



Departament de Química Orgànica

Programa de doctorat: Química Orgànica

Bienni: 2002-2004

HOMOASOCIACIÓN DE PORFIRINAS SOLUBLES EN AGUA

Memoria que presenta Carlos Escudero Rodríguez para optar al título de Doctor en
Química

Revisada por:

Josep M^a Ribó i Trujillo (director de tesis)
Departament de Química Orgànica,
Universitat de Barcelona.

Carlos Escudero Rodríguez,
Departament de Química Orgànica,
Universitat de Barcelona.

Barcelona, octubre de 2007

Capítulo II

HOMOASOCIACIÓN DE PORFIRINAS SULFONADAS

II.1. INTRODUCCIÓN

El conocimiento y comprensión del comportamiento de agregación molecular de los componentes en un sistema complejo es un paso previo para interpretar el comportamiento físico, químico y biológico de dicho sistema. Entender la agregación permite evaluar su efecto en las propiedades de sistemas complejos y es fundamental para la búsqueda de aplicaciones. Por ejemplo el estudio del autoensamblaje de porfirinoides en la formación de los sistemas fotosintéticos naturales,^{71,72} el estudio de la agregación de fármacos, que resulta de suma importancia en cuanto a la eficiencia de los mismos,⁷³ y en el caso particular de las porfirinas, el diseño de cromóforos para la terapia fotodinámica.^{74,75}

Un progreso reciente es la consideración de los procesos de asociación y autoensamblaje como enfoque sintético para la preparación de sistemas complejos. En esta síntesis no-covalente, se pretende conseguir la precisión (en cuanto a la secuencia y estequiometría de los compuestos) y reproducibilidad de la síntesis covalente. Además la síntesis no-covalente constituye un enfoque mimético de la formación de sistemas biológicos y es de gran importancia para comprender las bases químicas de los mismos. Desde un punto de vista aplicado presenta múltiples beneficios, como por ejemplo:

- a) La integración de todo el material usado en el proceso en el producto final (rendimientos cercanos al 100%).
- b) No existe necesidad de un aporte externo de energía, ya que la energía química contenida en los reactivos es suficiente para completar el proceso.
- c) El agua, un solvente benigno y barato, es un excelente medio para estos procesos y es de fácil disponibilidad.

El fenómeno de homoasociación tiene lugar cuando las interacciones entre las moléculas de soluto llegan a ser energéticamente más favorables que las interacciones entre las moléculas de soluto y solvente. La formación de agregados puede ser reversible y el equilibrio depende de múltiples factores experimentales⁷⁶ como el disolvente, la concentración, el pH, la fuerza iónica y la temperatura. El aumento de la fuerza iónica es generalmente decisivo en la aparición de fenómenos de agregación.^{77,78} Un factor importante es la naturaleza del solvente. En el caso de la presencia de efectos hidrofóbicos, se conoce desde 1941 que la presencia de un disolvente diferente al agua (por ejemplo MeOH) evita la formación de agregados⁷⁹ y en el caso de las moléculas anfifílicas que generan agregados tipo cristal líquido liotrópico la agregación es tanto función de la estructura molecular como del solvente.

La agregación en el caso de las porfirinas es consecuencia directa del sistema planar π y de la presencia de los nitrógenos pirrolicos y pirrólicos (NH) del anillo. Las interacciones que generan un determinado estado de agregación de las porfirinas son las siguientes:^{80,81}

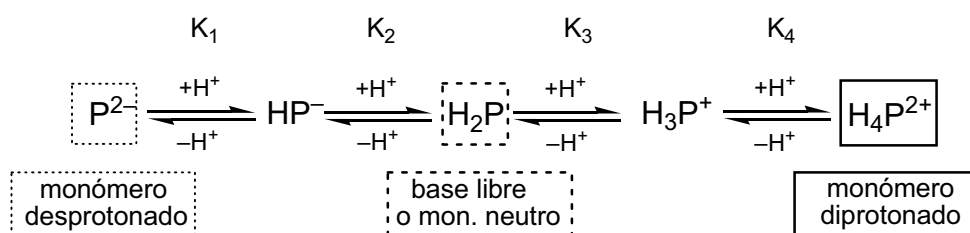
- a) Interacciones de van der Waals.
- b) Interacciones electrostáticas.
- c) Transferencia de carga.
- d) Desolvatación (interacciones hidrofóbicas).
- e) Interacciones por puentes de H.

La importancia relativa de estos efectos depende mucho del disolvente utilizado. En agua, por ejemplo, las interacciones hidrofóbicas (*efecto solvofóbico*) juegan un papel decisivo favoreciendo las interacciones π - π . En cambio en las porfirinas que presentan cargas puntuales en la periferia del macrociclo (por ej. grupos sulfonato, $-\text{SO}_3^-$) las interacciones electrostáticas son uno de los efectos más importantes que conducen a la agregación. Además también debemos destacar el efecto ejercido por los sustituyentes del anillo, por ejemplo las cadenas alquílicas largas o voluminosas provocan una disminución en la interacción entre anillos de porfirinas, favoreciendo la formación de sistemas discóticos. En cuanto a la dependencia con la temperatura, el aumento de ésta favorece el desplazamiento del equilibrio hacia el monómero excepto en el caso de sistemas homoasociados en donde las interacciones hidrofóbicas son las más importantes, puesto que en estos sistemas un aumento de la temperatura favorece la agregación.

II.1.1. Estructura de *meso*-arilporfirinas sulfonadas

Cuando estudiamos las porfirinas solubles en agua, uno de los aspectos más importantes es el pH del medio. Por ejemplo, las porfirinas que contengan grupos de ácido carboxílico o grupos fenóxido serán solubles en medios básicos, mientras que las que contengan grupos amino o piridilio lo serán en medios ácidos. Serán solubles a pH neutro las porfirinas que contengan grupos iónicos como la tetraquis(N-metil-4-piridil)porfirina (TMPyP) o bien las porfirinas sulfonadas (con un mínimo de dos grupos sulfonato).

