \leq 5 \times 10^{-3}$),^{200,238} **Re-1**, **Re-2** y **Re-3** son excelentes luminóforos, con valores

reportados de Φ_{lum} entre 0,3 y 0,5 en atmósfera de N_2 para **Re-1** y **Re-3** en solventes apróticos como diclorometano y acetonitrilo.^{143,220,240-241} Sin embargo, bajo atmósfera de O_2 , sus luminiscencias se ven fuertemente desactivadas.

Por otro lado, tras la excitación fotónica, los estados excitados generados en los complejos **Re-an** y **Re-pyr** son principalmente de carácter LC correspondientes a los tripletes de los ligandos L_s (**9-an** y **1-pyr**) con tiempos de vida reportados para el triplete de $\tau_\tau = 6,9$ y $7,4 \mu s$ para **Re-an** y **Re-pyr**, respectivamente.²⁰⁰ Sin embargo, con el complejo **Re-aq**, las absorciones LC se ven desplazadas a longitudes de onda más cortas (con respecto a las absorciones MLCT) y, por efecto de la excitación fotónica, el estado excitado MLCT es principalmente poblado con solo menores contribuciones (<10%) de las absorciones LC del ligando **2-aq**²³⁸ (ver **Figura 6.4**). El tiempo de vida del estado triplete del ligando antraquinona en el complejo **Re-aq** es $\tau_\tau = 4,9 \mu s$.²³⁸ Debido a lo anterior, en presencia de oxígeno, los complejos $L_s-CO_2-Re(CO)_3(bpy)$ podrían ser usados como sensibilizadores y podrían producir 1O_2 ($^1\Delta_g$) por transferencia de energía del 3LC al oxígeno molecular como se explica en la **Ecuación 6.8**,



donde k_Δ representa la constante de velocidad del proceso de transferencia de energía desde 3S para producir 1O_2 ($^1\Delta_g$).

El mecanismo de *quenching* por oxígeno del estado triplete excitado de un sensibilizador S se muestra en las **Ecuaciones 5.12-5.14**, y el rendimiento cuántico de producción de oxígeno singlete (Φ_Δ) a partir del *quenching* del estado triplete por el oxígeno está dado por las **Ecuaciones 5.15-5.17**, como se detalló en el capítulo anterior.

Los rendimientos cuánticos de producción de oxígeno singlete para los complejos **Re-pz**, **Re-na**, **Re-an**, **Re-pyr** y **Re-aq**, y para los ligandos **9-an**, **1-pyr** y **2-aq** se reportan en la **Tabla 6.3**.

Tabla 6.3. Datos del rendimiento en la producción de oxígeno singlete de los complejos $L_S\text{-CO}_2\text{-Re(CO)}_3(\text{bpy})$ y ligandos relacionados en acetonitrilo ($\lambda_{\text{exc}} = 355 \text{ nm}$)

Compuesto	Φ_{Δ} (aire) (± 0.05)
Re-pz	<0.05
Re-na	<0.05
Re-an	0.78
Re-pyr	0.95
Re-aq	<0.05
9-an	0.25
1-pyr	0.27
2-aq	0.49

Re-pz y **Re-na** no generaron $^1\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$), en concordancia con la ausencia de estados LC disponibles para poblarse a $\lambda_{\text{exc}} = 355 \text{ nm}$ y su bajo rendimiento cuántico de luminiscencia a partir de sus estados MLCT. Por otro lado, **Re-pyr** generó $^1\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$) con un Φ_{Δ} cercano a la unidad mientras que **Re-an** mostró un $\Phi_{\Delta} = 0,78$. Debido a que ni **Re-pyr** ni **Re-an** tienen una luminiscencia significativa que pudiera ser sofocada por oxígeno, es decir, $\Phi_{\text{em}} \sim 4 \times 10^{-3}$, la producción de $^1\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$) en estos complejos puede provenir solo de la transferencia de energía de sus estados ^3LC que, como se ha dicho antes, se ven poblados principalmente a $\lambda_{\text{exc}} = 355 \text{ nm}$ después del ISC del ^1LC . Los valores de Φ_{Δ} para los ligandos libres **9-an** y **1-pyr**, los cuales están alrededor de 0,25 para ambos, reflejan el hecho de que tanto los canales singlete (**Ecuación 5.12**) como triplete (**Ecuación 5.13**) están igualmente involucrados en la producción de $^1\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$). Los valores más altos de Φ_{Δ} observados para **Re-an** y **Re-pyr** comparados con aquellos correspondientes a los ligandos libres indican el ISC inducido por efecto del ion Re(I) entre los canales singlete, triplete y quintuplete en el esquema cinético de las **Ecuaciones 5.12-5.14**.

Con los datos calorimétricos (valores de α en N_2) y el balance de energía de la **Ecuación 5.22**, se obtuvieron los valores de rendimiento cuántico de formación de triplete $\Phi_T = 0,76$ y $0,83$ para **Re-an** y **Re-pyr**, respectivamente. El valor de $\Phi_T = 0,76$ para **Re-an**, aunque un poco más grande, coincide con el valor de la literatura para el antraceno, el cual está entre $0,66$ y $0,72$.²⁴² El valor de $\Phi_T = 0,83$ para **Re-pyr** es más del doble que el Φ_T para el pireno,²⁴³ indicando un

aumento del ISC debido al efecto de metal pesado en **Re-pyr**. Este efecto de metal pesado en el Φ_T es mucho más pronunciado en **Re-pyr** que en **Re-an**. Esto se debe probablemente al coeficiente de extinción del pireno que es más alto que el del antraceno²⁰⁰ (**Figura 6.4**) a la longitud de onda de excitación del láser usado en los experimentos LIOAS (355 nm).

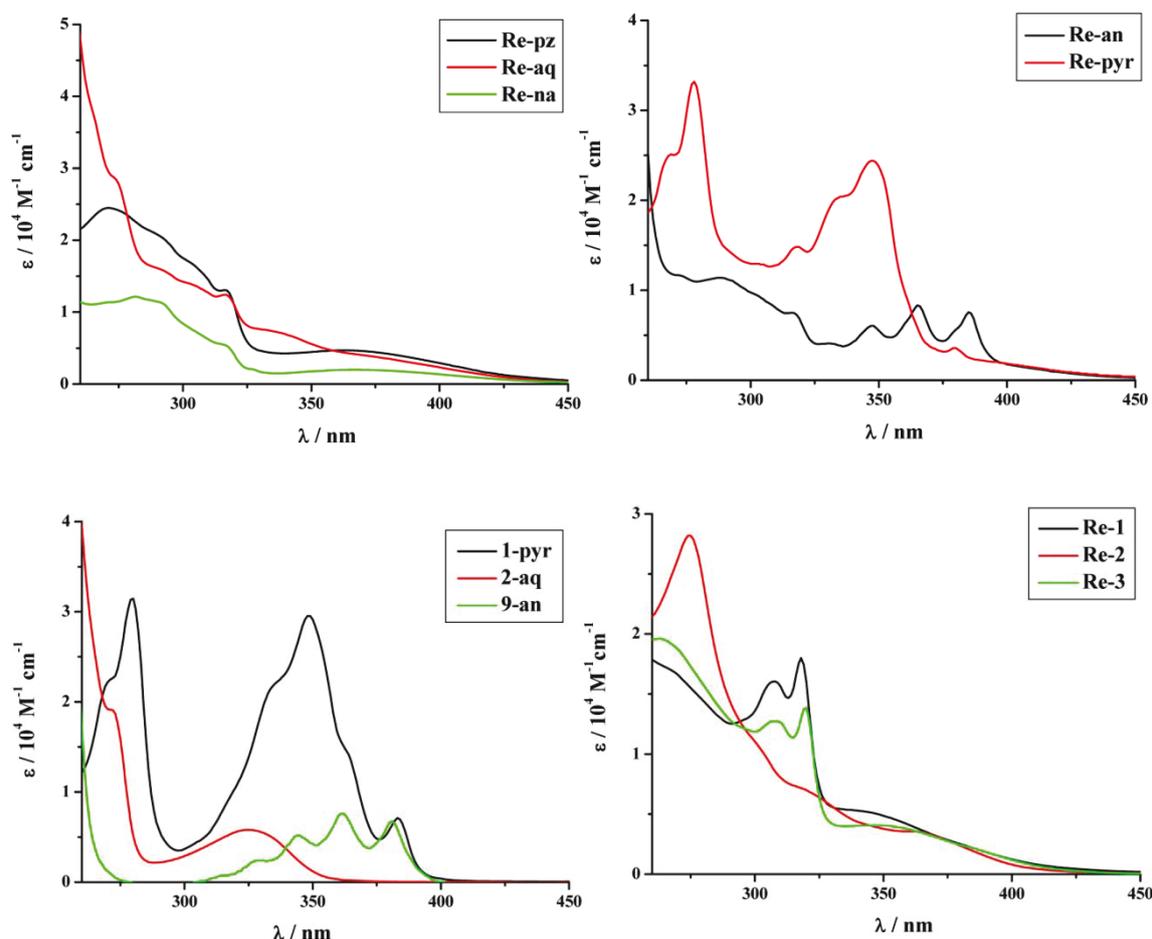


Figura 6.4. Espectros de absorción de los complejos de Re(I) y ligandos asociados en CH_3CN ²²⁰

Debido a esto, la fracción de la fluencia del láser absorbida por los estados ^1LC (correspondiente a la fluencia de láser absorbida por los estados $^1\text{MLCT}$) es más alta en **Re-pyr** que en **Re-an**. Por lo tanto, la fracción de energía liberada al medio como calor rápido por la población directa de los estados $^1\text{MLCT}$ es más baja en **Re-pyr** que en **Re-an**, y el aumento del ISC debido al efecto de metal pesado es más pronunciado en **Re-pyr** que en **Re-an**. Por otro lado, con los valores de α en O_2 y usando de nuevo el balance de energía de la **Ecuación 5.22**, se pueden calcular los valores del rendimiento cuántico de producción de oxígeno singlete Φ_T para **Re-pyr** y **Re-an** los cuales son

respectivamente 1,00 y 0,79. Estos valores calculados de Φ_T a partir de los datos calorimétricos concuerdan con los experimentales (**Tabla 6.1**). **Re-aq** no produjo 1O_2 ($^1\Delta_g$), mientras que para su correspondiente ligando libre, **2-aq**, el $\Phi_\Delta = 0,49$. Esta aparente discrepancia puede ser analizada en términos del espectro de absorción UV-vis del **Re-aq** ya que a $\lambda_{exc} = 355$ nm la principal absorción proviene del MLCT (el cual, además, es un luminóforo muy débil $\Phi_{lum} \sim 2 \times 10^{-4}$) con una pequeña contribución de los estados LC²³¹ (**Figura 6.4**).

6.6 CONCLUSIONES PARCIALES

Además de mostrar un comportamiento excepcionalmente rico de sus estados excitados y estabilidad fotoquímica, los complejos tricarbónicos de Re(I) coordinados a ligandos polipiridínicos son excelentes fotosensibilizadores para la generación de oxígeno singlete por lo cual podría contemplarse el usarlos en terapia fotodinámica en un futuro cercano.

Hemos examinado las propiedades fotofísicas de un número determinado de complejos de Re(I) del tipo $[L_s-CO_2-Re(CO)_3L]$ en soluciones diluidas de acetonitrilo junto con las eficiencias en la producción de oxígeno singlete. En la fotosensibilización de oxígeno singlete usando complejos de Re(I), se pudo producir eficientemente 1O_2 ($^1\Delta_g$) a partir de los complejos no emisivos **Re-pyr** y **Re-an**. Se pudo determinar que en los complejos de Re(I) de naturaleza $[L_s-CO_2-Re(CO)_3L]$, el estado excitado responsable de la generación de oxígeno singlete, por la ruta de transferencia de energía al oxígeno molecular, es 3LC (en los complejos **Re-pyr** y **Re-an**). Los valores más altos observados de Φ_Δ para **Re-pyr** y **Re-an**, comparados con aquellos de sus correspondientes ligandos libres, son un indicio del cruce intersistemas inducido por acción del ion Re(I) entre los estados singlete, triplete y quintuplete (ver esquema cinético de la producción de oxígeno singlete **Ecuaciones 5.12 – 5.14**).

Los datos calorimétricos fueron usados para calcular los rendimientos cuánticos de formación de triplete, $\Phi_T = 0,76$ y $0,86$ para **Re-an** y **Re-pyr**, respectivamente. Los valores calculados de Φ_Δ a partir de los experimentos calorimétricos coincidieron con los medidos experimentalmente.

7 CAPÍTULO IV. CARACTERIZACIÓN DEL PROCESO DE ASOCIACIÓN ENTRE COMPLEJOS TRICARBONÍlicos DE RENIO(I) Y PROTEÍNAS DE TRANSPORTE

7.1 INTRODUCCIÓN

Este capítulo está destinado al estudio de los complejos $[\text{Bu}_4\text{N}[(\text{bpy})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dcbpy})]]$ y $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$ (Figuras 7.1a y 7.1b) y su potencial uso como sensibilizadores en Terapia Fotodinámica (PDT, por sus siglas en inglés) mediante su interacción con compuestos de interés biológico, específicamente proteínas como la albúmina sérica bovina (BSA, por sus siglas en inglés) y la albúmina sérica humana (HSA, por sus siglas en inglés).

c

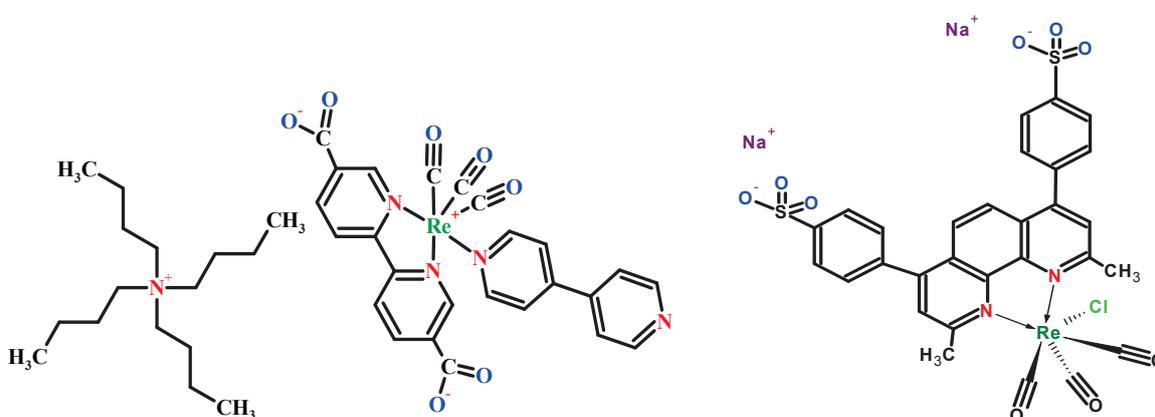


Figura 7.1. a. Complejo de Re(I) $[\text{Bu}_4\text{N}[(\text{bpy})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dcbpy})]]$, b. Complejo de Re(I) $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$

Como es bien sabido, los complejos polipiridínicos de Re(I), poseen atractivas e interesantes propiedades como fotosensibilizadores²⁴⁴, por lo cual, considerar las posibles interacciones de estos complejos con las proteínas ya mencionadas, en particular con la albúmina sérica, ya que es la principal

proteína en el plasma, es de sumo interés a la hora de evaluar la posible aplicación de estos complejos en PDT.

La albúmina sérica ha sido estudiada durante más de 40 años.²⁴⁵⁻²⁴⁶ Esto no es casual, ya que constituye la mayor parte de las proteínas solubles del sistema circulatorio, cumpliendo gran variedad de funciones fisiológicas.

La presencia de numerosos grupos reactivos en su molécula le confiere la capacidad para que una amplia variedad de sustancias, endógenas y exógenas, se unan reversiblemente con constantes de asociación que varían entre 10^3 y 10^8 M^{-1} ,²⁴⁷ haciendo de esta proteína un activo transportador de numerosos sustratos.²⁴⁸⁻²⁵¹

Existe consenso general respecto a la localización de las regiones de unión. Estas son: dos áreas principales para la unión de heterociclos y ácidos carboxílicos aromáticos, dos o tres regiones para la unión de ácidos grasos de cadena larga separadas de las regiones de unión para compuestos aniónicos pequeños y dos sitios de unión de metales.²⁵² La unión a estas proteínas puede llevar a cambios de las propiedades biológicas de un sustrato particular, así como proporcionar una ruta de acceso al sitio de acción.

Entre las características que las proteínas HSA y BSA comparten se pueden mencionar a 585 aminoácidos, un único grupo sulfhidrilo libre, un residuo de triptófano (Trp-214) y, estabilizando su estructura, 17 puentes disulfuro con la misma distribución, llegando a tener ambas proteínas un 76% de identidad de secuencia. Las diferencias observadas en la secuencia primaria corresponden al cambio de unos aminoácidos por otros de características similares, diferencias catalogadas como de naturaleza estructural conservativa. Además, del Trp-214, único residuo Trp en HSA, la BSA cuenta con un segundo residuo Trp, en este caso el Trp-135 ubicado también en el interior proteico.

Sobre la base de la secuencia de aminoácidos y la distribución de puentes disulfuro, la conformación de la albúmina se puede representar por tres dominios (I, II y III) los cuales pueden ser divididos, a su vez, en tres

subdominios (A, B y C). En estos diferentes dominios y subdominios pueden identificarse los sitios de unión de ligandos con propiedades multifuncionales.^{247,252} La estructura cristalográfica de HSA ha sido publicada en 1992 por X.M. He y D.C. Carter,²⁴⁵ y posteriormente refinada por S. Sugio y colaboradores.²⁵³

En la **Figura 7.2** se muestra la estructura tridimensional de HSA y se resumen algunos de los sitios de unión de diferentes ligandos.

A continuación se describirán de forma detallada los experimentos y resultados obtenidos del estudio realizado para caracterizar el proceso de asociación de los complejos $[\text{Bu}_4\text{N}[(\text{bpy})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dcbpy})]]$ y $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$ a las albúminas séricas ya mencionadas.

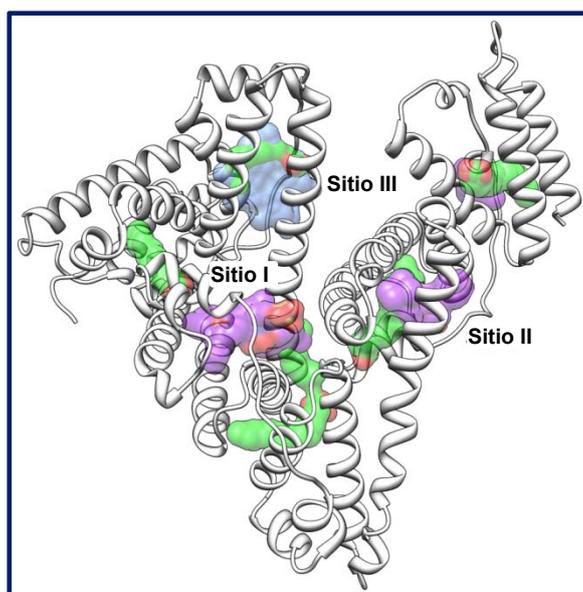


Figura 7.2. Estructura tridimensional de HSA. Se indican los tres dominios (I y II de color púrpura y III de color azul) que forman la molécula y algunos de los sitios de unión de ligandos.^{245,254}

7.2 MATERIALES

Los complejos utilizados para estos estudios fueron sintetizados por nuestro grupo durante este trabajo de investigación y sus procesos de obtención se describen en los Capítulos I y II

Para determinar la posible asociación de los complejos $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$ y $[\text{Bu}_4\text{N}[(\text{bpy})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dcbpy})]]$ con las proteínas de transporte BSA y HSA, procedimos a realizar diferentes estudios basados en técnicas espectrofotométricas y espectrofluorométricas.

Las soluciones de los complejos empleados se prepararon en solución *buffer* fosfatos. Las concentraciones de éstas se determinaron por espectroscopía UV-visible (UV-Vis), usando los coeficientes de extinción molar $\epsilon_{332 \text{ nm}} = 35.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y $\epsilon_{295 \text{ nm}} = 44.629 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para los complejos $[\text{Bu}_4\text{N}[(\text{bpy})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dcbpy})]]$ y $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$, respectivamente.

Las proteínas albúmina sérica humana y bovina se usaron sin previa purificación. Las soluciones de las mismas se prepararon en *buffer* fosfatos y las concentraciones se determinaron a partir de los coeficientes de extinción molar: $\epsilon_{279} = 43.824 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y $\epsilon_{280} = 36.500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para BSA y HSA, respectivamente²⁵⁵⁻²⁵⁶.

7.3 MEDIDAS ESPECTROSCÓPICAS

Los espectros de absorción UV-Vis se obtuvieron con un espectrofotómetro Agilent 8453 UV-Vis con detector PDA (Arreglo de Fotodiodo), y resolución de 1 nm, usando una celda de cuarzo de 1 cm de paso óptico.

Las medidas de fluorescencia en estado estacionario, se realizaron en un espectrofluorómetro PTI (Photon Technology International) Quanta Master QM2 equipado con un detector de contador de fotones Hamamatsu R928. Las intensidades de fluorescencia fueron corregidas por filtro interno (**Ecuación 7.1**)²⁵⁷:

$$F = K[10^{-\varepsilon_{exc}l_1C}(1 - 10^{-\varepsilon_{exc}l_2C})10^{-\varepsilon_{emi}l_3C}] \quad (\text{Ec. 7.1})$$

donde ε_{exc} y ε_{em} son los coeficientes de absorptividad molar de todas las especies presentes a la longitud de onda de excitación y de emisión, respectivamente, C simboliza la concentración de las especies presentes que absorben; l_1 , l_2 e l_3 son los parámetros que tienen en cuenta la distancia de recorrido del haz en la celda 0,4; 0,2 y 0,5 respectivamente y K es la constante que incorpora los diferentes parámetros instrumentales y el rendimiento cuántico de fluorescencia.

Adicionalmente, se realizaron medidas de dicroísmo circular en un espectropolarímetro Jasco J-810 a temperatura ambiente, usando una celda de 0,2 cm de paso óptico. Los datos se promediaron 5 veces, a una velocidad de barrido de 100 nm/min, con un ancho de banda de 1 nm y una resolución de 0,2 nm. Los datos se expresaron en términos de elipticidad media residual ($[\theta]$).

7.4 ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN

Las constantes de asociación *complejo-proteína* para los sistemas planteados fueron determinadas a partir de los cambios de la intensidad de fluorescencia de la proteína en presencia del complejo de Re(I). En primer lugar, se obtuvieron los espectros de emisión de las soluciones de BSA y HSA ($c = 1,5 \times 10^{-6}$ M) y, posteriormente, se registraron los espectros de la misma solución de proteína en presencia de diferentes concentraciones de complejo ($c = 0 - 7,5 \times 10^{-6}$ M). El ensayo se realizó para los dos complejos tanto con BSA como con HSA.

Las constantes de asociación se determinaron a partir del análisis de los cambios en la intensidad máxima de los espectros de emisión para las proteínas a un $\lambda \sim 340$ nm. Dicho análisis se llevó a cabo usando el modelo desarrollado por Bhattacharyya,²⁵⁸ (**Ecuación 7.2**),

$$\frac{1}{\Delta F} = \frac{1}{\Delta F_{max}} + \frac{1}{\Delta F_{max} K_b [Q]}, \quad (\text{Ec. 7.2})$$

donde $\Delta F = F_x - F_0$ y $\Delta F_{max} = F_{\infty} - F_0$, siendo F_0 , F_x y F_{∞} las intensidades de fluorescencia de la proteína en ausencia, en presencia de una concentración intermedia y a una concentración de saturación de complejo de Re(I), respectivamente; K_b es la constante de asociación y $[Q]$ es la concentración de Re(I). La Ecuación 1 predice linealidad cuando el proceso de asociación es 1:1.

7.4.1 MODELO DE ASOCIACIÓN

A fin de dilucidar la naturaleza de las fuerzas involucradas en el proceso de asociación *proteína-complejo*, las constantes de asociación se determinaron a diferentes temperaturas, y a partir de ellas se calcularon los parámetros termodinámicos. Suponiendo que el cambio de entalpía (ΔH) no varía significativamente en el rango de temperaturas estudiado ($\Delta T = 15^\circ$ C), tanto su

valor como el del cambio de entropía (ΔS) pueden obtenerse mediante la ecuación de Van't Hoff, (**Ecuación 7.3**),

$$\ln K_b = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R}, \quad (\text{Ec. 7.3})$$

donde K_b representa la constante de asociación, T la temperatura en °K y R la constante de los gases ideales. Los valores de ΔH y ΔS se calcularon a partir de la pendiente y la ordenada al origen, respectivamente. Finalmente los valores de cambio de energía libre (ΔG) a cada temperatura pueden obtenerse a partir de la **Ecuación 7.4**,

$$\Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S \quad (\text{Ec. 7.4})$$

7.4.1.1 TRANSFERENCIA DE ENERGÍA

El proceso de transferencia de energía entre el donador (proteína) y el aceptor (complejo metálico) se estudió de acuerdo a la teoría de Förster,²⁵⁹ donde la transferencia de energía se define según la **Ecuación 7.5**,

$$E = 1 - \frac{F}{F_0} = \frac{R_0^6}{(R_0^6 + r^6)}, \quad (\text{Ec. 7.5})$$

donde E es la eficiencia del proceso de transferencia de energía, F y F_0 son las intensidades de fluorescencia de la proteína en presencia y ausencia de complejo metálico, r es la distancia entre aceptor y donador, y R_0 es la distancia crítica cuando la eficiencia de transferencia es del 50%. El valor de R_0 se determina a partir de la **Ecuación 7.6**,

$$R_0^6 = 8,8 \times 10^{-25} K^2 \eta^{-4} \Phi_D J \quad (\text{Ec. 7.6})$$

donde K^2 es un factor que tiene en cuenta la orientación relativa de los momentos de transición del donador y aceptor, η es el índice de refracción del medio, Φ_D es el rendimiento cuántico de emisión del donador en ausencia del

aceptor y J corresponde a la integral de solapamiento entre la emisión del donador y la absorción del aceptador, definida según la **Ecuación 7.7**,

$$J = \frac{[\sum F(\lambda)\varepsilon(\lambda)\lambda^4 \Delta\lambda]}{[\sum F(\lambda)\Delta\lambda]} \quad (\text{Ec. 7.7})$$

donde $F(\lambda)$ es la intensidad de fluorescencia del donador y $\varepsilon(\lambda)$ es el coeficiente de absorción molar del aceptador.

Para obtener los espectros de emisión para el donador, y de absorción para el aceptador, es necesario tener en cuenta que la concentración de ambas especies debe ser equimolar, sumado a que las condiciones de las medidas deben ser lo más semejantes como sea posible.

7.4.2 ESTUDIOS DE DICROÍSMO CIRCULAR

Los espectros de dicroísmo circular de BSA y HSA ($C = 2,5 \times 10^{-6}$ M) en ausencia y presencia de $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$ y $[\text{Bu}_4\text{N}[(\text{bpy})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dcbpy})]]$ ($C = 3,4 \times 10^{-6}$ M) se realizaron, con el objetivo de revelar posibles cambios estructurales. Estas medidas se realizaron a temperatura ambiente y en la región del UV-lejano, $\lambda = 200\text{-}260$ nm.

7.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.5.1 ASOCIACIÓN ENTRE COMPLEJOS POLIPIRIDÍNICOS DE RE(I) Y PROTEÍNAS DE TRANSPORTE

La espectroscopía de fluorescencia es un método ampliamente usado para el estudio de la interacción entre ligandos y bio-macromoléculas dado que brinda valiosa información acerca de los cambios que sufre el microambiente que rodea a los fluoróforos presentes en la macromolécula cuando interactúan con un ligando.

La fluorescencia en la albúmina se origina a partir de dos tipos de fluoróforos: el triptófano (Trp) y la tirosina (Tyr), principalmente.

La BSA contiene dos residuos de Trp localizados en diferentes subdominios: el Trp-214, expuesto a un ambiente hidrofóbico en el subdominio IIA y el Trp-135, localizado en el subdominio IB en un entorno hidrofílico. Por el contrario, la HSA solo posee un Trp ubicado en el subdominio IIA (Trp 214).²⁵²

Con el propósito de determinar el subdominio de la albúmina donde se asocian los complejos de Re(I) en estudio, en primera instancia realizamos un análisis comparativo de la inhibición (*quenching*) de fluorescencia de BSA y HSA por los complejos metálicos. Por tanto, para establecer si ambos fluoróforos están involucrados en el proceso de asociación, se comparó la fluorescencia de la albúmina excitada a 280 y 295 nm, ya que cuando $\lambda_{exc} = 280$ nm la fluorescencia de la albúmina proviene tanto de Trp como Tyr, mientras que si la $\lambda_{exc} = 295$ nm solo los residuos de Trp serán excitados.

En la **Figura 7.3**. Se observa el efecto de los complejos $[ClRe(CO)_3(BCS)]^{2-}$ (**Figuras 7.3a y 7.3b**) y $[Bu_4N[(bpy)Re(CO)_3(dcbpy)]]$ (**Figuras 7.3c y 7.3d**) sobre la intensidad de fluorescencia de BSA y HSA excitando a $\lambda = 280$ nm. La intensidad de fluorescencia disminuye de manera notable para todos los casos.

La banda de fluorescencia observada es característica de los residuos de Trp cuando se encuentran expuestos a un ambiente no-polar. Por consiguiente, el cambio en la intensidad de emisión implica que el ambiente químico en las vecindades inmediatas del Trp está siendo perturbado por la presencia del complejo metálico respectivo en cada uno de los casos. Aún así, dado que no se observan cambios significativos en la posición del máximo de emisión, se puede asumir que no cambia la polaridad del medio circundante a los residuos, o bien el cambio es despreciable.

Los resultados demuestran la capacidad tanto de $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$ como de $[\text{Bu}_4\text{N}[(\text{bpy})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dcbpy})]]$ para desactivar el estado excitado de los fluoróforos presentes en las proteínas. Sin embargo, los espectros de emisión para las respectivas albúminas comienzan a deformarse en todos los casos tras el incremento de concentración de estos complejos en el medio de reacción. En el primer caso (**Figuras 7.3a y 7.3b**), y comparando los espectros de emisión de los sistemas $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$ -HSA y $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$ -BSA con el espectro de emisión del complejo solo, se le puede atribuir dicha deformación a la emisión de éste último, consecuencia de su absorción a la longitud de onda de excitación ($\lambda_{\text{exc.}} = 280 \text{ nm}$), como de emisión ($\lambda_{\text{emBSA}} = 336 \text{ nm}$).

Por otra parte, como se puede observar en la **Figura 7.3c y 7.3d**, el efecto de la emisión del complejo $[\text{Bu}_4\text{N}[(\text{bpy})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dcbpy})]]$ sobre el espectro de emisión del sistema $[\text{Bu}_4\text{N}[(\text{bpy})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dcbpy})]]$ -proteína, a la longitud de onda de excitación y máxima concentración de complejo usada, es despreciable, de esta manera, la deformación de los espectros podría atribuírsele al posible distanciamiento de los residuos Trp y Tyr los cuales estarían empezando a emitir de manera independiente.