La especie de porfirina predominante en disolución también depende del pH. En medio neutro predomina la base-libre o monómero neutro (H_2P). En un medio muy básico se pueden llegar a desprotonar los dos NH pirrólicos (pK_1 y pK_2) y en medio ácido se produce la protonación de los dos N de tipo pirrolénico (pK_3 y pK_4) formándose la especie monomérica ácida, un dicatión (H_4P^{2+}). En general, los valores de pK_3 y pK_4 se diferencian muy poco, por ejemplo en el caso de la Na_4TPPS_4 están entre 4,8-4,9.^{78,82-84}



A partir de datos de difracción de rayos X, Hamor y colaboradores⁸⁵ encontraron que el anillo de la TPP en la especie base-libre (H_2TPP) a temperatura ambiente es relativamente plano y fácilmente deformable. Stone y Fleischer,⁸⁶ a partir de nuevos datos de difracción de rayos X para la forma diprotonada ácida de la TPP (H_4TPP^{2+}), argumentaron que la deformación que sufre su anillo producida por la adición del primer protón H_3P^+ facilita la entrada del segundo, o sea que en general $K_3 \approx K_4$, y por ello H_2P y H_4P^{2+} son las especies mayoritarias en disolución tal como se ha observado en muchas porfirinas.⁸⁷

Las porfirinas obedecen la regla de Hückel al tener $4n+2$ ($n=4$) electrones π en un sistema conjugado plano y cíclico, el macrociclo de la porfirina está altamente conjugado, con $26 e^-$ en el sistema π .

En general los protones centrales de las porfirinas en su forma de base-libre sufren una rápida tautomerización a temperatura ambiente y se sabe que los tautómeros con hidrógenos internos adyacentes (tautómero *cis*) son menos estables que los tautómeros *trans* con los H-N opuestos, pero son intermedios en la transformación entre los tautómeros más estables (Fig. II-1).^{88,89}

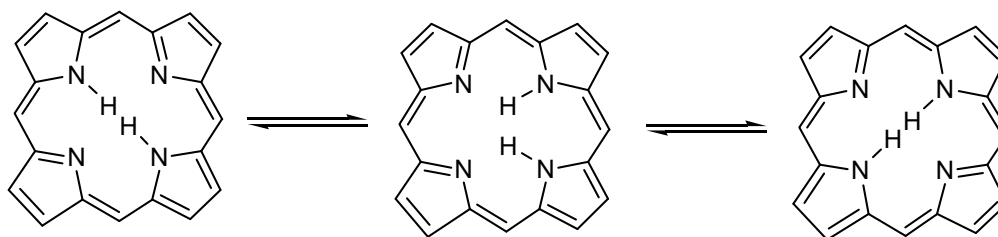


Fig. II-1 Mecanismo de transferencia intramolecular de protón NH en porfirinas.

Aunque se sabe que algunas moléculas adoptan diferentes conformaciones en solución y en estado cristalino, se ha mostrado que los datos de la conformación en estado sólido se pueden relacionar con las propiedades en solución.⁹⁰ Basándonos en estudios cristalográficos previos, en el caso de 5,15-diarilporfirinas y de 5,10,15,20-tetraarilporfirinas en su forma base-libre, el anillo central es prácticamente plano con un cierto grado de deformación.^{91,92} La presencia de los protones internos provoca diferencias en la geometría de los dos distintos tipos de anillos: los pirrólicos y los pirrolenínicos. Los dos anillos pirrolenínicos están en el plano medio de la porfirina, pero los dos anillos pirrólicos están ligeramente inclinados ($\sim 7^\circ$) hacia arriba y hacia abajo respecto del plano medio.⁹³ El ángulo $C_\alpha-N-C_\alpha$ (Fig. II-2) y la distancia entre los N de los anillos pirrólicos son mayores y minimizan los contactos no enlazantes entre los dos hidrógenos internos.⁹¹ Estas y otras diferencias entre los dos tipos de anillos han sido interpretadas en términos de dos formas de resonancia dominantes que conducen a la deslocalización electrónica en un anillo de 18 miembros como se ilustra en la Fig. II-2. No obstante, las diferencias entre las distancias de enlace en los anillos de porfirina son considerablemente más pequeñas que las que se originarían por las diferencias de órdenes de enlace calculados para las estructuras de la Fig. II-2.

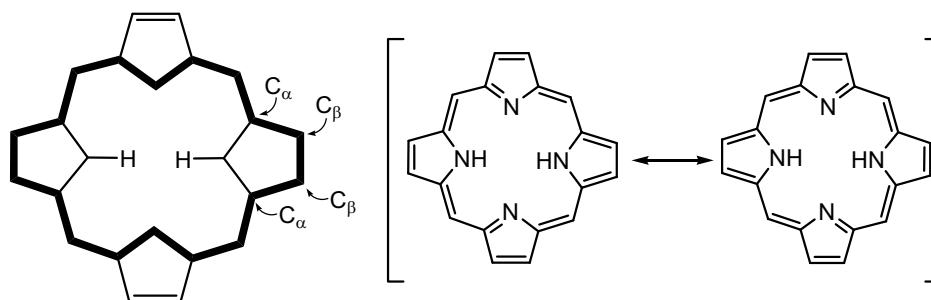


Fig. II-2 Ilustración de las estructuras resonantes dominantes de la porfirina en su forma base-libre que contribuyen al anillo de 18 miembros (línea de trazo más grueso).