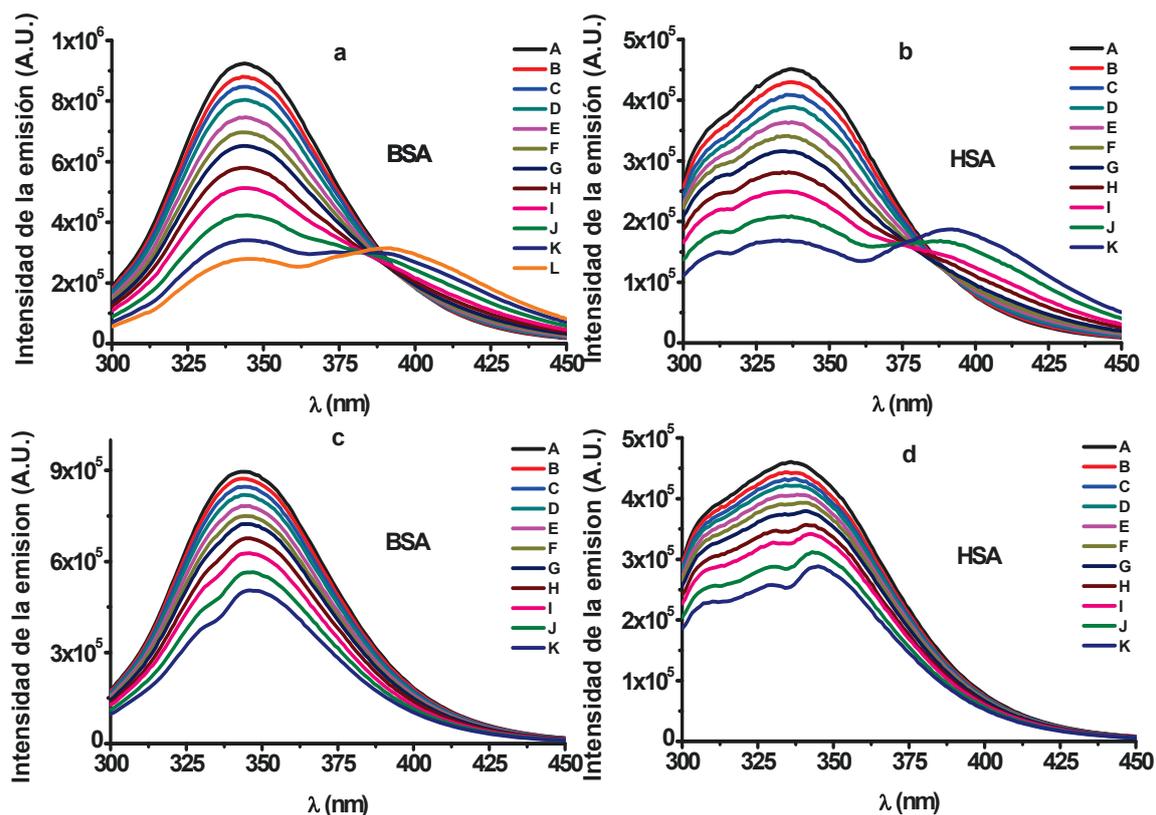


Figura 7.3. a. Espectros de emisión de fluorescencia para BSA en ausencia y presencia de $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$. Las concentraciones de las especies fueron $c_{\text{proteína}} = 1,5 \times 10^{-6}$ M y $c_{[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}} = (0, 0.16, 0.33, 0.49, 0.82, 1.14, 1.52, 2.3, 3, 4.5, 6, 7.5) \times 10^{-6}$ M, (A-L) respectivamente; *buffer* fosfatos pH = 7,4; $T^\circ = 298$ K, $\lambda_{\text{exc.}} = 280$ nm, $\lambda_{\text{em. BSA}} = 344$ nm; las ranuras (*slits*) de excitación y emisión fueron 4 nm. b. Espectros de emisión de fluorescencia de HSA en ausencia y presencia de $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$; las condiciones experimentales fueron las mismas que en a; $\lambda_{\text{em. HSA}} = 337$ nm. c. Espectros de emisión de fluorescencia para BSA en ausencia y presencia de $[\text{Bu}_4\text{N}[(\text{bpy})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dcbpy})]]$. Las concentraciones de las especies fueron $c_{\text{proteína}} = 1,5 \times 10^{-6}$ M y $c_{[\text{Bu}_4\text{N}[(\text{bpy})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dcbpy})]]} = (0, 0.16, 0.33, 0.49, 0.82, 1.14, 1.52, 2.3, 3, 4.5, 6) \times 10^{-6}$ M, (A-K) respectivamente; *buffer* fosfatos pH = 7,4; $T^\circ = 298$ K, $\lambda_{\text{exc.}} = 280$ nm, $\lambda_{\text{em. BSA}} = 343$ nm; las ranuras (*slits*) de excitación y emisión fueron 4 nm. d. Espectros de emisión de fluorescencia de HSA en ausencia y presencia de $[\text{Bu}_4\text{N}[(\text{bpy})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dcbpy})]]$; las condiciones experimentales fueron las mismas que en c; $\lambda_{\text{em. HSA}} = 336$ nm.

Para establecer el subdominio donde se asocian los complejos del Re(I) a la albúmina se analizó comparativamente el *quenching* de fluorescencia de BSA y HSA por los complejos en estudio. Cuando un ligando inhibe la fluorescencia de HSA revela que dicho proceso está ocurriendo en el subdominio IIA, donde se encuentra el Trp-214. Como se muestra en la **Figura 7.4**. Para el complejo $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$, no hay diferencia significativa entre la extensión del *quenching* de BSA y HSA tanto a $\lambda_{\text{exc.}} = 280$ nm (**Figura 7.4a**), como a $\lambda_{\text{exc.}} = 295$ nm (**Figura 7.4b**).

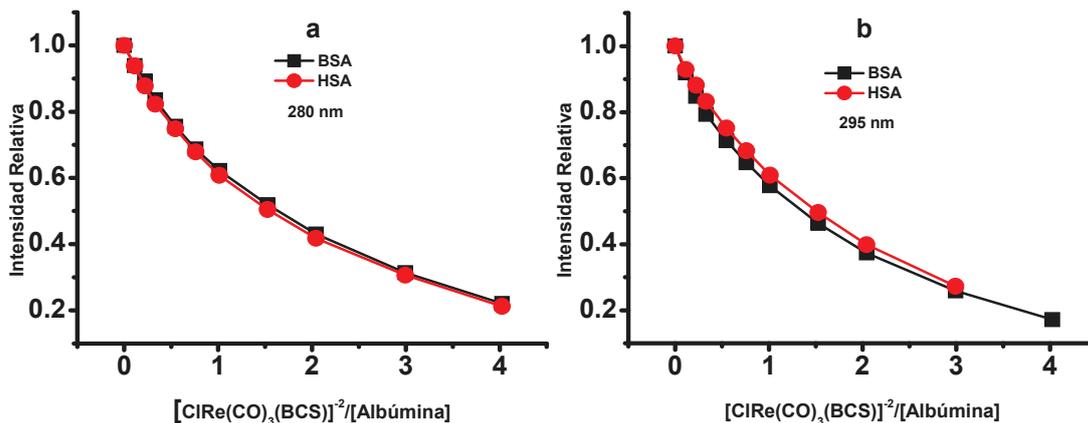
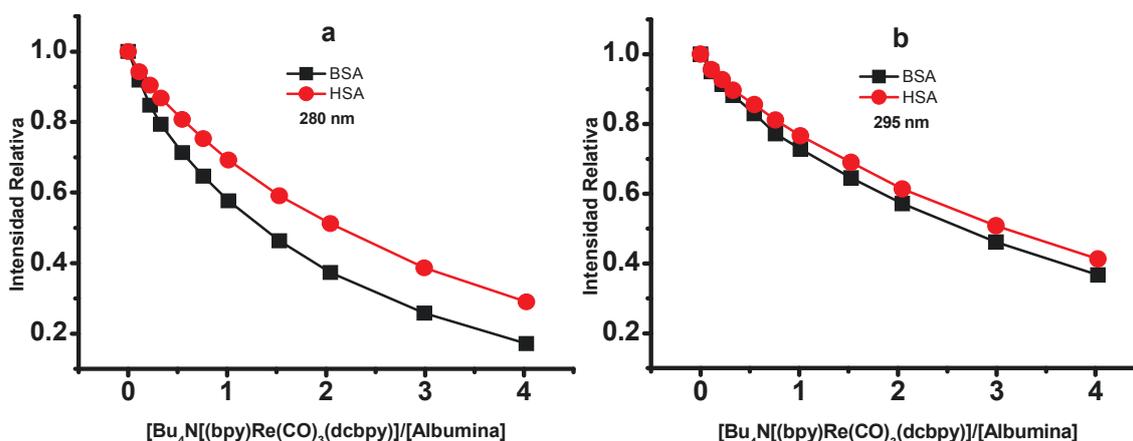


Figura 7.4. Gráfico de intensidad de fluorescencia relativa de albúmina sérica (F/F_0) vs $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}/[\text{Albúmina}]$. **a.** $\lambda_{\text{exc.}} = 280 \text{ nm}$: BSA- $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$, (■) y HSA- $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$, (●); **b.** $\lambda_{\text{exc.}} = 295 \text{ nm}$: BSA- $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$, (■) y HSA- $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$, (●); *buffer* fosfatos pH = 7,4. T = 298 K

El fenómeno observado indica que probablemente el Trp-135, sólo presente en BSA, no se encuentra involucrado en el proceso de asociación. De esta manera se podría señalar al subdominio IIA, como el principal sitio de unión de $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$ a ambas proteínas, ya que se observó el mismo comportamiento para los sistemas $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$ -BSA y $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$ -HSA.

En el caso de los sistemas con el complejo $[\text{Bu}_4\text{N}[(\text{bpy})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dcbpy})]]$, la **Figura 7.5** nos muestra que hay una diferencia notable entre las dos proteínas cuando se excitó a 280 nm, lo que nos permite suponer que el residuo 135 sí está involucrado en la asociación del $[\text{Bu}_4\text{N}[(\text{bpy})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dcbpy})]]$ con la



proteína.

Figura 7.5. Gráfico de intensidad de fluorescencia relativa de albúmina sérica (F/F_0) vs $[\text{Bu}_4\text{N}[(\text{bpy})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dcbpy})]]/[\text{Albúmina}]$. **a.** $\lambda_{\text{exc.}} = 280 \text{ nm}$: BSA- $[\text{Bu}_4\text{N}[(\text{bpy})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dcbpy})]]$, (■) y HSA- $[\text{Bu}_4\text{N}[(\text{bpy})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dcbpy})]]$, (●); **b.** $\lambda_{\text{exc.}} = 295 \text{ nm}$: BSA- $[\text{Bu}_4\text{N}[(\text{bpy})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dcbpy})]]$, (■) y HSA- $[\text{Bu}_4\text{N}[(\text{bpy})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dcbpy})]]$, (●); *buffer* fosfatos pH = 7,4. T = 298 K

Ahora, para determinar si ambos fluoróforos (Trp y Tyr) están involucrados en el proceso de asociación, se comparó el *quenching* de fluorescencia de BSA y HSA excitadas a $\lambda = 280$ y 295 nm (**Figura 7.6**).

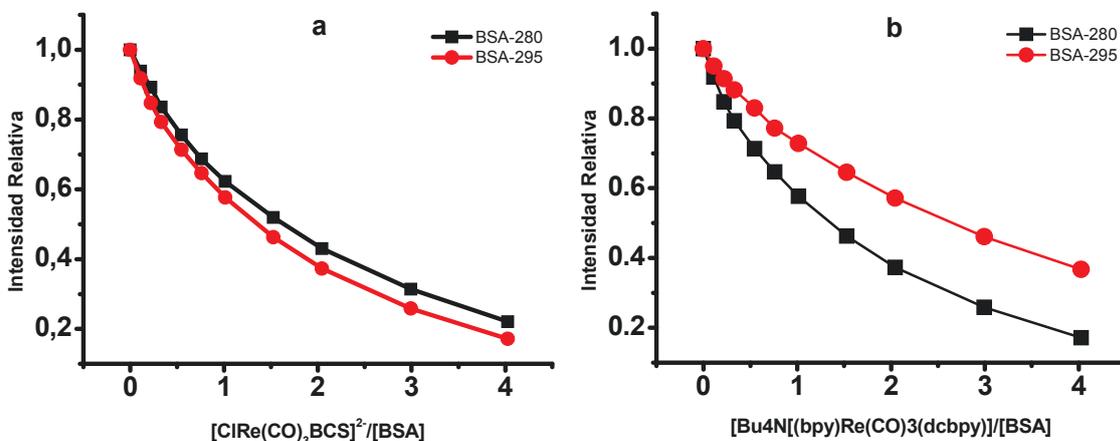


Figura 7.6. a. Gráfico de intensidad de fluorescencia relativa de BSA (F/F_0) vs $[\text{CIRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}/[\text{BSA}]$; $\lambda_{\text{exc.}} = 280$ nm, (■) y $\lambda_{\text{exc.}} = 295$ nm, (●); *buffer* fosfatos pH = 7,4; T = 298 K. b. Gráfico de intensidad de fluorescencia relativa de BSA (F/F_0) vs $[\text{Bu}_4\text{N}[(\text{bpy})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dcbpy})]]/[\text{BSA}]$; $\lambda_{\text{exc.}} = 280$ nm, (■) y $\lambda_{\text{exc.}} = 295$ nm, (●); *buffer* fosfatos pH = 7,4; T = 298 K

Así, para una relación molar (r_i) $[\text{Re}]/[\text{proteína}]$ $r_i = 4$ y una $\lambda_{\text{exc.}} = 295$ nm, la fluorescencia de BSA en presencia de $[\text{CIRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$ disminuye en un 83% (**Figura 7.6a.** (●)), mientras que a $\lambda_{\text{exc.}} = 280$ nm y la misma r_i la fluorescencia de BSA en presencia de $[\text{CIRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$ disminuye en un 78% (**Figura 7.6a.** (■)) respectivamente. Por otra parte, en el caso del sistema BSA- $[\text{Bu}_4\text{N}[(\text{bpy})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dcbpy})]]$, para una relación molar (r_i) $[\text{Re}]/[\text{proteína}]$ $r_i = 4$ y una $\lambda_{\text{exc.}} = 295$ nm, la fluorescencia de BSA en presencia de $[\text{Bu}_4\text{N}[(\text{bpy})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dcbpy})]]$ disminuye en un 63% (**Figura 7.6b.** (●)), mientras que a $\lambda_{\text{exc.}} = 280$ nm y la misma r_i la fluorescencia de BSA en presencia de $[\text{Bu}_4\text{N}[(\text{bpy})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dcbpy})]]$ disminuye en un 83% (**Figura 7.6b.** (■)), respectivamente.

Esta diferencia significativa entre el efecto observado a $\lambda = 280$ y 295 nm para ambos complejos evidencia que los residuos de Tyr toman parte en la interacción molecular proteína-complejo metálico en todos los sistemas estudiados.

Interesados en develar cuan afín son estos complejos metálicos por el sitio de unión de las albúminas, determinamos las constantes de asociación para todos los sistemas en estudio a partir de los datos de fluorescencia. Las constantes K_b se calcularon usando la **Ecuación 7.2**. Los gráficos $1/(F-F_0)$ vs $1/[Q]$ para los sistemas BSA-Re(I) y HSA-Re(I) se presentan en la **Figura 7.7**.

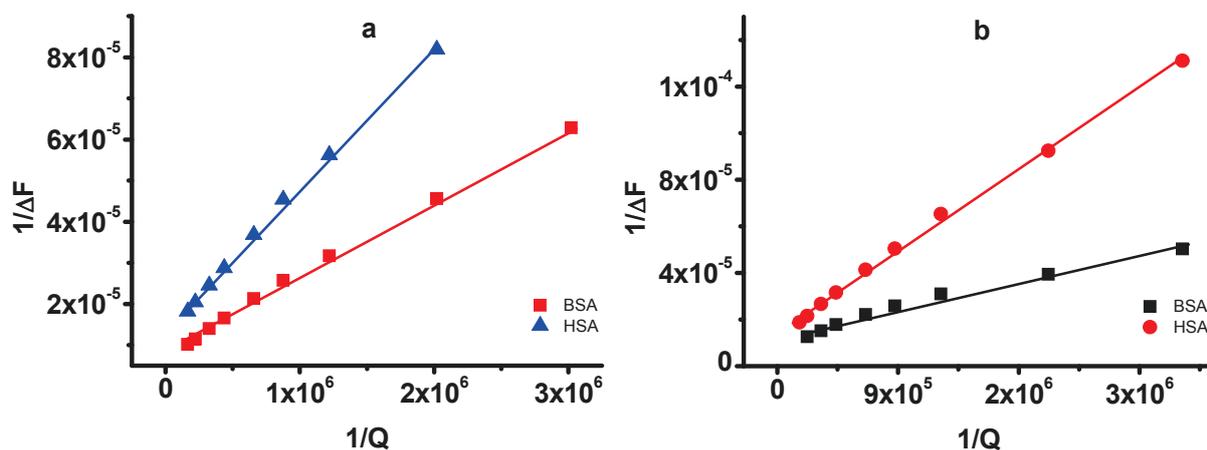


Figura 7.7. a. Gráfico de $1/\Delta F$ vs $1/[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^2$ para los sistemas BSA- $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^2$, (■) y HSA- $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^2$ (▲). Las concentraciones de los complejos variaron desde 0 a 6.04×10^{-6} M; $T = 298$ K, *buffer* fosfatos $\text{pH} = 7,4$; $\lambda_{\text{exc.}} = 280$ nm. b. Gráfico de $1/\Delta F$ vs $1/[\text{Bu}_4\text{N}[(\text{bpy})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dcbpy})]]$ para los sistemas BSA- $[\text{Bu}_4\text{N}[(\text{bpy})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dcbpy})]]$, (■) y HSA- $[\text{Bu}_4\text{N}[(\text{bpy})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dcbpy})]]$ (●). Las concentraciones de los complejos variaron desde 0 a 6.04×10^{-6} M; $T = 298$ K, *buffer* fosfatos $\text{pH} = 7,4$; $\lambda_{\text{exc.}} = 280$ nm.

Puede observarse un comportamiento lineal en todos los casos, lo que se correlaciona con un modelo de interacción uno a uno entre ambas partes, proteína y complejo metálico²⁵⁸. Así mismo se determinaron las constantes K_b , a 3 temperaturas diferentes para todas las asociaciones planteadas. En las **Figura 7.8 y 7.9**, se puede ver la representación de estas asociaciones para los sistemas BSA- $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^2$ y HSA- $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^2$ (**Figuras 7.8a y b**) y BSA- $[\text{Bu}_4\text{N}[(\text{bpy})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dcbpy})]]$ y HSA- $[\text{Bu}_4\text{N}[(\text{bpy})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dcbpy})]]$ (**Figuras 7.9a y b**).

Las constantes de asociación obtenidas se listan en la **Tabla 7.1**, en la cual se puede observar que los valores de las K_b tanto para el sistema BSA- $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^2$ como para HSA- $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^2$ son bastante cercanos mientras que para el sistema HSA- $[\text{Bu}_4\text{N}[(\text{bpy})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dcbpy})]]$ son prácticamente la mitad comparados con los del sistema BSA- $[\text{Bu}_4\text{N}[(\text{bpy})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dcbpy})]]$.

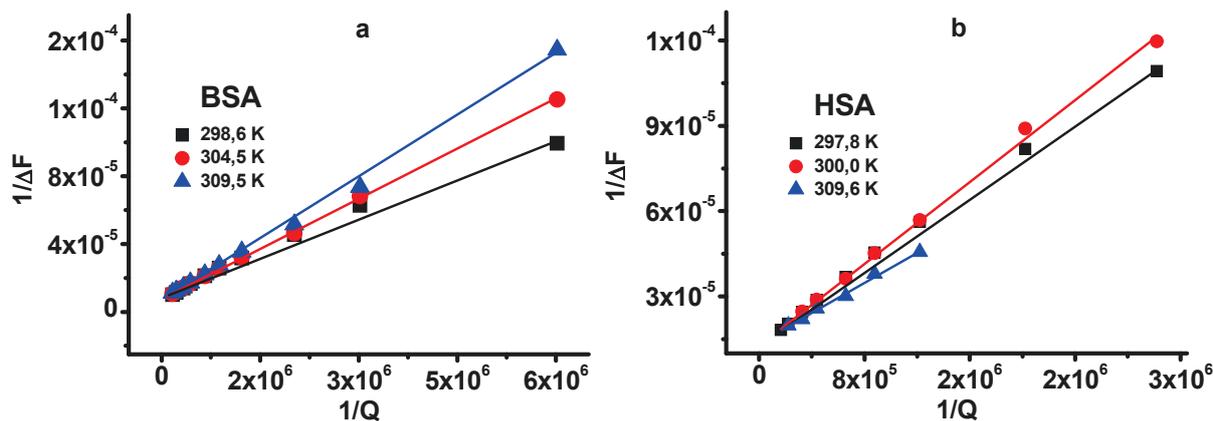


Figura 7.8. a. Gráfico de $1/\Delta F$ vs $1/[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$ para el sistema $\text{BSA}-[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$ a tres diferentes temperaturas. La concentración de $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$ varió desde 0 hasta $6.04 \times 10^{-6} \text{ M}$; *buffer* fosfatos pH = 7,4; $\lambda_{\text{exc.}} = 280 \text{ nm}$. b. Gráfico de $1/\Delta F$ vs $1/[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$ para el sistema $\text{HSA}-[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$ a diferentes temperaturas; las condiciones experimentales fueron las mismas que en a.

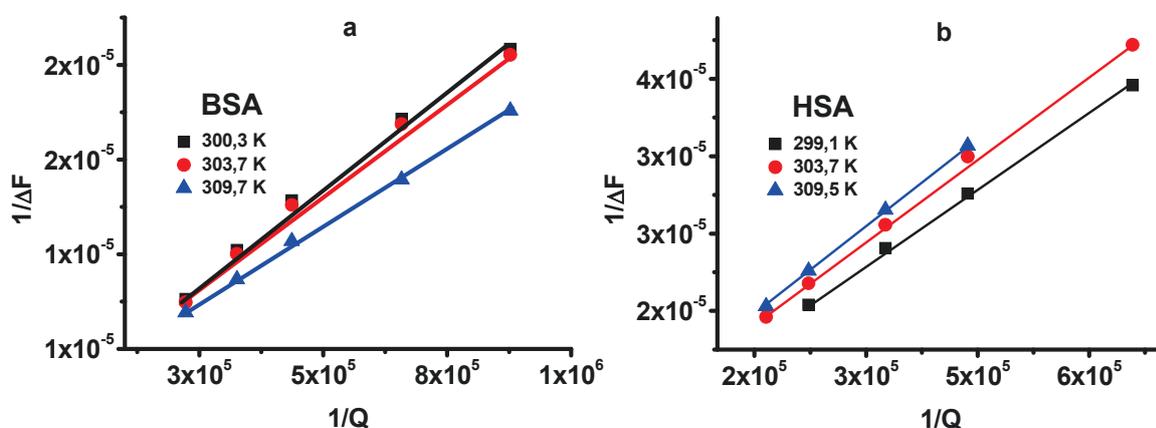


Figura 7.9. a. Gráfico de $1/\Delta F$ vs $1/[\text{Bu}_4\text{N}[(\text{bpy})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dcbpy})]]$ para el sistema $\text{BSA}-[\text{Bu}_4\text{N}[(\text{bpy})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dcbpy})]]$ a tres diferentes temperaturas. La concentración de $[\text{Bu}_4\text{N}[(\text{bpy})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dcbpy})]]$ varió desde 0 hasta $6.04 \times 10^{-6} \text{ M}$; *buffer* fosfatos pH = 7,4; $\lambda_{\text{exc.}} = 280 \text{ nm}$. b. Gráfico de $1/\Delta F$ vs $1/[\text{Bu}_4\text{N}[(\text{bpy})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dcbpy})]]$ para el sistema $\text{HSA}-[\text{Bu}_4\text{N}[(\text{bpy})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dcbpy})]]$ a diferentes temperaturas; las condiciones experimentales fueron las mismas que en a.

Tabla 7.1. Constantes de asociación para los sistemas $\text{Albúmina}-[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$ y $\text{Albúmina}-[\text{Bu}_4\text{N}[(\text{bpy})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dcbpy})]]$ en estudio, en *buffer* fosfatos pH = 7,4.

T (°K)	Albúmina	$[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$	
		$K_b \times 10^{-5} (\text{M}^{-1})$	r
298	BSA	4,8	0,9974
	HSA	4,6	0,9956
303	BSA	4,1	0,9995
	HSA	4,2	0,9991
309	BSA	3,5	0,9992
	HSA	3,8	0,9996
$[\text{Bu}_4\text{N}[(\text{bpy})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dcbpy})]]$			
		$K_b \times 10^{-5} (\text{M}^{-1})$	r
299	BSA	5,2	0,9886
	HSA	2,6	0,9991
303	BSA	5,1	0,9890
	HSA	2,5	0,9978
309	BSA	5,0	0,9990
	HSA	2,4	0,9997

r: coeficiente de correlación lineal.

De todos modos, los valores de constantes obtenidos son un reflejo de la alta afinidad que presentan los complejos polipiridínicos del Re(I) en estudio por las proteínas.

7.5.2 PARÁMETROS TERMODINÁMICOS Y NATURALEZA DE LAS FUERZAS DE INTERACCIÓN

Los parámetros termodinámicos fueron analizados con el fin de caracterizar las fuerzas de interacción involucradas en el proceso de asociación entre albúmina y ambos complejos.

Las fuerzas moleculares que contribuyen a las interacciones entre una proteína y pequeñas moléculas incluyen principalmente: fuerzas de interacción hidrofóbicas, interacciones de van der Waals, puentes de hidrógeno, fuerzas electrostáticas, entre otras.²⁶⁰

Los parámetros termodinámicos, cambio de entalpía (ΔH), entropía (ΔS) y energía libre (ΔG), son esenciales para caracterizar el modo de unión. Los parámetros termodinámicos (ΔH y ΔS) se estimaron a partir de la pendiente y la ordenada al origen asociados a la representación de Van't Hoff. (Ecuación 7.3) (Figuras 7.10 y 7.11).

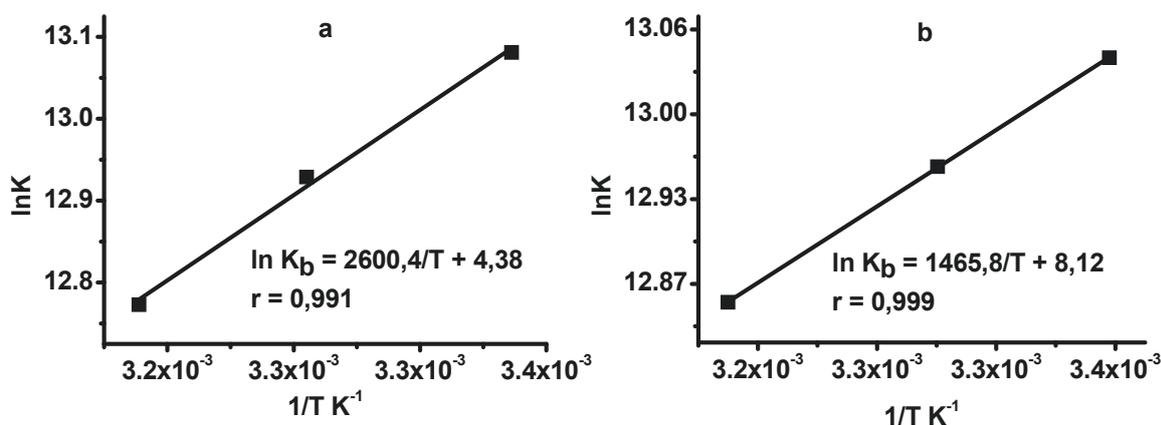


Figura 7.10. Representación de Van't Hoff. a. Sistema BSA-[ClRe(CO)₃(BCS)]²⁻. b. Sistema HSA-[ClRe(CO)₃(BCS)]²⁻.

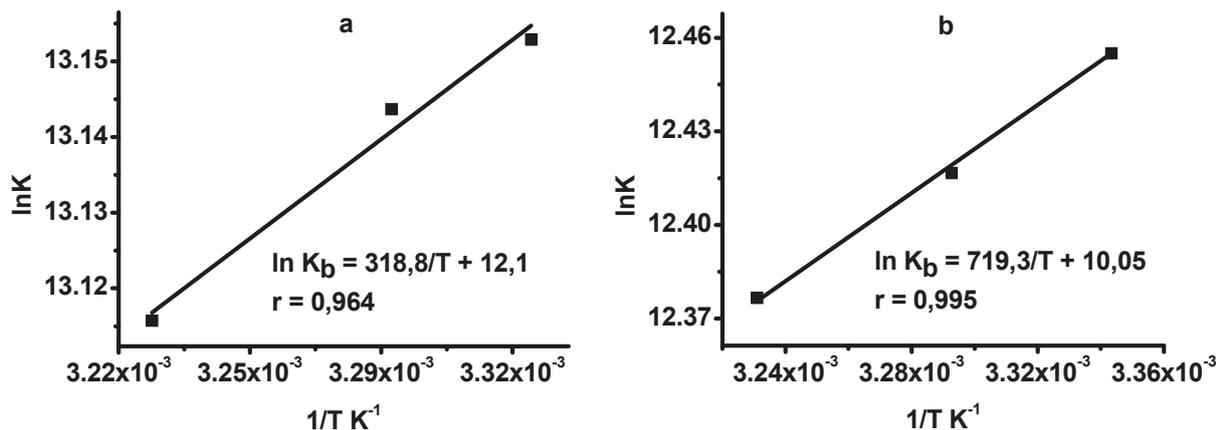


Figura 7.11. Representación de Van't Hoff. a. Sistema BSA-[Bu₄N]((bpy)Re(CO)₃(dcbpy)). b. Sistema HSA-- [Bu₄N]((bpy)Re(CO)₃(dcbpy)).

Los valores de ΔG se calcularon a partir de los valores de ΔH y ΔS mediante la **Ecuación 7.4** para los cuatro sistemas estudiados a tres temperaturas. Los valores obtenidos se listan en las **Tablas 7.2a** (Albúmina-[ClRe(CO)₃(BCS)]²⁻) y **7.2b** (Albúmina-[Bu₄N]((bpy)Re(CO)₃(dcbpy))).

Tabla 7.2a. Parámetros termodinámicos para el proceso de asociación Albúmina-[ClRe(CO)₃(BCS)]²⁻.

T (K)	Albúmina	ΔG (kJ mol ⁻¹)	ΔH (kJ mol ⁻¹)	ΔS (J mol ⁻¹ K ⁻¹)
298,6	BSA	-32,5	-21,6	36,4
297,8	HSA	-32,3	-12,2	67,5
304,5	BSA	-32,7	-21,6	36,4
303,0	HSA	-32,6	-12,2	67,5
309,5	BSA	-32,9	-21,6	36,4
309,6	HSA	-33,1	-12,2	67,5

Tabla 7.2b. Parámetros termodinámicos para el proceso de asociación Albúmina-[Bu₄N]((bpy)Re(CO)₃(dcbpy)).

T (K)	Albúmina	ΔG (kJ mol ⁻¹)	ΔH (kJ mol ⁻¹)	ΔS (J mol ⁻¹ K ⁻¹)
300,3	BSA	-32,8	-2,6	100,5
299,1	HSA	-30,9	-5,9	83,5
303,7	BSA	-33,2	-2,6	100,5
303,7	HSA	-31,3	-5,9	83,5
309,7	BSA	-33,8	-2,6	100,5
309,5	HSA	-31,8	-5,9	83,5

P.D. Ross y S. Subramanian²⁶¹, propusieron que el signo y magnitud de los parámetros termodinámicos están asociados con un tipo particular de interacción que toma lugar en el proceso de asociación a proteínas.