En la forma base libre de la TPP, los grupos arilo se sitúan casi perpendiculares ($\sim 80^\circ$, desviados todos en el mismo sentido) respecto al plano medio que forma el anillo central porfirínico. Esto reduce el impedimento estérico entre los hidrógenos fenílicos y los hidrógenos de las posiciones β -pirrólicas vecinas.^{85,92} En este caso, o sea en medios neutros y a baja temperatura, la simetría del anillo central porfirínico es C_i (ligeramente deformada o *ruffled*) pero a temperatura ambiente se supera la barrera energética de la inversión de la configuración a través del plano principal del anillo y el resultado dinámico es una simetría D_{2h} del conjunto (Fig. II-3a). Las moléculas de porfirina son relativamente grandes y el empaquetamiento entre los grupos fenilo es difícil, por lo que en la red cristalina se crean numerosos canales y huecos que permiten la incorporación de moléculas de disolvente dando lugar a estructuras similares a clatratos (porfirinas esponja).^{94,95}

La desprotonación o metalación no modifican de manera significativa la estructura respecto a la de la forma base-libre, pero se ha comprobado que la protonación de las porfirinas sí induce cambios estructurales significativos. Cuando la porfirina se encuentra diprotonada (H_4P^{2+}), con los cuatro nitrógenos del anillo central protonados, el anillo central se deforma de manera que los anillos pirrólicos están inclinados alternativamente $\sim 33^\circ$ por encima y por debajo del plano medio del anillo de la porfirina adoptando la geometría de silla de montar

(conformación *saddled*).^{86,91} No obstante en el caso de la *meso*-tetrafenil-porfirina, por ejemplo, el conjunto formado por el macrociclo más sustituyentes adopta una disposición mucho más plana que en la estructura de porfirina base-libre, puesto que los grupos fenilo de la porfirina se colocan más horizontales con respecto al plano medio del anillo de porfirina. La simetría de la *meso*-tetrafenil-porfirina diprotonada es S_4 pero la simetría dinámica del conjunto (dos formas S_4) es D_{4h} y desde un punto de vista espectroscópico se acostumbra a aproximar la simetría del anillo a la D_{4h} (Fig. II-3b).

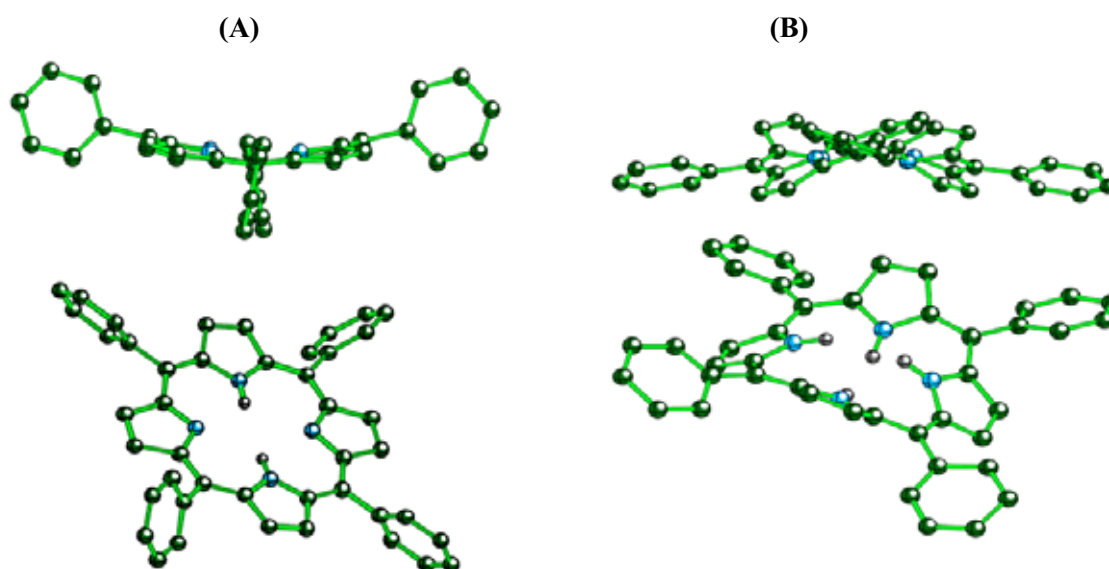


Fig. II-3 Vista en dos perspectivas de la estructura determinada por difracción de rayos X de (A) H_2TPP ,^{85,96} y (B) H_4TPP^{2+} .^{86,97}

En el caso de la TPP, el cambio conformacional o de geometría al pasar de la especie base libre (H_2TPP) a la especie ácida diprotonada (H_4TPP^{2+}) se traduce en modificaciones en los espectros UV-Vis, de tal manera que se produce un desplazamiento batocrómico de la banda de Soret (banda B, $S_0 \rightarrow S_2$) probablemente debido a la mayor planaridad del sistema protonado (H_4TPP^{2+}). Además el número de transiciones Q ($S_0 \rightarrow S_1$) pasa de 4 para la base-libre a 2 para la especie ácida diprotonada debido al incremento de la simetría del sistema (Fig. II-3).

II.1.2. Homoasociación de porfirinas

La homoasociación de porfirinas es estudiada desde hace décadas y puede ocurrir tanto en estado sólido como en solución.^{76,98} En disolución, la planaridad y el gran tamaño del área del macrociclo de la porfirina favorecen las interacciones de apilamiento para la formación de agregados.^{76,80,81} Cuando no hay efectos cooperativos, la geometría de estos agregados es poco definida. Los grupos iónicos tales como grupos sulfonato, carboxilato, iminio o amonio, hacen que la molécula de porfirina sea soluble en agua, como hemos explicado anteriormente, y se consiguen características muy interesantes de cara a la obtención por autoensamblaje de redes supramoleculares de porfirinas.

En 1937 Alexander⁹⁹ estudió capas monomoleculares de varias porfirinas sobre una superficie de agua (capa de Langmuir). A partir de estos estudios llegó a la conclusión de que las moléculas de protoporfirina IX están orientadas verticalmente y empaquetadas cara a cara. Bergeron¹⁰⁰ comprobó la validez de estos resultados y realizó un estudio sobre los cambios espectrales que acompañaban la agregación de porfirinas. El modelo de agregación cara a cara está aceptado en todos los estudios del fenómeno de homoasociación de porfirinas base-libre y metaloporfirinas,⁷⁶ pero es necesario un mayor conocimiento del proceso de agregación para la búsqueda de aplicaciones prácticas debido a que a veces un determinado estado de agregación confiere al sistema propiedades distintas de las del sistema “monomérico”.