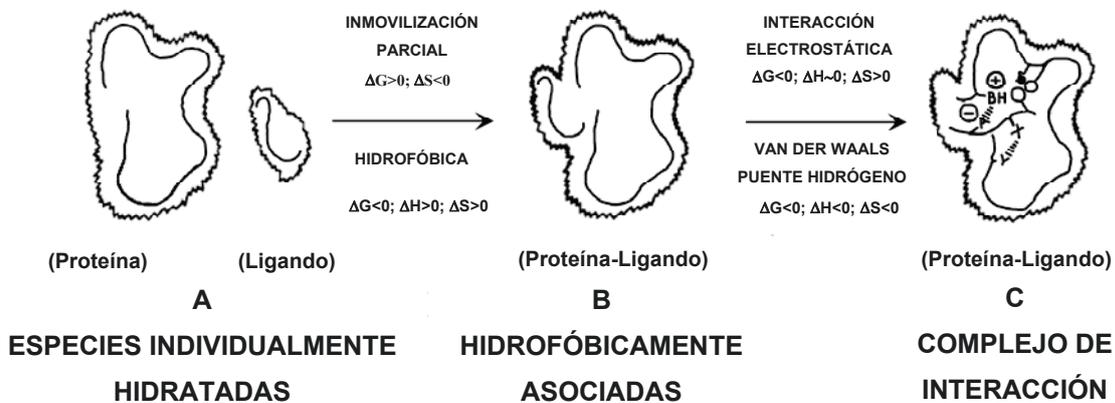


Figura 7.12. Representación de un proceso de asociación proteína-ligando. Modelo termodinámico hipotético.²⁶¹

La asociación entre un ligando y una proteína puede interpretarse como un proceso que involucra estados termodinámicos hipotéticos representados por **A-B** y **B-C** como se esquematiza en la **Figura 7.12**. El estado **A** representa las especies hidratadas aisladas, quienes en el estado **B** interactúan parcialmente de manera tal que hay una penetración recíproca de sus capas de hidratación para formar “las especies hidrofóbicamente asociadas”. Esta asociación hidrofóbica es el resultado de la tendencia que presentan las moléculas de agua para formar estructuras más ordenadas en las cercanías de las cadenas hidrocarbonadas no polares. Es decir, las moléculas de agua dispuestas de forma ordenada en torno al ligando y a la proteína deben desplazarse para dar lugar a la unión, por consiguiente adquieren una estructura más “desordenada” que antes. Por lo tanto, la destrucción de las capas de hidratación es inducida por interacciones hidrofóbicas. Este proceso se acompaña de valores de ΔS positivos, y ΔH y ΔG negativos (**Tabla 7.2a y b**). En la segunda etapa del proceso de asociación (**C**), las especies asociadas hidrofóbicamente (**B**) participan en interacciones que involucran plenamente interacciones intermoleculares entre proteína-ligando, sin considerar de manera apreciable, las moléculas del solvente. Las interacciones intermoleculares incluyen interacciones electrostáticas, puentes de hidrógeno y fuerzas de van der Waals, (dipolo-dipolo, dipolo inducido y el efecto de dispersión de London). Los

parámetros termodinámicos característicos de estas interacciones se detallan en la **Tabla 7.3**.

Tabla 7.3. Signos de los parámetros termodinámicos para los diferentes tipos de interacciones intermoleculares.²⁶¹

Procesos	ΔH	ΔS
Asociación hidrofóbica	(+)	(+)
Van der Waals	(-)	(-)
Formación de puente de hidrógeno, (medio de bajo dieléctrico)	(-)	(-)
Electrostáticas (neutralización de cargas)	Levemente (+) ó (-)	(+)
Protonación	(-)	(-)

Las Interacciones de van der Waals y puentes de hidrógeno están asociados con valores de ΔS y ΔH negativos, siendo este tipo de interacciones, junto con procesos de protonación (que pueden estar relacionados con el proceso de asociación) las que generalmente presentan parámetros termodinámicos negativos tan comúnmente encontrados en procesos de asociación a proteínas. Por otro lado, las interacciones de tipo electrostáticas se caracterizan por presentar ΔH pequeños (de cualquier signo) y ΔS positivos.

En resumen, las proteínas están involucradas en interacciones hidrofóbicas (**A-B**), pero las interacciones intermoleculares (interacciones electrostáticas, puentes de hidrógeno, y de van der Waals) representadas por **B-C** en la **Figura 7.12**, desempeñan un papel importante, sino el predominante, en la determinación de los parámetros termodinámicos de la asociación a proteínas.

En esencia, los parámetros termodinámicos asociados con el proceso **A-B**, describen solo la reorganización de la estructura del solvente alrededor de la proteína y de los ligandos hacia un mayor desorden en comparación con las especies hidratadas individualmente. Esta asociación favorable, dirigida entrópicamente, se aplica para moléculas totalmente no-polares, así como a segmentos de las moléculas anfipáticas. La etapa hidrofóbica, sin embargo, es necesaria pero no suficiente para explicar los parámetros termodinámicos

obtenidos experimentalmente en la gran mayoría de las reacciones de asociación a proteínas.

Los valores negativos de ΔG (Tabla 7.2) demuestran que el proceso de asociación ocurre espontáneamente. Los valores negativos de ΔH y positivos para ΔS observados para los sistemas en estudio indican que el proceso de asociación presenta una contribución tanto entálpica como entrópica. Se puede asumir, en función de los resultados, que interacciones de tipo hidrofóbicas juegan un rol importante en la unión proteína-ligando. Sin embargo, no se puede descartar que interacciones de naturaleza electrostáticas estén presentes, dado los pequeños valores de ΔH hallados y la carga de las especies involucradas.

Estos resultados son concordantes con el análisis propuesto a partir de los datos de quenching de fluorescencia de las proteínas (Figura 7.3), de los cuales se desprende que el sitio de unión en el subdominio IIA sería el principal sitio de asociación de los complejos de Re(I) con ligando intercalador a la albúmina, estando involucrado en el proceso de asociación el Trp-214, ávido por interacciones del tipo hidrofóbicas.²⁶²

7.5.3 TRANSFERENCIA DE ENERGÍA ALBÚMINA-COMPLEJO

La importancia de la eficacia en la transferencia de energía en la bioquímica está dada por la utilidad que brinda para evaluar la distancia entre el ligando y el fluoróforo en la proteína.

7.5.3.1 ANÁLISIS POR FRET

De acuerdo a la teoría de Förster, la transferencia de energía ocurrirá según:

(i) La orientación relativa de los dipolos del donador y aceptor

- (ii) El grado de solapamiento del espectro de emisión de fluorescencia del donador con el espectro de absorción del aceptor y
- (iii) La distancia entre el donador (albúmina) y aceptor (Complejo de Re(I)).

El quenching de fluorescencia de albúmina en presencia tanto de $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$ como de $[\text{Bu}_4\text{N}[(\text{bpy})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dcbpy})]]$, sugiere que la transferencia de energía ocurre entre ambas especies (complejo-proteína) tal y como lo sugiere la **Figura 7.13**, donde se muestra el solapamiento entre el espectro de emisión de la proteína (línea azul) y el espectro de absorción del complejo metálico (línea negra) para los sistemas BSA- $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$ (**Figura 7.13a**) y HSA- $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$ (**Figura 7.13b**).

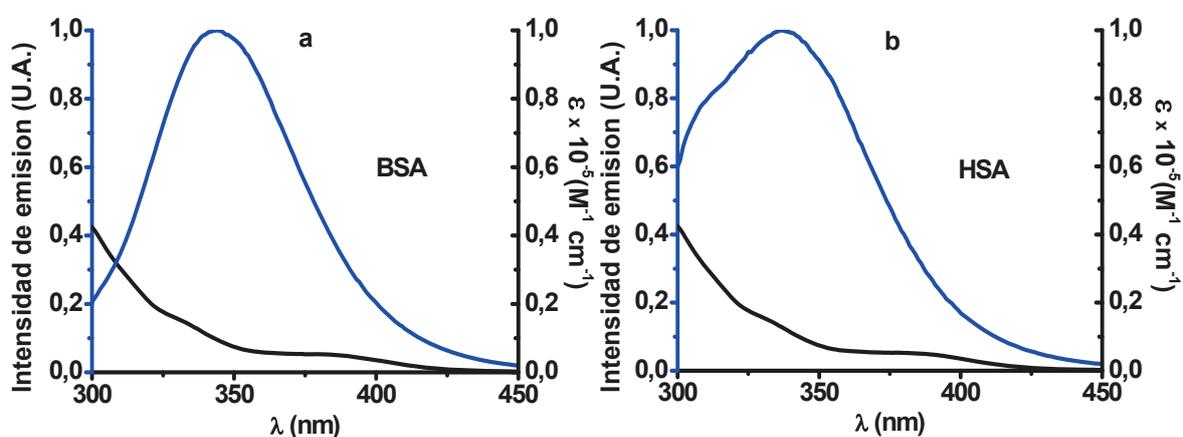


Figura 7.13. Solapamiento de los espectros de emisión y absorción para el sistema Albúmina- $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$. **a.** Espectro de emisión para BSA, $C_{\text{BSA}} = 1,5 \times 10^{-6}$ M (línea azul); y espectro de absorción para $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$, $C_{\text{Re(I)}} = 1,5 \times 10^{-6}$ M (línea negra); $T = 298$ K, buffer fosfatos pH = 7,4; $\lambda_{\text{exc}} = 280$ nm. **b.** Espectro de emisión para HSA, $C_{\text{HSA}} = 1,5 \times 10^{-6}$ M (línea azul); y espectro de absorción para $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$, $C_{\text{Re(I)}} = 1,5 \times 10^{-6}$ M (línea negra), bajo las mismas condiciones experimentales que en **a**.

Un comportamiento similar se puede observar en la **Figura 7.14**, donde se muestra el solapamiento entre el espectro de emisión de la proteína (línea roja) y el espectro de absorción del complejo metálico (línea negra) para los sistemas BSA- $[\text{Bu}_4\text{N}[(\text{bpy})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dcbpy})]]$ (**Figura 7.14a**) y HSA- $[\text{Bu}_4\text{N}[(\text{bpy})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dcbpy})]]$ (**Figura 7.14b**).

La eficiencia de transferencia de energía, E , fue obtenida de acuerdo a la teoría de Förster²⁶³, usando la **Ecuación 7.5**. El parámetro J se calculó a partir del procesamiento de los datos adquiridos de los espectros de absorción (complejo de Re(I), $C = 1,5 \times 10^{-6}$ M) y emisión (albúmina, $C = 1,5 \times 10^{-6}$ M) en el rango de 300-500 nm (**Figuras 7.13** y **7.14**) para concentraciones equimolares ($[\text{donor}] =$

[aceptor]), haciendo uso del programa de Microsoft office Excel 2007. Usando la **Ecuación 7.6**, se determinó la distancia R_0 , usando los parámetros, $k^2 = 2/3$, $\eta = 1,33$ y $\Phi = 0,13$.²⁶⁴⁻²⁶⁵ Los parámetros calculados para cada sistema se listan en las **Tablas 7.4a** y **b**.

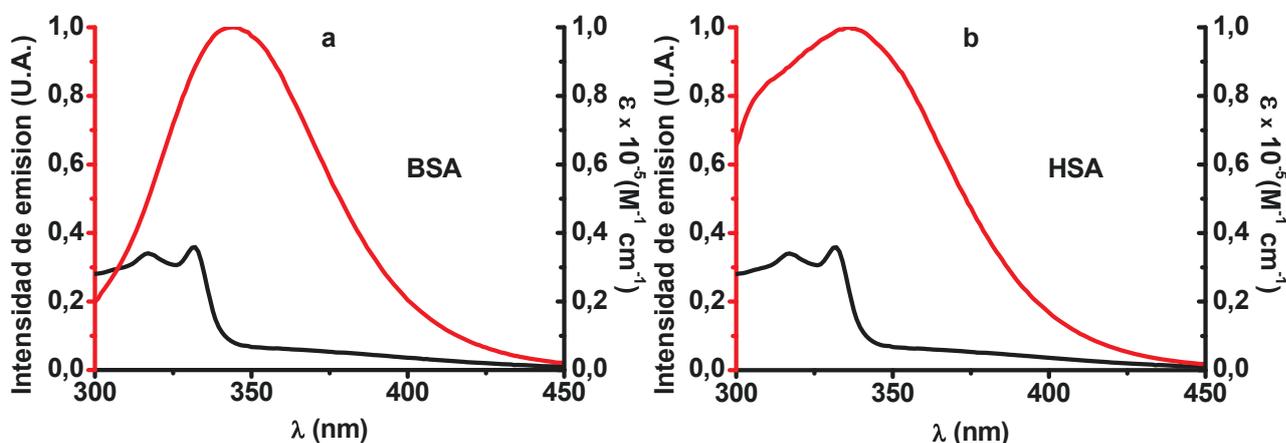


Figura 7.14. Solapamiento de los espectros de emisión y absorción para el sistema Albúmina-[Bu₄N[(bpy)Re(CO)₃(dcbpy)]]. **a.** Espectro de emisión para BSA, $C_{BSA} = 1,5 \times 10^{-6}$ M (línea roja); y espectro de absorción para [Bu₄N[(bpy)Re(CO)₃(dcbpy)]], $C_{Re(I)} = 1,5 \times 10^{-6}$ M (línea negra); T = 299 K, buffer fosfatos pH = 7,4; $\lambda_{exc} = 280$ nm. **b.** Espectro de emisión para HSA, $C_{HSA} = 1,5 \times 10^{-6}$ M (línea roja); y espectro de absorción para [Bu₄N[(bpy)Re(CO)₃(dcbpy)]], $C_{Re(I)} = 1,5 \times 10^{-6}$ M (línea negra), bajo las mismas condiciones experimentales que en **a**.

Tabla 7.4a. Parámetros obtenidos de acuerdo a la teoría de Förster para el proceso de asociación Albúmina-[CRe(CO)₃(BCS)]²⁻.

Parámetros	BSA-[CRe(CO) ₃ (BCS)] ²⁻	HSA-[CRe(CO) ₃ (BCS)] ²⁻
J	$1,19 \times 10^{-14} \text{ cm}^3 \text{ l mol}^{-1}$	$1,79 \times 10^{-14} \text{ cm}^3 \text{ l mol}^{-1}$
R_0	2,57 nm	2,75 nm
E	0,377	0,392
r	2,79 nm	2,96 nm

Tabla 7.4b. Parámetros obtenidos de acuerdo a la teoría de Förster para el proceso de asociación Albúmina-[Bu₄N[(bpy)Re(CO)₃(dcbpy)]].

Parámetros	BSA-[Bu ₄ N[(bpy)Re(CO) ₃ (dcbpy)]	HSA-[Bu ₄ N[(bpy)Re(CO) ₃ (dcbpy)]
J	$1,82 \times 10^{-14} \text{ cm}^3 \text{ l mol}^{-1}$	$2,08 \times 10^{-14} \text{ cm}^3 \text{ l mol}^{-1}$
R_0	2,76 nm	2,82 nm
E	0,274	0,307
r	3,25 nm	3,23 nm

Se puede observar que cada valor de r es menor a $2R_0$ y estos valores son $r < 10$ nm, indicando la fiabilidad de los resultados y que la transferencia de energía desde la proteína (BSA o HSA) a cada uno de los complejos de Re(I) ocurre con alta probabilidad.

7.5.4 CAMBIOS EN LA ESTRUCTURA SECUNDARIA DE LA PROTEÍNA INDUCIDA POR LA PRESENCIA DE $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$ Y $[\text{Bu}_4\text{N}[(\text{BPY})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{DCBPY})]]$

Cuando un ligando se une a una proteína globular, las fuerzas intermoleculares responsables de mantener la estructura secundaria y terciaria pueden ser alteradas, resultando en un cambio conformacional de la proteína.²⁴⁷ La naturaleza de estos cambios depende de las condiciones experimentales y del ligando.

Los resultados presentados en los puntos anteriores nos sugieren que el microambiente en las vecindades inmediatas de los fluoróforos está siendo alterado en consecuencia concomitante con la unión de los complejos metálicos intercaladores en estudio. Podría entonces afirmarse que estén ocurriendo cambios en la estructura de la proteína los cuales se verán reflejados en los espectros de dicroísmo circular. Los espectros de CD registrados en la región del UV-lejano para BSA y BSA- $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$ y BSA y BSA- $[\text{Bu}_4\text{N}[(\text{bpy})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dcbpy})]]$ se muestran en la **Figura 7.15**.