El medio usualmente utilizado para la detección de agregados por homoasociación de porfirinas es la espectroscopia UV-Vis. Kasha y colaboradores¹⁰¹ desarrollaron el modelo simple de punto-dipolo para el acoplamiento excitónico (*exciton coupling*) entre las transiciones de cromóforos vecinos. Este modelo, que ha sido mejorado posteriormente,¹⁰² constituye por su sencillez una buena herramienta utilizada aún por muchos químicos orgánicos para obtener resultados cualitativos. Si la energía de la transición electrónica para el monómero se representa en la Fig. II-4A, la Fig. II-4B representa el resultado de la interacción lado a lado de los dipolos de transición del dímero. El acoplamiento

entre los dipolos resulta en dos niveles de energía y la transición al nivel más energético está prohibida por razones de simetría, por lo tanto la banda de absorción del dímero sufre un desplazamiento batocrómico respecto a la del monómero. En el caso de tener los dos dipolos de transición en paralelo como se muestra en la Fig. II-4C, de nuevo aparecen dos niveles de energía, pero en este caso la transición permitida es al nivel más energético y la banda de absorción del dímero muestra un desplazamiento hipsocrómico respecto la banda de absorción del monómero.

De los cambios observados con respecto a la especie no asociada los agregados se definen como H-agregados* (cara-a-cara, *face to face*) o J-agregados† (lado-a-lado, *edge-to-edge*) según se produzca respectivamente un desplazamiento hipsocrómico o batocrómico de la banda de absorción electrónica.¹⁰³⁻¹⁰⁶ Estos dos tipos de homoasociado presentan propiedades fotofísicas y electrónicas claramente distintas.^{107,108} Hunter y Sanders⁸⁰ propusieron que las repulsiones π - π son las interacciones dominantes en la geometría cara-a-cara mientras que las atracciones π - σ dominan en las geometrías lado-a-lado.

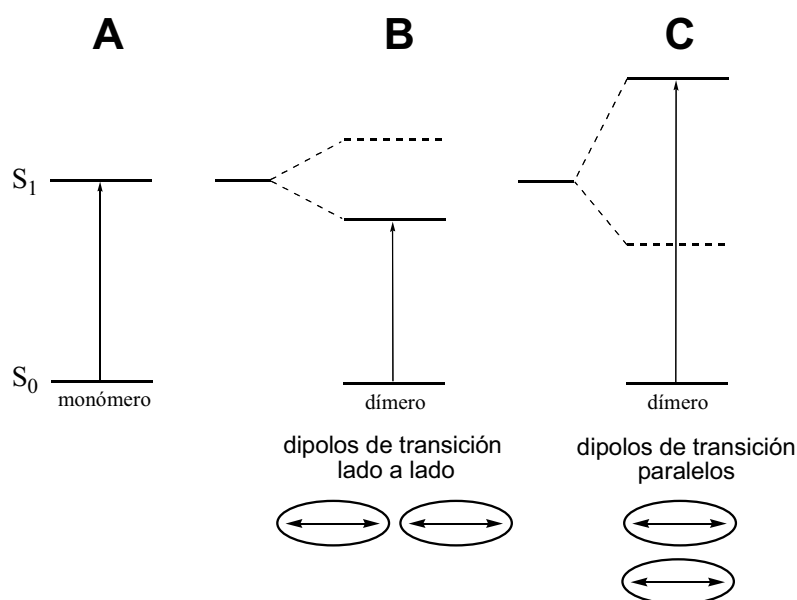


Fig. II-4 Representación esquemática del acoplamiento excitónico para dímeros de porfirina según ref. 101.

* La designación H proviene del desplazamiento **H**ipsocrómico que experimentan los agregados H.

† La designación J proviene de **J**elley, quien junto con Scheibe fue el primero en describir estos fenómenos de agregación para los colorantes tipo cianina (1930).

La formación de apilamientos de porfirinas con geometría poco definida se manifiesta en desviaciones de la ley de Lambert-Beer e incrementos en la amplitud de las bandas de absorción.^{72,76} Cuando se da este tipo de agregación de geometría no definida se produce un ensanchamiento de la banda Soret (banda B, $S_0 \rightarrow S_2$) y una disminución del valor de ϵ a la longitud de onda de máxima absorción del pico.

Se han propuesto diversos modelos que relacionan los espectros de UV-Vis con la estructura de los agregados de porfirinas.^{80,104,109,110} Como se observa en la Fig. II-5, para el caso de las *meso*-tetrasulfonatofenilporfirinas se ha propuesto una diferenciación entre este tipo de agregados dependiendo del ángulo θ de aproximación entre las porfirinas.

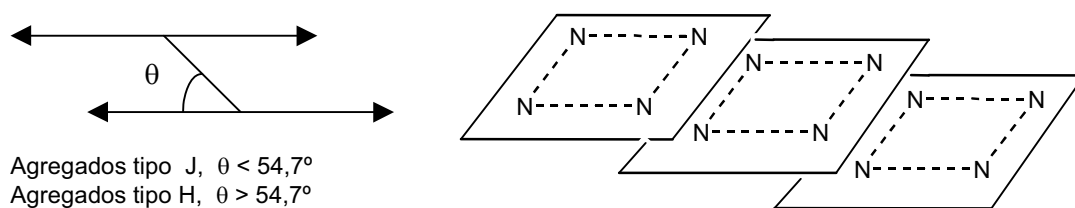


Fig. II-5 Representación esquemática del modelo de interacción en los homoasociados de tetrafenilporfirinas sulfonadas.¹⁰⁹

Comparando la agregación en disolventes orgánicos y en agua, observamos que en medios acuosos el efecto hidrofóbico o de desolvatación adquiere una mayor importancia favoreciendo las interacciones π - π . Por otra parte, en el caso de porfirinas con cargas puntuales en la periferia del macrociclo, adquieren una mayor importancia las interacciones electrostáticas y de puentes de hidrógeno. Además en este último caso se pueden presentar interacciones intermoleculares fuertes con el centro de otras moléculas de porfirina, por ejemplo, actuando como un ligando axial de una metaloporfirina o neutralizando una carga positiva (catión metálico o nitrógenos protonados en medios ácidos) o una carga negativa (nitrógenos desprotonados en medios básicos).¹¹¹⁻¹¹⁴