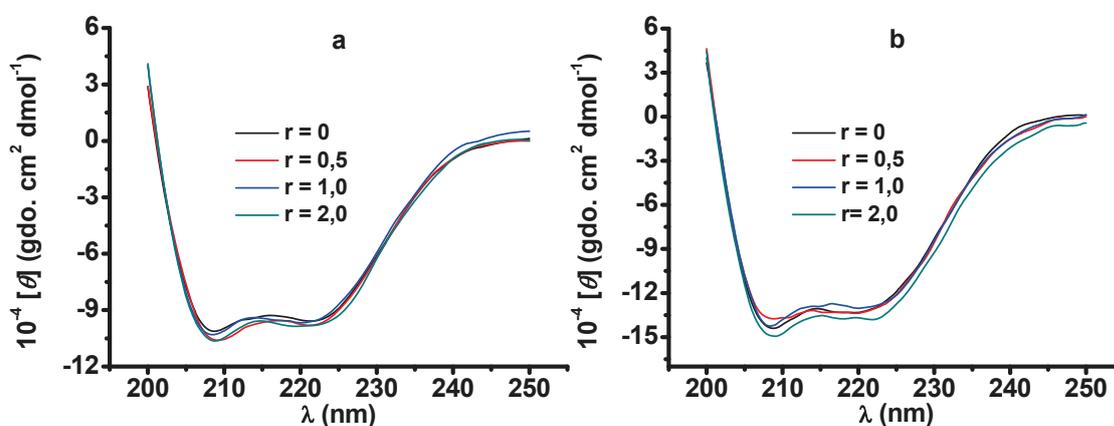


Figura 7.15. a. Espectros de CD para soluciones de BSA (línea negra) y BSA- $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$ con una relación complejo-proteína (r) de 0,5 (línea roja), 1,0 (línea azul) y 2,0 (línea verde). Las concentraciones de las especies fueron $C_{\text{BSA}} = 5 \times 10^{-6}$ M y $C_{\text{Re(I)}} = 1 \times 10^{-5}$ M; $T =$ ambiente, buffer fosfatos pH = 7,4. b. Espectros de dicroísmo circular para soluciones de BSA (línea negra) y BSA- $[\text{Bu}_4\text{N}[(\text{bpy})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dcbpy})]]$ con una relación complejo-proteína (r) de 0,5 (línea roja), 1,0 (línea azul) y 2,0 (línea verde). Las condiciones experimentales fueron las mismas que en a.

La apariencia general del espectro de BSA muestra, en ambos casos, dos mínimos intensos centrados alrededor de $\lambda = 222$ y 208 nm, característico de proteínas que presentan estructura α -hélice. La forma de los espectros es similar para BSA y los sistemas BSA-Re(I). Ya que estos espectros no difieren

en intensidad, es decir, no hay una tendencia a medida que se hacen los diferentes agregados de complejo de Re(I), podemos concluir que no hay cambios espectrales notables que aseguren una modificación importante de la estructura secundaria de la proteína.

7.6 CONCLUSIONES PARCIALES

Los experimentos y observaciones provistos en este Capítulo muestran que los complejos de Re(I) en estudio interaccionan con albúmina sea BSA o HSA, presentando una notable afinidad por el sitio de unión ubicado en el subdominio IIA.

En esencia, se observa que la llegada del complejo metálico al sitio de unión de albúmina afecta el microambiente que rodea a los fluoróforos presentes en la proteína (Trp y Tyr), hecho que se manifiesta en los espectros de fluorescencia para albúmina en presencia de los complejos $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$ y $[\text{Bu}_4\text{N}[(\text{bpy})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dcbpy})]]$.

Como ha podido demostrarse, la asociación está guiada por factores mayormente entálpicos para el sistema BSA- $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$ y mayormente entrópicos para el sistema HSA- $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$, mientras que para los sistemas BSA/HSA- $[\text{Bu}_4\text{N}[(\text{bpy})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dcbpy})]]$ la asociación tiene una contribución mayormente entrópica. Estos resultados permiten asumir que las interacciones de tipo hidrofóbicas gobiernan el proceso de unión dando mayor fuerza a lo argumentado para los resultados provistos por la técnica de fluorescencia. Posterior a la asociación hidrofóbica, interacciones de tipo electrostáticas se harían presentes. Por otro lado, los estudios de dicroísmo circular nos permiten inferir que el proceso de unión sobreviene sin modificaciones estructurales importantes en la proteína.

8 CONCLUSIONES GENERALES

Se sintetizó con éxito un nuevo complejo de Re(I) de fórmula $\text{Bu}_4\text{N}[(\text{bpy})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dcbpy})]$, que presenta estructura zwitteriónica y tiene una buena solubilidad en agua, el cual se caracterizó por ^1H NMR, FTIR y ESI con resultados satisfactorios.

El complejo $\text{Bu}_4\text{N}[(\text{bpy})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dcbpy})]$ presentó 3 valores de pK_a los cuales se obtuvieron por estudios de espectroscopía UV-Vis en función del pH y estudios quimiométricos.

Se realizaron estudios de luminiscencia estacionaria y resuelta en el tiempo, calorimétricos y también cálculos TD-DFT del complejo $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$, los cuales revelaron que sus propiedades fotofísicas están lideradas por la interacción entre los estados $^3\text{MLLCT}$ e IL.

Por estudios sobre la generación de oxígeno singlete, se pudo determinar que el complejo $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$ generó $^1\text{O}_2$ con rendimientos cuánticos altos ($\Phi_{\Delta} \approx 0.5$ en CH_3CN) gracias al *quenching* de luminiscencia de $^3\text{MLLCT}$ por $^3\text{O}_2$. Por otro lado, en soluciones acuosas, debido a la hidrólisis del complejo $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$, el comportamiento fotofísico de este se ve alterado por el reemplazo del Cl por la molécula de H_2O en la esfera de coordinación del metal. La contribución de la luminiscencia de carácter $^3\text{MLLCT}$ al Φ_{emi} cae y el estado IL gobierna el comportamiento fotofísico. Una consecuencia directa es que no se genera $^1\text{O}_2$ en solución acuosa.

Además, la variación del pH de la solución para el complejo $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$, modifica las propiedades fotofísicas de este mediante el cambio de las cantidades relativas de las especies $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$, $[(\text{OH})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$ y $[(\text{H}_2\text{O})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^-$. A pHs altos (entre 10 y 7) prevalecen las especies $[(\text{OH})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$ y $[\text{ClRe}(\text{CO})_3(\text{BCS})]^{2-}$ y la luminiscencia del complejo es

dominada por el estado 1L del ligando coordinado BCS, mientras que en el rango de pH entre 7 y 2 se produce un importante incremento del rendimiento cuántico de luminiscencia $\Phi_{em} \approx 0,067$ (casi unas 6 veces comparado con el Φ_{em} a pHs entre 10 y 7) y la especie predominante se convierte en $[(H_2O)Re(CO)_3(BCS)]^-$.

Re-an y Re-pyr son excelentes fotosensibilizadores para la generación de oxígeno singlete.

Se pudo determinar que en los complejos de Re(I) de naturaleza $[L_s-CO_2-Re(CO)_3L]$, Re-an y Re-pyr, el estado excitado responsable de la generación de oxígeno singlete, por la ruta de transferencia de energía al oxígeno molecular, es $^3^1L$.

Los datos calorimétricos combinados con los datos de fluorescencia y rendimiento cuántico de producción de oxígeno singlete para los complejos estudiados completaron el balance de energía correspondiente a la ecuación:
 $E_a = \Phi_{emi}E_{emi} + \alpha E_a + \Phi_{st}E_{st}$.

Tanto $Bu_4N[(bpy)Re(CO)_3(dcbpy)]$ como $[ClRe(CO)_3(BCS)]^{2-}$ mostraron que pueden interaccionar con tanto con albúmina BSA como HSA, presentando una notable afinidad por el sitio de unión ubicado en el subdominio IIA. Además, se observa que la llegada del complejo metálico al sitio de unión de albúmina afecta el microambiente que rodea a los fluoróforos presentes en la proteína (Trp y Tyr), hecho que se manifiesta en el cambio de intensidad en los espectros de fluorescencia para albúmina en presencia de los complejos $[ClRe(CO)_3(BCS)]^{2-}$ y $[Bu_4N[(bpy)Re(CO)_3(dcbpy)]]$, lo que los hace posibles candidatos en su aplicación en TFD.

Como se pudo observar, los procesos de asociación estudiados están guiados por factores tanto entálpicos como entrópicos y las interacciones hidrofóbicas gobiernan el proceso de unión complejo-proteína sin afectación de la estructura α -hélice de esta última.

- (1) Kumar Arvind, S. S.-S., Lees Alistair J. *Photophysics and Photochemistry of Organometallic Rhenium Diimine Complexes*, 2010.
- (2) Roth, H. D. *Angewandte Chemie International Edition in English* **1989**, *28*, 1193.
- (3) SPIE, P. *Selected Papers on Photochemistry*; SPIE Press, 1993; Vol. MS65.
- (4) Holten Dewey, B. D. F., Lindsey Jonathan S. *Accounts of Chemical Research* **2002**, *35*, 57.
- (5) Remacle F., L. R. D. *The Journal of Physical Chemistry B* **2001**, *105*, 2153.
- (6) Yeow Edwin K. L., S. R. P. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2003**, *5*, 97.
- (7) Yeow Edwin K. L., S. R. P. *Chemical Physics Letters* **2003**, *377*, 391.
- (8) Crosby G. A., W. R. J., Carstens D. H. W. *Science* **1970**, *170*, 1195.
- (9) Balzani Vincenzo , B. F., Gandolfi Maria Teresa , Maestri Mauro *Organic Chemistry and Theory* Berlin/Heidelberg, 1978; Vol. 75.
- (10) DeArmond M. Keith , C. C. M. *Coordination Chemistry Reviews* **1981**, *36*, 325.
- (11) Meyer, T. J. *Pure and Applied Chemistry* **1986**, *58*, 1193.
- (12) Juris A., B. V., Barigelletti F., Campagna S., Belser P., von Zelewsky A. *Coordination Chemistry Reviews* **1988**, *84*, 85.
- (13) Kalyanasundaram, K. *Photochemistry of Polypyridine and Porphyrin Complexes* London, U.K., 1992.
- (14) Ferraudi G. , F. M., Wolcan E. , Hsu I. , Moya S. A. , Guerrero J. *The Journal of Physical Chemistry* **1995**, *99*, 4929.
- (15) Ruiz G. T., W. E., Féliz M.R. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **1996**, *101*, 119.
- (16) Feliz M. , F. G., Altmiller H. *The Journal of Physical Chemistry* **1992**, *96*, 257.
- (17) Feliz M. , F. G. *The Journal of Physical Chemistry* **1992**, *96*, 3059.
- (18) Ruiz G. , W. E., Capparelli A.L. , Féliz M.R. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **1995**, *89*, 61.
- (19) Ruiz G. , R.-N. F., Wolcan E. , Féliz M.R. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **1997**, *107*, 47.
- (20) Feliz M.R. , R.-N. F., Ruiz G. , Wolcan E. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **1998**, *117*, 185.
- (21) Feliz M. , F. G. *Inorganic Chemistry* **1998**, *37*, 2806.

- (22) Guerrero J., P. O. E., Wolcan E., Feliz M.R., Ferraudi G., Moya S.A. *Organometallics* **2001**, 20, 2842.
- (23) Ruiz G.T., J. M. P., Lezna R.O., Wolcan E., Feliz M.R., Ferraudi G. *Dalton Transactions* **2007**, 2020.
- (24) Wolcan E., T. G., Tocho J., Piro O. E., Juliarena P., Ruiz G., Féliz M. R. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions* **2002**, 2194.
- (25) Juliarena M. P., R. G. T., Wolcan E., Lezna R. O., Feliz M. R., Ferraudi G., Guerrero J. *Organometallics* **2007**, 26, 272.
- (26) Wolcan E., F. G. *The Journal of Physical Chemistry A* **2000**, 104, 9281.
- (27) Wolcan E., F. G., Feliz M.R., Gómez R.V., Mikelsons L. *Supramolecular Chemistry* **2003**, 15, 143.
- (28) Wolcan Ezequiel, F. M. R. *Photochemical & Photobiological Sciences* **2003**, 2, 412.
- (29) Feliz M.R., F. G. *Inorganic Chemistry* **2004**, 43, 1551.
- (30) Wolcan Ezequiel, A. J. L., Féliz Mario R. *The Journal of Physical Chemistry B* **2005**, 109, 22890.
- (31) Wolcan Ezequiel, F. M. R., Alessandrini Jose L., Ferraudi Guillermo *Inorganic Chemistry* **2006**, 45, 6666.
- (32) Bracco L. L. B., J. M. P., Ruiz G. T., Féliz M. R., Ferraudi G. J., Wolcan E. *The Journal of Physical Chemistry B* **2008**, 112, 11506.
- (33) Geoffroy Gregory L., W. M. S.; Academic Pr.: New York, 1980.
- (34) Wrighton Mark, M. D. L. *Journal of the American Chemical Society* **1974**, 96, 998
- (35) Lees, A. J. *Chemical Reviews* **1987**, 87, 711
- (36) Lees A.J., S. S. S. i. M. J. A. a. M. T. J. *Comprehensive Coordination Chemistry II*; Elsevier: Oxford, UK, 2004; Vol. 2.
- (37) Kirgan R.A., S. B. P., Rillema D.P. *Photochemistry and Photophysics of Coordination Compounds II Topics in Current Chemistry*; Springer, 2007; Vol. 281.
- (38) Lees, A. J. *Comments on Inorganic Chemistry* **1995**, 17, 319
- (39) Chen Pingyun, M. T. J. *Chemical Reviews* **1998**, 98, 1439.
- (40) Stufkens, D. J. *Comments on Inorganic Chemistry* **1992**, 13, 359.
- (41) Vogler Arnd, K. H. *Coordination Chemistry Reviews* **2000**, 200-202, 991.
- (42) Balzani Vincenzo, J. A., Venturi Margherita *Chemical Reviews* **1996**, 96, 759.