II.1.2.1. Homoasociación en medio neutro

Los primeros trabajos sobre la agregación de *meso*-tetraarilporfirinas se iniciaron hace 36 años.^{77,78} Pasternack y colaboradores⁷⁷ observaron cómo los métodos ópticos y cinéticos pueden ser utilizados en la determinación de las interacciones monómero-dímero de porfirinas solubles en agua. Llegaron a la conclusión de que a pH= 7,5 sobre un amplio rango de concentraciones (de 1×10^{-7} a 4×10^{-5} M) y en presencia de 0,01 M de KNO_3 ; las especies base libre de la 5,10,15,20-tetraquis(4-carboxifenil)porfirina ($\text{H}_2\text{TPPC}_4^{4-}$), 5,10,15,20-tetraquis-(N-metil-4-piridil)porfirina ($\text{H}_2\text{TMPyP}^{4+}$) y 5-fenil-10,15,20-tris(4-sulfonatofenil)-porfirina ($\text{H}_2\text{TPPS}_3^{3-}$), obedecen la ley de Lambert-Beer lo cual indica que se encuentran en forma monomérica. Pero al aumentar la presencia de electrolito hasta 0,1 M de KNO_3 y al mismo pH, $\text{H}_2\text{TPPC}_4^{4-}$ y $\text{H}_2\text{TPPS}_3^{3-}$ muestran variaciones en las posiciones de absorbancia con respecto a la concentración, lo cual se atribuyó al equilibrio monómero-dímero de estas porfirinas. En este sentido debe tenerse en cuenta que casi todos los trabajos anteriores a 1993 que consideraban la formación de dímeros, deben interpretarse asumiendo que se trata de especies poliméricas.

Los agregados de porfirinas generados en medio neutro son generalmente de geometría poco definida. Hunter y Sanders⁸⁰ estudiaron teóricamente la naturaleza de las interacciones π - π entre porfirinas en estado sólido y soluciones no acuosas. Según su modelo los sistemas con dos porfirinas vecinas interactuando cara-a-cara son paralelos y separados por 3,4-3,6 Å, con los ejes N-N opuestos de cada porfirina también paralelos entre sí y una porfirina desplazada 3-4 Å respecto a la vecina a través del eje N-N (Fig. II-6):

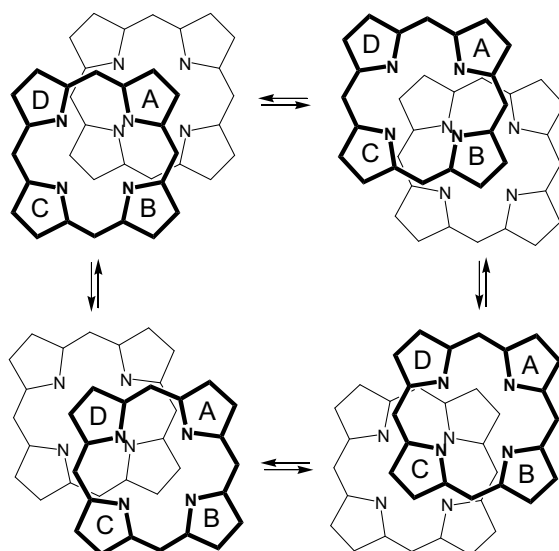


Fig. II-6 Modelo de agregación de porfirinas por medio de interacciones π - π propuesto por Hunter y Sanders.⁸⁰

Bruice¹¹⁵ describió la tendencia relativa a la agregación en agua de porfirinas anfifílicas en el orden siguiente: 5,10,15,20-tetraquis(4-carboxifenil)porfirina ($\text{H}_2\text{TPPC}_4^{4-}$) > 5,10,15,20-tetraquis-(4-sulfonatofenil)porfirina ($\text{H}_2\text{TPPS}_4^{4-}$) > 5,10,15,20-tetraquis(4-N,N,N-trimetilaminofenil)porfirina ($\text{H}_2\text{TAPP}^{4+}$) > 5,10,15,20-tetraquis(N-metil-4-piridil)porfirina ($\text{H}_2\text{TMPyP}^{4+}$), para estas porfirinas. $\text{H}_2\text{TPPS}_4^{4-}$ y $\text{H}_2\text{TPPC}_4^{4-}$ son porfirinas que poseen sustituyentes cargados negativamente. Se ha propuesto que la presencia de cargas positivas en la periferia podría provocar una mayor deslocalización de la nube π -electrónica mientras que la presencia de cargas negativas conduciría a una localización parcial de la densidad electrónica en las proximidades del centro del macrociclo.⁷⁷ Esta mayor localización de la densidad electrónica convertiría el centro del anillo porfirínico en un sitio de protonación más adecuado aumentando la basicidad y disminuyendo la acidez de las especies y produciría fuertes interacciones de van der Waals facilitando la formación de dímeros o agregados a través de interacciones entre sistemas π . Las porfirinas anfifílicas catiónicas presentan una tendencia a la agregación menor que las aniónicas y esta tendencia es menor cuanto más cerca del anillo se encuentra la carga positiva, o sea $\text{H}_2\text{TMPyP}^{4+} < \text{H}_2\text{TAPP}^{4+}$.¹¹⁶

La $H_2TPPS_4^{4-}$ (con los grupos sulfonato en las posiciones *para*-fenílicas) y algunos de sus complejos metálicos agregan en determinadas condiciones mientras sus derivados con sustituyentes en las posiciones *orto*-fenílicas (por ej. $-Cl$, $-F$, $-CH_3$, $-OCH_3$) no, lo cual indica la importancia del impedimento estérico en los procesos de homoasociación.¹¹⁷