- (43) Schanze K.S., W. K. A. *Organic and Inorganic Photochemistry*; Marcel Dekker Inc.: New York, 1998; Vol. 2.
- (44) Schanze K.S., M. D. B., Perkins T.A., Cabana L.A. *Coordination Chemistry Reviews* **1993**, 122, 63.
- (45) Worl Laura A. , D. R., Chen Pingyun , Della Ciana Leopoldo, Meyer Thomas J. *Journal of the American Chemical Society, Dalton Transactions* **1991**, 849
- (46) Stufkens Derk J., V. J. A. *Coordination Chemistry Reviews* **1998**, 177, 127
- (47) Takeda Hiroyuki, K. K., Inoue Haruo, Ishitani Osamu *Journal of the American Chemical Society* **2008**, 130, 2023.
- (48) Abdel-Shafi Ayman A. , B. J. L., Alia Sameh S. *Dalton Transactions* **2007**, 2510.
- (49) Belliston-Bittner Wendy , D. A. R., Nguyen Yen Hoang Le , Stuehr Dennis J. , Winkler Jay R. , Gray Harry B. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, 127, 15907.
- (50) Hayashi Yukiko , K. S., Brunschwig Bruce S., Fujita Etsuko *Journal of the American Chemical Society* **2003**, 125, 11976.
- (51) Hwang Jin-Soo , C. J.-S., Park Sang-Eon , Ikeue Keita , Anpo Masakazu *Topics in Catalysis* **2005**, 35, 311.
- (52) Kumar Arvind, S. S.-S., Lees Alistair J. *Coordination Chemistry Reviews* **2008**, 252, 922.
- (53) Sun Shih-Sheng, L. A. J. *Coordination Chemistry Reviews* **2002**, 230, 171.
- (54) Sun Shih-Sheng, L. A. J. *Chemical Communications* **2000**, 1687.
- (55) Mizuno Toshihisa, F. T., Takeuchia Masayuki, Shinkai Seiji *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **2000**, 407.
- (56) Keefe Melinda H., S. R. V., Hupp Joseph T., Czaplewski Kenneth F., Snurr Randall Q., Stern Charlotte L. *Langmuir* **2000**, 16, 3964.
- (57) Bakir Mohammed, M. J. A. M. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions* **1997**, 3571
- (58) De Silva A. Prasanna , N. G. H. Q., Gunnlaugsson Thorfinnur , J. M. Huxley Allen , McCoy Colin P., Rademacher Jude T., Rice Terence E. *Chemical Reviews* **1997**, 97, 1515.
- (59) Demas J. N. , D. B. A. *Analytical Chemistry* **1991**, 63, 829A
- (60) Lees, A. J. *Coordination Chemistry Reviews* **1998**, 177, 3
- (61) Lees, A. J. *Optical Sensors and Switches* New York, 2001; Vol. 7.
- (62) Sun Shih-Sheng, A. J. L. *Organometallics* **2002**, 21, 39.
- (63) Polo André Sarto, I. M. K., Frin Karina Morelli, Toledo Patrocínio Antonio Otávio de, Murakami Iha Neyde Yukie *Coordination Chemistry Reviews* **2006**, 250, 1669

- (64) Argazzi R. , B. E., Chiorboli C. , Bignozzi C. A. , Itokazu M. K. , Murakami Iha N. Y. *Inorganic Chemistry* **2001**, 40, 6885
- (65) Lewis Jared D. , P. R. N., Moore John N. **2000**, 1865
- (66) Sun Shih-Sheng, R. E., Dunwoody Nicholas, Silva Alexandra S., Brinnb Ira M., Lees Alistair J. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **2000**, 201
- (67) Fernández-Acebes Alvaro, L. J.-M. *Chemistry A European Journal* **1999**, 5, 3285
- (68) Yam Vivian Wing-Wah, L. V. C.-Y., Wu Li-Xin *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions* **1998**, 1461
- (69) Schanze Kirk S. , L. L. A., Cooper Megan, Walters Keith A., Ji Hai-Feng, Sabina Osvaldo *The Journal of Physical Chemistry A* **1998**, 102, 5577
- (70) Beyeler Andreas, B. P., De Cola Luisa *Angewandte Chemie International Edition in English* **1997**, 36, 2779
- (71) Yam Vivian Wing-Wah, L. V. C.-Y., Cheung Kung-Kai *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1995**, 259.
- (72) Lundin Natasha J., B. A. G., Gordon Keith C., Officer David L. *Angewandte Chemie International Edition in English* **2006**, 45, 2582.
- (73) Li Xiao, Z. D., Li Wenlian, Chu Bei, Han Liangliang, Zhu Jianzhuo, Su Zisheng, Bi Defeng, Wang Dan, Yang Dongfang, Chen Yiren. *Applied Physics Letters* **2008**, 92, 083302/1.
- (74) Liu Chunbo, L. J., Li Bin, Hong Ziruo, Zhao Feifei, Liu Shiyong, Li Wenlian *Applied Physics Letters* **2006**, 89, 243511/1.
- (75) Si Zhenjun, L. J., Zhao Feifei, Liu Shiyong, Li Wenlian *Inorganic Chemistry* **2007**, 46, 6155.
- (76) Ranjan Sudhir, L. S.-Y., Hwang Kuo-Chu, Chi Yun, Ching Wei-Li, Liu Chao-Shiuan *Inorganic Chemistry* **2003**, 42, 1248.
- (77) Zhang Yong , H. Z., Zeng Wenjin , Cao Yong *Polymer* **2008**, 49, 1211.
- (78) Lee Po-I. , H. S. L.-C., Chung Chia-Tin *Synthetic Metals* **2006**, 156, 907.
- (79) Zhang Jiaxin, C. B. W.-K., Zhu Nianyong, Yam Vivian Wing-Wah *Organometallics* **2007**, 26, 5423.
- (80) Yam Vivian Wing-Wah, Y. Y., Yang He-Ping , Cheung Kung-Kai *Organometallics* **1999**, 18, 5252.
- (81) Briel Oliver , S. K., Krossing Ingo , Nöth Heinrich , Schmäzlin Elmar , Meerholz Klaus , Bräuchle Christoph, Beck Wolfgang *European Journal of Inorganic Chemistry* **1999**, 1999, 483.
- (82) Bourgault Manuel , B. K., Le Bozec Hubert , Pucetti Germain , Ledoux Isabelle, Zyss Joseph *New Journal of Chemistry* **1998**, 22, 517.

- (83) Vitor Rute F. , C. I., Videira Margarida , Marques Fernanda , Paulo António , Costa Pessoa João , Viola Giampietro , Martins Gabriel G., Santos Isabel *ChemBioChem* **2008**, 9, 131.
- (84) Ma Dik-Lung, C. C.-M., Siu Fung-Ming , Yang Mengsu, Wong Kwok-Yin *Inorganic Chemistry* **2007**, 46, 740.
- (85) Ruiz G. T. , J. M. P., Lezna R. O. , Wolcan E. , Feliz M. R., Ferraudi G. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions* **2007**, 2007, 2020.
- (86) Reece Steven Y., N. D. G. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, 127, 9448.
- (87) Stoeffler Heather D. , T. N. B., Temkin Stacy L. , Schanze Kirk S. *Journal of the American Chemical Society* **1995**, 117, 7119.
- (88) Fuks L. , G. E., Mieczkowski J. , Sadlej-Sosnowska N. *Polyhedron* **2008**, 27, 1353.
- (89) Tzanopoulou Stamatia, P. I. C., Patsis George , Paravatou-Petsotas Maria , Livaniou Evangelia , Papadopoulos Minas , Pelecanou Maria *Journal of Medicinal Chemistry* **2006**, 49, 5408.
- (90) Dunn Alexander R. , B.-B. W., Winkler Jay R. , Getzoff Elizabeth D. , Stuehr Dennis J. , Gray Harry B. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, 127, 5169.
- (91) Zhang Jianyong , V. J. J., Henderson William , Wheaton Jessica R. , Hall Iris H. , Hor T.S.Andy , Yan Yaw Kai *Journal of Organometallic Chemistry* **2002**, 650, 123.
- (92) Pietzsch H.-J. , G. A., Reisgys M. , Drews A. , Seifert S. , Syhre R. , Spies H. , Alberto R. , Abram U. , Schubiger P. A. , Johannsen B. *Bioconjugate Chemistry* **2000**, 11, 414.
- (93) Ruíz G. T. , r. r., Universidad nacional de La Plata, 2003.
- (94) Scaiano, J. C. *Handbook of organic photochemistry*; CRC Press: Boca Raton, 1989.
- (95) Turro, N. J. *Modern Molecular Photochemistry* Sausalito, CA, 1991.
- (96) Wayne C. E. , W. R. P. *Photochemistry*; Oxford University Press: Oxford, 1996.
- (97) Gensch Thomas , V. C. *Photochemical & Photobiological Sciences* **2003**, 699.
- (98) Callis J. B. , P. W. W., Gouterman M. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* **1972**, 267, 348.
- (99) Arata H., P. W. W. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* **1981**, 636, 70.
- (100) Patel C. K. N. , T. A. C. *Reviews of Modern Physics* **1981**, 53, 517.
- (101) Tam, A. C. *Reviews of Modern Physics* **1986**, 58, 381.
- (102) Braslavsky S. E., H. G. E. *Chemical Reviews* **1992**, 92, 1381.

- (103) Bialkowski, S. E. *Photothermal Spectroscopy Methods for Chemical Analysis* New York, 1996; Vol. 134.
- (104) Falvey, D. E. *Photochemistry and Photobiology* **1997**, *65*, 4.
- (105) Schulenberg P. J., B. S. E. *Time-resolved photothermal studies with biological supramolecules*; SPIE Press, 1997.
- (106) Miller, R. J. D. *Accounts of Chemical Research* **1994**, *27*, 145.
- (107) Losi A. , W. A. A., Engelhard M., Braslavsky S. E. *Journal of the American Chemical Society* **2001**, *123*, 1766.
- (108) Borsarelli C. D. , B. S. E. *Journal of Physical Chemistry B* **1998**, *102*, 6231.
- (109) Borsarelli Claudio D. B, B. S. E. *Journal of physical Chemistry A* **1999**, *103*, 1719.
- (110) Asano T. , L. W. J. *Chemical Reviews* **1978**, *78*, 407.
- (111) Drljaca A. , H. C. D., VanEldik R., Asano T. , Basilevsky M. V. , LeNoble W. J. *Chemical Reviews* **1998**, *98*, 2167.
- (112) VanEldik R. , A. T. L. W. J. *Chemical Reviews* **1989**, *89*, 549.
- (113) Fork D. C., H. S. K. *Photochemistry and Photobiology* **1993**, *57*, 207.
- (114) Malkin S., C. O. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **1994**, *45*, 493.
- (115) Herbert S. K., H. T., Vogelmann T. C. *Photosynthesis Research* **2000**, *66*, 13.
- (116) Peters Kevin S., W. T., Logan Timothy *Journal of the American Chemical Society* **1992**, *114*, 4276.
- (117) Crippa P.R., V. A., Viappiani C. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **1994**, *24*, 3.
- (118) Gensch T. , V. C., Braslavsky S. E. In *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*; J. C. Lindon, G. E. T., and J. L. Holmes, Ed.; Academic Press: London, 1999; Vol. 2, p 1124.
- (119) Melton L. A. , N. T., Lu Q. *Review of Scientific Instruments* **1989**, *60*, 3217.
- (120) Arnaut Luís G. , C. R. A., Elbert Jeffrey E., Melton Lynn A. *Review of Scientific Instruments* **1992**, *63*, 5381.
- (121) Puchenkov Oleg V., M. S. *Review of Scientific Instruments* **1996**, *67*, 672.
- (122) Puchenkov Oleg V. , K. Z., Malkin Shmuel *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1995**, *1231*, 197.
- (123) Edens Gregory J., G. M. R., Qiang Xu, Mauzerall David *Journal of the American Chemical Society* **2000**, *122*, 1479.

- (124) Puchenkov, O. V. *Biophysical Chemistry* **1995**, *56*, 241.
- (125) Diebold, G. J. *Journal of Physical Chemistry B* **1998**, *102*, 5404.
- (126) Peters K.S., S. G. J. *Science* **1988**, *241*, 1053.
- (127) Abbruzzetti Stefania, V. C., Murgidab Daniel H. , Erra-Balsellsb Rosa, Bilmes Gabriel M. *Chemical Physics Letters* **1999**, *304*, 167.
- (128) Schulenberg P. J., R. M., Gärtner W., Braslavsky S. E. *Biophysical Journal* **1994**, *66*, 838.
- (129) Logunov Stephan L., E.-S. M. A. *Journal of Physical Chemistry B* **1997**, *101*, 6629.
- (130) Ph. Van Haver, L. V., M. Van der Auweraer, F.C De Schryver *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **1992**, *63*, 265.
- (131) Stufkens Derk J., V. J. A. *Coordination Chemistry Reviews* **1998**, *177*, 127.
- (132) Fox M.A., C. M. *Photoinduced Electron Transfer* Amsterdam, 1988.
- (133) Grätzel, M. *Energy Resources Through Photochemistry and Catalysis* New York, 1983.
- (134) Kalyanasundaram, K. *Coordination Chemistry Reviews* **1982**, *46*, 159.
- (135) Kalyanasundaram K., G. M. *Photosensitization and Photocatalysis Using Inorganic and Organometallic Compounds* Dordrecht, 1993.
- (136) Sacksteder LouAnn, L. M., Demas J. N., DeGraff B. A. *Journal of the American Chemical Society* **1993**, *115*, 8230.
- (137) Wing-Wah Yam Vivian , M.-C. W. K., Wing-Man Lee Vicky , Kam-Wing Lo Kenneth , Cheung Kung-Kai *Organometallics* **1995**, *14*, 4034–4036.
- (138) Yoon Dong I., B.-B. C. A., Lu Hong, Hupp Joseph T. *Inorganic Chemistry* **1992**, *31*, 3192.
- (139) Calabrese J.C., T. W. *Chemical Physics Letters* **1987**, *133*, 244.
- (140) Ehler Timothy T. , M. N., Carron Keith , Sullivan B. Patrick, Noe Lewis J. *The Journal of Physical Chemistry B* **1997**, *101*, 3174.
- (141) Wing-Wah Yam Vivian, C.-Y. L. V., Kung-Kai Cheung *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1995**, 259.
- (142) Higgins Bernadette, D. B. A., Demas J. N. *Inorganic Chemistry* **2005**, *44*, 6662.
- (143) Fagioli Ulises N., G. E. F. S., Cobos Carlos J. , Ruiz Gustavo T. , Félix Mario R. , Wolcan Ezequiel *The Journal of Physical Chemistry A* **2011**, *115*, 10979.
- (144) Bottorff Shalina C. , M. A. L., Wemple Ariana R. , Bučar Dejan-Krešimir , MacGillivray Leonard R. , Benny Paul D. *Inorganic Chemistry* **2013**, *52*, 2939.

- (145) Vlček, A. *Photophysics of Organometallics*; Springer: Berlin/Heidelberg, 2010; Vol. 29.
- (146) Kumar Arvind, S. S.-S., Lees Alistair J. *Photophysics of Organometallics*; Springer ed. Berlin/Heidelberg, 2010; Vol. 29.
- (147) Louie Man-Wai , T.-H. F. T., Kam-Wing Lo Kenneth *Inorganic Chemistry* **2011**, 50, 9465.
- (148) Lo, K. *Photophysics of Organometallics*; Springer ed. Berlin/Heidelberg, 2010; Vol. 29.
- (149) Foxon Simon P. , A. M. A. H., Walker Mike G. , Meijer Anthony J. H. M. , Sazanovich Igor V. , Weinstein Julia A., Thomas James A. *The Journal of Physical Chemistry A* **2009**, 113, 12754.
- (150) Bhuvaneswari Jayaraman, F. A. K., Rajagopal Seenivasan *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **2012**, 227, 38.
- (151) Cattaneo M., F. F., Borsarelli C.D., Katz N.E. *Inorganic Chemistry* **2009**, 48, 3012.
- (152) Cattaneo M., F. F., Katz N.E. *Inorganic Chemistry* **2006**, 45, 6884.
- (153) Cattaneo M., F. F., Katz N.E., Borsarelli C.D., Parella T. *European Journal of Inorganic Chemistry* **2007**, 5309.
- (154) Lin Ren-Jay , L. K.-S., Chang I-Jy *Inorganica Chimica Acta* **1996**, 242, 179.
- (155) Ragone F. , R. G. T., Piro O.E. , Echeverría G.A. , Cabrerizo F.M. , Petroselli G. , Erra-Balsells R. , Hiraoka K. , García Einschlag F.S. , Wolcan E. *European Journal of Inorganic Chemistry* **2012**, 2012, 4801.
- (156) Juris Alberto, C. S., Bidd Ilesh, Lehn Jean Marie, Ziessel Raymond *Inorganic Chemistry* **1988**, 27, 4007.
- (157) Hop Cornelis E.C.A., S. D. A., Gaines Donald F. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1995**, 6, 860.
- (158) Petroselli Gabriela , E.-B. R., David Gara Pedro , Bilmes Gabriel M. *Photochemical & Photobiological Sciences* **2012**, 11, 1062.
- (159) Van Berkel Gary J., M. S. A., Glish Gary L. *Analytical Chemistry* **1992**, 64, 1586.
- (160) García-Einschlag, F. S.; 9.5 ed.; 395814, C. N., Ed. Argentina, 2005.
- (161) Ruckebusch C. , A. S., Blanchet L., Huvenne J.P., Buntinx G. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **2008**, 91, 17.
- (162) Tauler, R. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **1995**, 30, 133.
- (163) Goetz Martin, S. I. *Journal of the American Chemical Society* **1993**, 115, 11123.
- (164) Blanco M., P. A. C., Mas J. *Analytica Chimica Acta* **2005**, 544, 199.