II.1.2.2. Homoasociación en medio ácido

La homoasociación de las *meso*-sulfonatofenilporfirinas en medio ácido había sido detectada hace tiempo, pero hasta mediados de la década de los noventa no se han publicado resultados fiables. En el año 1971, Fleischer⁷⁸ observó que la 5,10,15,20-tetraquis(4-sulfonatofenil)porfirina (Na_4TPPS_4) por debajo de $pH=2$, además del ácido conjugado de la porfirina ($H_4TPPS_4^{2-}$), daba lugar a una nueva especie, que presentaba en el espectro de absorción UV-Vis dos bandas intensas a 489 nm y 708 nm. A pesar de estos resultados, Fleischer no llegó a interpretarlos alegando que el comportamiento era muy complejo. El año siguiente, Pasternack⁷⁷ describió un comportamiento similar para la 5-fenil-10,15,20-tris(4-sulfonatofenil)porfirina (Na_3TPPS_3), señalando que en disolución a $pH=2,8$ y a concentraciones de 2×10^{-5} M, en los espectros de UV-Vis aparecían unas bandas a 489 y a 710 nm. La intensidad relativa de estas bandas con respecto a las del monómero, dependía de la fuerza iónica y de los electrolitos presentes en la disolución. Hambright⁸² estudió la homoasociación de la forma ácida diprotonada $H_4TPPS_4^{2-}$, y describió que los homoasociados no pasan por membranas de poros de $0,45 \mu m$, que los grupos sulfonato estaban parcialmente en forma de $-SO_3H$ (interpretación no aceptada posteriormente) y demostró que las correspondientes porfirinas *orto*-sustituidas no forman homoasociados. Pasternack y colaboradores¹¹⁸ 22 años después de haber observado por primera vez la banda a 490 nm detectaron un efecto de *scattering* (*RLS: Resonance Light Scattering*) a la longitud de onda de esta banda de absorción, el cual permite detectar la presencia de homoasociados en soluciones muy diluidas siendo de gran ayuda en la detección de estos agregados¹¹⁹.

A finales del año 1993, comenzaron a aparecer trabajos^{82,109,118,120,121} que estudiaban, utilizando diversas técnicas (UV-Vis, DC, Raman, RMN-¹H, etc), diferentes aspectos del comportamiento de soluciones ácidas de Na₄TPPS₄ (H₄TPPS₄²⁻) y que relacionaban los espectros de absorción con la estructura molecular del homoasociado (J-agregado).

Kaizu y colaboradores¹²⁰ identificaron la señal a 491 nm, observada en disoluciones de H₄TPPS₄²⁻ como correspondiente a un homoasociado tipo J resultado de la formación del par iónico entre el centro catiónico de una porfirina y uno de los grupos aniónicos periféricos de otra porfirina vecina. Esta interacción entre porfirinas aunque es semejante a la establecida por nuestro grupo de investigación, atribuye una posición relativa de los sustituyentes fenílicos distinta (Fig. II-7).

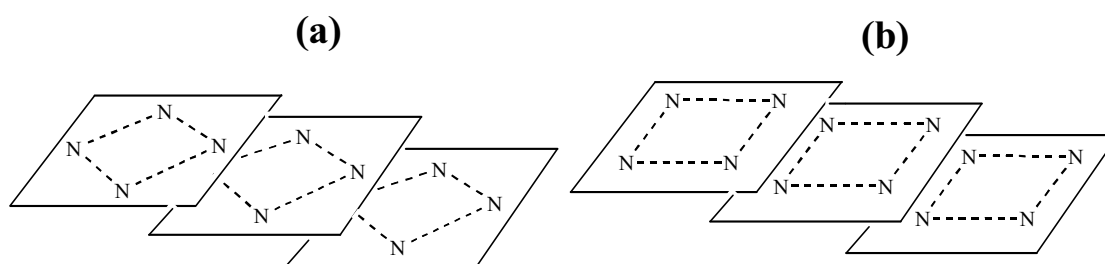


Fig. II-7 Representación esquemática del modelo de interacción en el homoasociado J de H₄TPPS₄²⁻, (a) propuesto por Kaizu y colaboradores;¹²⁰ y (b) establecido por Ribó y colaboradores.¹⁰⁹

Aunque Kaizu y colaboradores¹²⁰ no pudieron distinguir experimentalmente entre una estructura tipo (a) o (b) (Fig. II-7), argumentaron que la estructura (b) no es posible debido al impedimento estérico entre los grupos *meso*-fenílicos que adoptan una posición perpendicular al plano del macrociclo. Según Ribó y colaboradores¹⁰⁹ al ser estos grupos casi coplanares con el plano de la porfirina, la estructura (b) favorece las interacciones solvofóbicas. Además detectaron¹⁰⁹ que a partir de concentraciones de 1×10^{-4} M aparece una nueva banda a 422 nm, la cual se consideró que era consecuencia de la formación de agregados tipo H, a partir de asociaciones “cara a cara” de cadenas de J-agregados.

En resumen, el modelo establecido para la homoasociación de la Na_4TPPS_4 en medio ácido acuoso ($\text{H}_4\text{TPPS}_4^{2-}$) es el de una estructura zwitteriónica estabilizada por interacciones electrostáticas entre el centro catiónico de la porfirina y los grupos aniónicos de la periferia de la porfirina (Fig. II-8). Este modelo fue propuesto por primera vez por nuestro grupo¹⁰⁹ como el correspondiente a una agregación lateral entre los anillos de porfirina, de tipo J. Un aspecto interesante de este tipo de homoasociados de porfirina es que el carácter isotrópico de las interacciones electrostáticas se transforma en una ordenación anisotrópica debido a las interacciones hidrofóbicas, que conducen a homoasociados de geometría definida.

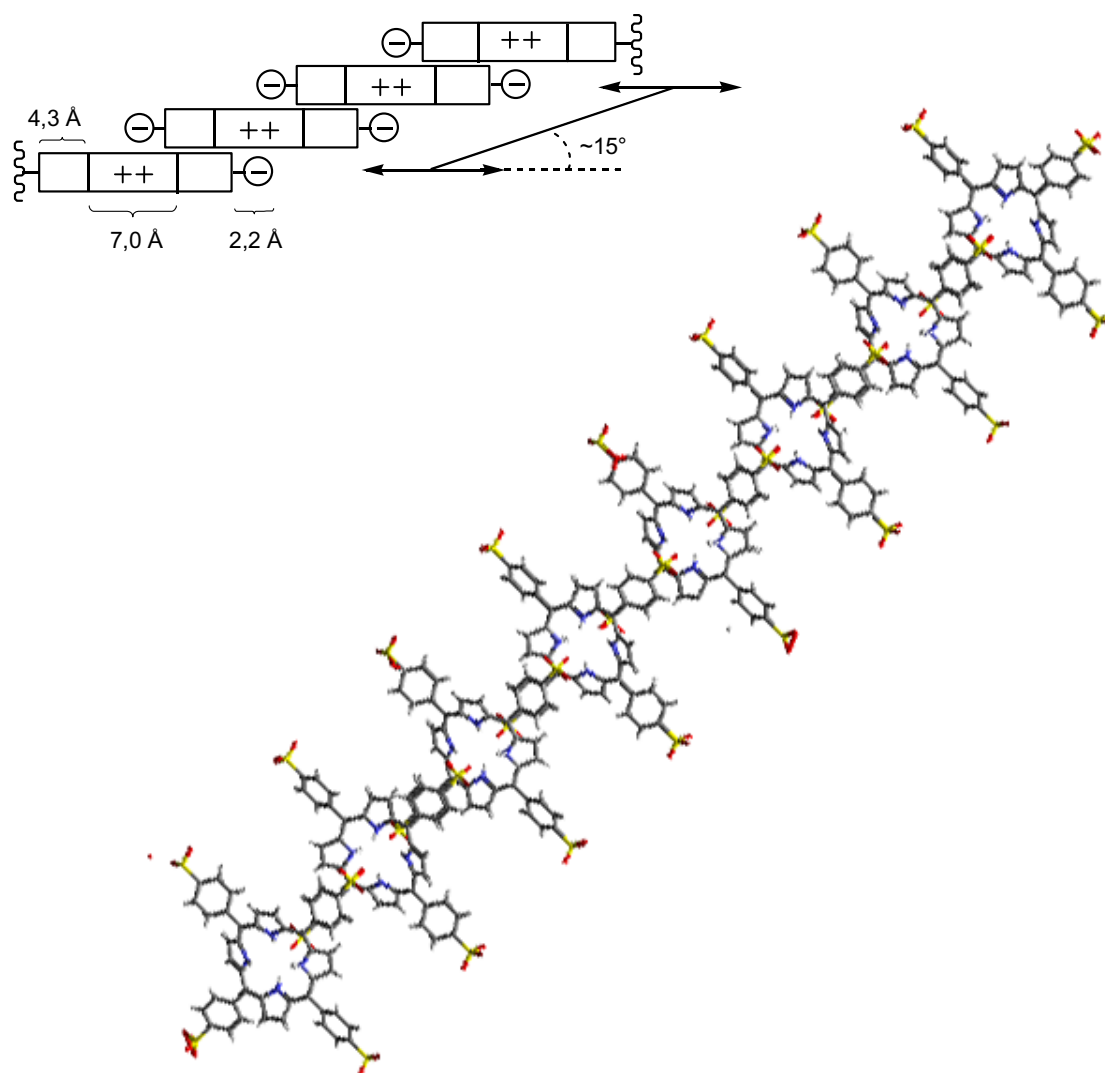


Fig. II-8 Modelo del homoasociado tipo J.¹⁰⁹

II.1.3. Objetivos

En nuestro grupo^{47,122} se han estudiado previamente las porfirinas anfifílicas (Fig. II-9) obtenidas por reacción de H₂SO₄ conc. con la 5,10,15,20-tetrafenilporfirina (TPP).

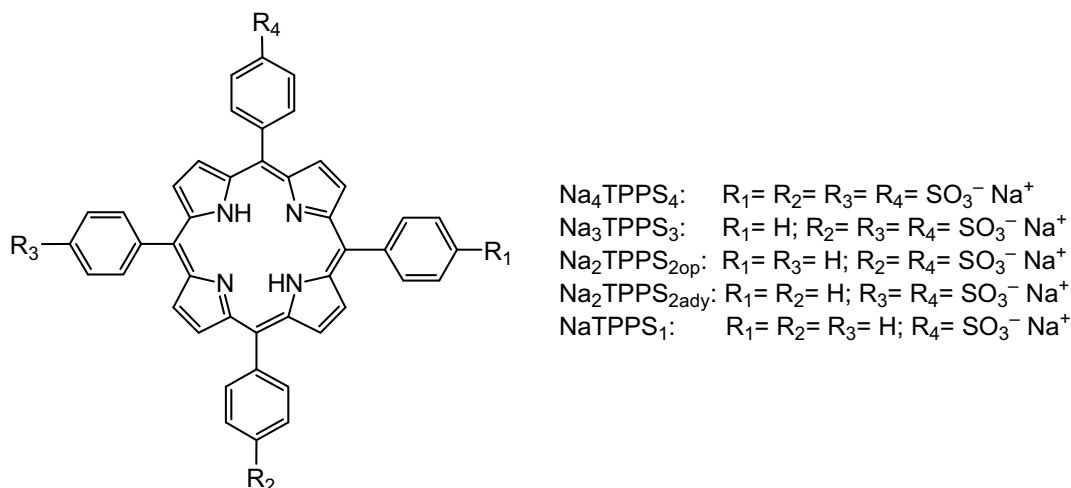
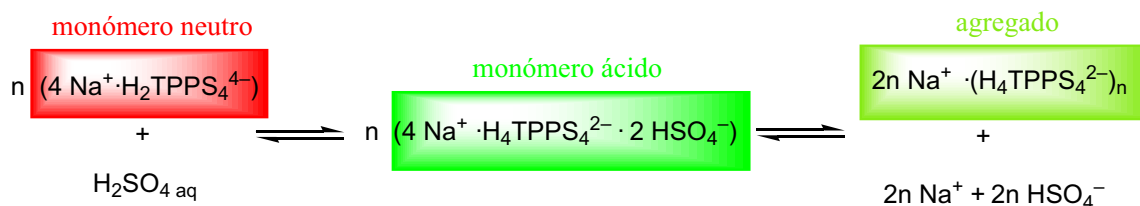


Fig.II-9 Serie de meso-sulfonatofenilporfirinas obtenidas por sulfonación de TPP.