- (165) Melouna Milan , Č. J., Mikšika Petr , Breretonb Richard G. *Analytica Chimica Acta* **2000**, 423, 51.
- (166) de Juan A., T. R. *Analytica Chimica Acta* **2003**, 500, 195.
- (167) Gemperline Paul J. , C. E. *Analytical Chemistry* **2003**, 75, 4236.
- (168) Garcia-Einschlag, F. S.; 9.5 ed.; 395814, C. N., Ed. 2005.
- (169) Hohenberg P. , K. W. *Physical Review* **1964**, 136, B864.
- (170) Kohn W., S. L. J. *Physical Review* **1965**, 140, A1133.
- (171) Parr Robert G., W. Y. *Density-Functional Theory of Atoms and Molecules* New York, Oxford, 1989.
- (172) Frisch M.J. , T. G. W., Schlegel H.B. , Scuseria G.E. , Robb M.A. , Cheeseman J.R. , Scalmani G. , Barone V. , Mennucci B. , Petersson G.A. , Nakatsuji H. , Caricato M. , Li X. , Hratchian H.P. , Izmaylov A.F. , Bloino J. , Zheng G. , Sonnenberg J.L. , Hada M. , Ehara M. , Toyota K. , Fukuda R. , Hasegawa J. , Ishida M. , Nakajima T. , Honda Y. , Kitao O., Nakai H. , Vreven T. , Montgomery J.J.A. , Peralta J.E. , Ogliaro F. , Bearpark M. , Heyd J.J. , Brothers E. , Kudin K.N. , Staroverov V.N. , Keith T. , Kobayashi R. , Normand J. , Raghavachari K. , Rendell A. , Burant J.C. , Iyengar S.S. , Tomasi J. , Cossi M. , Rega N. , Millam J.M. , Klene M. , Knox J .E. , Cross J.B. , Bakken V. , Adamo C. , Jaramillo J. , Gomperts R. , Stratmann R.E. , Yazyev O. , Austin A.J. , Cammi R. , Pomelli C. , Ochterski J.W. , Martin R.L. , Morokuma K. , Zakrzewski V.G. , Voth G.A. , Salvador P. , Dannenberg J.J. , Dapprich S. , Daniels A.D. , Farkas O. , Foresman J.B. , Ortiz J.V. , Cioslowski J. , Fox D.J. , Wallingford, CT, 2010.
- (173) Becke, A. D. *The Journal of Chemical Physics* **1993**, 98, 5648.
- (174) Lee Chengteh, Y. W., Parr Robert G. *PHYSICAL REVIEW B* **1988**, B37, 785.
- (175) Dunning Jr. T.H. , H. P. J. *Methods of Electronic Structure Theory*; Plenum Press: New York, 1977.
- (176) Hay P. Jeffrey, W. W. R. *The Journal of Chemical Physics* **1985**, 82, 270.
- (177) Hay P. Jeffrey, W. W. R. *The Journal of Chemical Physics* **1985**, 82, 299.
- (178) Wadt Willard R. , H. P. J. *The Journal of Chemical Physics* **1985**, 82, 284.
- (179) Bauernschmitt Rüdiger , A. R. *Chemical Physics Letters* **1996**, 256, 454.
- (180) Casida Mark E., J. C., Casida Kim C., Salahub Dennis R. *The Journal of Chemical Physics* **1998**, 108, 4439.
- (181) Stratmann R. Eric , S. G. E., Frisch Michael J. *The Journal of Chemical Physics* **1998**, 109, 8218.
- (182) Barone Vincenzo, C. M. *The Journal of Physical Chemistry A* **1998**, 192, 1995.
- (183) Cossi Maurizio, B. V. *The Journal of Chemical Physics* **2001**, 115, 4708.
- (184) Mennucci Benedetta, T. J. *The Journal of Chemical Physics* **1997**, 106, 5151.

- (185) Werrett Melissa V. , C. D., Gale Julian D. , Hanan Garry S. , MacLellan Jonathan G. , Massi Massimiliano , Muzzioli Sara , Raiteri Paolo , Skelton Brian W., Silberstein Morry , Stagni Stefano *Inorganic Chemistry* **2011**, 50, 1229.
- (186) Yawei W., W. S., Yun Y., Xiaoyun C. In *ICBBE 2009* 2009.
- (187) Garrido Frenich A., P. Z. D., Martínez Vidal J. L., Martínez Galera M. *Analytica Chimica Acta* **2001**, 449, 143.
- (188) Nazeeruddin M. K., K. K. *Inorganic Chemistry* **1989**, 28, 4251.
- (189) Nazeeruddin M. K., Z. S. M., Humphry-Baker R., Jirousek M., Liska P., Vlachopoulos N., Shklover V., Fischer Christian-H., Grätzel M. *Inorganic Chemistry* **1999**, 38, 6298.
- (190) Zhang Songsheng , S. R. E. *Transition Metal Chemistry* **1992**, 17, 199.
- (191) Gao Yunling, S. S., Han Keli *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2009**, 71, 2016.
- (192) Vlček Jr. Antonín, Z. S. *Coordination Chemistry Reviews* **2007**, 251, 258.
- (193) Dietrich Jan, T. U., Förster Christoph, Heinze Katja *Inorganic Chemistry* **2013**, 52, 1248.
- (194) Chartrand Daniel, C. R. C. A., Hanan Garry S. *Inorganic Chemistry* **2012**, 51, 12738.
- (195) Zhao Chongchao, K. C. S., Yang Ye, Kaledin Alexey L., Musaev Djmaladdin G., Lian Tianquan, Hill Craig L. *Inorganic Chemistry* **2013**, 52, 671.
- (196) Anderson Christopher B., E. A. B. S., McAdam C. John , Gordon Keith C., Crowley James D. *Organometallics* **2013**, 32, 788.
- (197) Li Yang, A.-M. R., Ji-Kang Feng, Xiao-Juan Liu, Yu-Guang Ma, Ming Zhang, Xiao-Dong Liu, Jia-Cong Shen, Hong-Xing Zhang *the Journal of Physical Chemistry A* **2004**, 108, 6797.
- (198) Li Yang , A.-M. R., Ji-Kang Feng, Xiao-Dong Liu, Yu-Guang Ma, Hong-Xing Zhang *Inorganic Chemistry* **2004**, 43, 5961.
- (199) Zálíš Stanislav , M. C. J., Nahhas Amal El , Blanco-Rodríguez Ana María , van der Veen Renske M., Vlček Jr. Antonín *Inorganic Chemistry* **2013**, 52, 5775.
- (200) Wolcan E., T. G., Tocho J., Piro O. E., Juliarena P., Ruiz G., Féliz M. R. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions* **2002**, 2194.
- (201) Pis-Diez Reinaldo , P.-C. B. S., Franca Carlos A. , Piro Oscar E. , Castellano Eduardo E. , González-Baró Ana C. *Journal of Molecular Structure* **2010**, 975, 30.
- (202) Martinez Saavedra Héctor H. , F. C. A., Petroselli Gabriela , Erra-Balsells Rosa , Ruiz Gustavo T. , Wolcan Ezequiel *Journal of Organometallic Chemistry* **2013**, 745-746, 470.
- (203) Haas Kathryn L. , F. K. J. *Chemical Reviews* **2009**, 109, 4921.

- (204) Ruiz G.T. , J. M. P., Wolcan E. , Ferraudi G. *Inorganica Chimica Acta* **2007**, 360, 3681.
- (205) Braslavsky Silvia E. , H. G. E. *Chemical Reviews* **1992**, 92, 1381.
- (206) Schmidt Reinhard , T. C., Dunsbach Ralf , Wolff Christian *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **1994**, 79, 11.
- (207) San Roman Enrique , G. M. C. *The Journal of Physical Chemistry* **1989**, 93, 3532.
- (208) Feller, D. *Journal of Computational Chemistry* **1996**, 17, 1571.
- (209) Schuchardt Karen L. , D. B. T., Elsethagen Todd , Sun Lisong , Gurumoorthi Vidhya , Chase Jared , Li Jun , Windus Theresa L. *Journal of Chemical Information and Modeling* **2007**, 47, 1045.
- (210) Gorelsky S.I. , L. A. B. P. *Journal of Organometallic Chemistry* **2001**, 635, 187.
- (211) Gorelsky, S. I.; Revision 6.81 ed.
- (212) Wolcan, E. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2014**, 129, 173.
- (213) Fernández-Moreira Vanesa , T.-G. F. L., Amoroso Angelo J. , Cable Joanne , Court Jonathan B. , Gray Victoria , Hayes Anthony J. , Jenkins Robert L. , Kariuki Benson M. , Lloyd David , Millet Coralie O. , Williams Catrin Ff. , Coogan Michael P. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2010**, 8, 3888.
- (214) Amoroso Angelo J., C. M. P., Dunne Jennifer E., Fernández-Moreira Vanesa, Hess Jacob B., Hayes Anthony J., Lloyd David , Millet Coralie, Pope Simon J. A., Williams Craig *Chemical Communications* **2007**, 3066.
- (215) Gorelsky S.I. , L. A. B. P. *Canadian Journal of Analytical Sciences and Spectroscopy* **2003**, 48, 93.
- (216) O'Boyle, N.; GaussSum 2.2.5 program documentation ed., p (http://gausssum.sourceforge.net/GaussSum_UVVis_Convolution.pdf).
- (217) Listorti Andrea, D. E., Kishore Ravuri S. K., Kalsani Venkateshwarlu, Schmittel Michael, Armaroli Nicola *The Journal of Physical Chemistry A* **2007**, 111, 7707.
- (218) Xiao Zhiguang , B. J., Schimo Sonja , Ackland Susan M. , La Fontaine Sharon , Wedd Anthony G. *The Journal of Biological Chemistry* **2011**, 286, 11047.
- (219) Schmidt, R. *The Journal of Physical Chemistry A* **2006**, 110, 5990.
- (220) Ragone Fabricio , M. S. H. c. H., David Gara Pedro M. , Ruiz Gustavo T. , Wolcan Ezequiel *The Journal of Physical Chemistry A* **2013**, 117, 4428.
- (221) Rubin Battino, T. R. R., Toshihiro Tominaga *Journal of Physical and Chemical Reference Data* **1983**, 12, 163.
- (222) Martí Cristina, J. O., Cuenca Oriol, Casals Mercè, Nonell Santi *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **1996**, 97, 11.

- (223) Wilkinson Francis, B. J. G. *Journal of Physical and Chemical Reference Data* **1981**, *10*, 809.
- (224) Gijzeman O. L. J. , K. F., Porter G. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2: Molecular and Chemical Physics* **1973**, *69*, 708.
- (225) Wilkinson, F. *The Journal of Physical Chemistry A* **1999**, *103*, 5425.
- (226) García-Fresnadillo, D. G., Y.; Orellana, G.; Braun, A. M.; Oliveros, E. *Helvetica Chimica Acta* **1996**, *79*, 1222.
- (227) DeRosa Maria C , C. R. J. *Coordination Chemistry Reviews* **2002**, *233-234*, 351.
- (228) Wilkinson F. , M. D. J., Olea A. F. *Journal of the American Chemical Society* **1993**, *115*, 12144.
- (229) Olea A. F., W. F. *The Journal of Physical Chemistry* **1995**, *99*, 4518.
- (230) Abdel-Shafi Ayman A. , W. D. R., Wilkinson Francis *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **2001**, *142*, 133.
- (231) Brunschwig Bruce , S. N. *Journal of the American Chemical Society* **1978**, *100*, 7568.
- (232) Demas J. N. , D. D., Harris E. W. *Journal of the American Chemical Society* **1973**, *95*, 6864.
- (233) Demas J. N. , H. E. W., McBride R. P. *Journal of the American Chemical Society* **1977**, *99*, 3547.
- (234) Foxon S.P. , A. M. A. H., Walker M.G. , Meijer A.J.H.M. , Sazanovich I.V. , Weinstein J.A. , Thomas J.A. *The Journal of Physical Chemistry A* **2009**, *113*, 12754.
- (235) Lin Chin-Tung , S. N. *The Journal of Physical Chemistry* **1976**, *80*, 97.
- (236) Pfeil, A. *Journal of the American Chemical Society* **1971**, *93*, 5395.
- (237) Timpson Cliff J. , C. C. C., Olmsted III John *The Journal of Physical Chemistry* **1989**, *93*, 4116.
- (238) Ruiz Gustavo T. , J. M. P., Lezna Reynaldo O. , Wolcan Ezequiel , Feliz Mario R., Ferraudi Guillermo *Helvetica Chimica Acta* **2002**, *85*, 1261.
- (239) Mesaros Mariana , B. S. M., Ponce Maria A. , Erra-Balsells Rosa, Bilmes Gabriel M. *Photochemical & Photobiological Sciences* **2003**, *2*, 808.
- (240) Caspar Jonathan V., M. T. J. *The Journal of Physical Chemistry* **1983**, *87*, 952.
- (241) Wallace Lynne , R. D. P. *Inorganic Chemistry* **1993**, *32*, 3836.
- (242) Scaiano, J. C. *Handbook of Organic Photochemistry* Boca Ratón, FL, 1989; Vol. 1.

1. (243) Scaiano, J. C. *Handbook of Organic Photochemistry* Boca Ratón, FL, 1989; Vol. 1.
- (244) Toneatto Judith , A. G. A. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2011**, *105*, 645.
- (245) He Xiao Min , C. D. C. *Nature* **1992**, *358*, 209
- (246) Carter Daniel C. , C. B., Ho Joseph X. , Keeling Kim, Krishnasami Ziporah *European Journal of Biochemistry* **1994**, *226*, 1049.
- (247) Kragh-Hansen, U. *Pharmacological Reviews* **1981**, *33*, 17.
- (248) Olson Richard E. , C. D. D. *Annual Reports in Medicinal Chemistry* **1996**, *31*, 327.
- (249) Hu Yan-Jun , L. Y., Wang Jia-Bo , Xiao Xiao-He , Qu Song-Sheng *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2004**, *36*, 915.
- (250) Hu Yan-Jun , L. Y., Shen Xue-Song , Fang Xian-Yang , Qu Song-Sheng *Journal of Molecular Structure* **2005**, *738*, 143.
- (251) Guharay J. , S. B., Sengupta P.K. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **2001**, *43*, 75.
- (252) Carter Daniel C. , H. J. X. *Advances in Protein Chemistry* **1994**, *45*, 153.
- (253) Sugio S. , K. A., Mochizuki S. , Noda M., Kobayashi K. *protein engineering design and selection* **1999**, *12*, 439.
- (254) Lexa Katrina W. , D. E., Jacobson Matthew P. *PLOS ONE* **2014**, *9*, 1.
- (255) Peters Jr., T. *The Plasma Proteins*; 2 ed.; Academic Press, 1975; Vol. Volume I.
- (256) Painter Leoni, H. M. M., Beeby Philip J. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **1998**, 3041.
- (257) Henderson, G. *Journal of Chemical Education* **1977**, *54*, 57.
- (258) Bhattacharyya Jaya , B. M., Chakrabarty A.S. , Chaudhur U. , Poddar R.K. *Biochemical Pharmacology* **1994**, *47*, 2049.
- (259) Förster, T. *Discussions of the Faraday Society* **1959**, *27*, 7.
- (260) Timasheff, S. N. *Protides of the biological fluids*; PERGAMON PRESS: Brudge, 1975.
- (261) Ross Philip D. , S. S. *Biochemistry* **1981**, *20*, 3096.
- (262) Peters, T. *Advances in Protein Chemistry* **1985**, *37*, 161.
- (263) Förster T. , S. O. *Modern Quantum Chemistry*; Academic Press: New York, 1996; Vol. 3.
- (264) Suzukida Margaret , L. H. P., Shahid Fauzia , McPherson Robert A. , Birnbaum Edward R. , Darnall Dennis W. *Biochemistry* **1983**, *22*, 2415.

(265) Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*; 2^o ed ed. New York, 1999.