Todas estas porfirinas obtenidas son solubles en agua, excepto la NaTPPS₁, debido a que el anillo porfirínico y la presencia de tres grupos fenilo sin sulfonar le confieren un fuerte carácter hidrofóbico. La homoasociación en agua y medio neutro de este grupo particular de porfirinas conduce a agregados de geometría poco definida pero en medio ácido estas porfirinas se autoensamblan en diferentes tipos de agregados coloidales de geometrías definidas.¹²³ Las estructuras supramoleculares obtenidas por homoasociación en el caso de las porfirinas sulfonadas de la serie Na_xTPPS_x muestran geometrías más definidas en comparación con las de la serie Na_xDPPS_x. Las interacciones hidrofóbicas entre fenilos por tanto son un factor clave y actúan fijando la geometría en el caso de la serie de meso-tetrafenilporfirinas sulfonadas.¹²⁴

La homoasociación de estas porfirinas en medio ácido implica un proceso de segregación de los contraiones Na^+ de dos grupos sulfonato y los contraaniones del ácido añadido para diprotonar el anillo de porfirina al seno de la solución, formándose un zwitterión doble. Por ejemplo en el caso de acidificar con H_2SO_4 la Na_4TPPS_4 se forma primero la especie monomérica ácida por protonación de los dos N pirrolenínicos y esta especie se puede homoasociar con la consecuente segregación de aniones HSO_3^- y cationes Na^+ . Es de esperar que los contraiones sean liberados de las constricciones impuestas por la interacción con las cargas iónicas de la porfirina agregada, de gran tamaño relativo, por tanto la cinética y extensión del proceso de autoensamblaje dependería de la naturaleza de los contraiones.



La mayoría de los trabajos previos sobre la agregación de porfirinas 4-sulfonatofenil-sustituidas corresponde, cuando se especifica, a sus respectivas sales sulfonato sódicas o amónicas, dos tipos de iones que conducen a ligeras diferencias cuantitativas. Obviamente se deberían observar fácilmente diferencias cualitativas en el caso de contraiones de naturaleza muy diferente, por ejemplo hemos observado previamente en nuestro grupo que las sales de tetrabutilamonio de las sulfonatofenilporfirinas además de su esperada mayor solubilidad en solventes orgánicos, no agregan en medios ácidos.

Uno de los objetivos es la obtención de los ácidos sulfónicos de estas porfirinas (Fig. II-10) para estudiar su homoasociación en agua en ausencia de otros iones que no sean los de la propia autoionización del agua, el comportamiento ácido/base (pK_a) y su caracterización como fases sólidas. Esto

permitiría conocer el efecto de la naturaleza de los contraiones en la homoasociación en agua de estas porfirinas y además se obtendrían agregados sólidos sin contaminación de sales inorgánicas debido a la ausencia de otros contraiones aparte de H_3O^+ y OH^- . También se estudiará el pK_a de la Na_4DPPS_4 para observar el efecto de la presencia de un grupo sulfonato unido directamente en la posición *meso*.

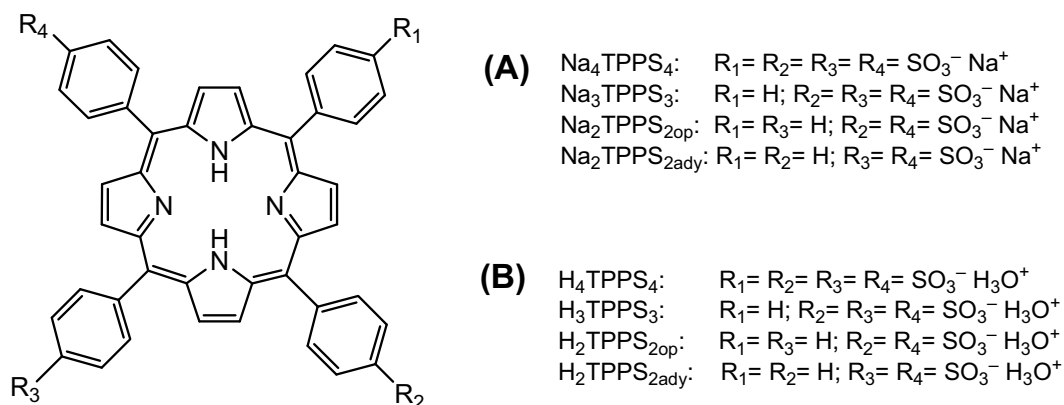


Fig. II-10 (A) Porfirinas sulfonadas en su forma base-libre como sales sódicas; y (B) sus respectivos ácidos sulfónicos en su forma base-libre.

Otro de los objetivos es estudiar el proceso de autoensamblaje de Na_4TPPS_4 en unas condiciones experimentales determinadas para poder establecer algún método de control de este proceso de homoasociación tan complejo, con tantas variables.

II.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Nomenclatura utilizada

En los resultados que presentamos a continuación, de cara a evitar posibles confusiones, para la designación de las especies tetra- y trisulfonadas en solución nos basaremos en las abreviaturas indicadas en el Esquema II-1 (apartado II.2.1) y en la Tabla II-1.

Tabla II-1 Abreviaturas utilizadas para designar las porfirinas y sus distintas especies.

<i>Porfirinas</i>		<i>Especies en solución</i>	
		<i>Base-libre</i>	<i>Monómero diprotonado*</i>
<i>sales sódicas</i>	Na ₄ TPPS ₄	Na ₄ H ₂ TPPS ₄	Na ₄ H ₄ TPPS ₄
	Na ₃ TPPS ₃	Na ₃ H ₂ TPPS ₃	Na ₃ H ₄ TPPS ₃
<i>ácidos sulfónicos</i>	H ₄ TPPS ₄	H ₂ TPPS ₄	zwH ₄ TPPS ₄
	H ₃ TPPS ₃	H ₂ TPPS ₃	zwH ₄ TPPS ₃

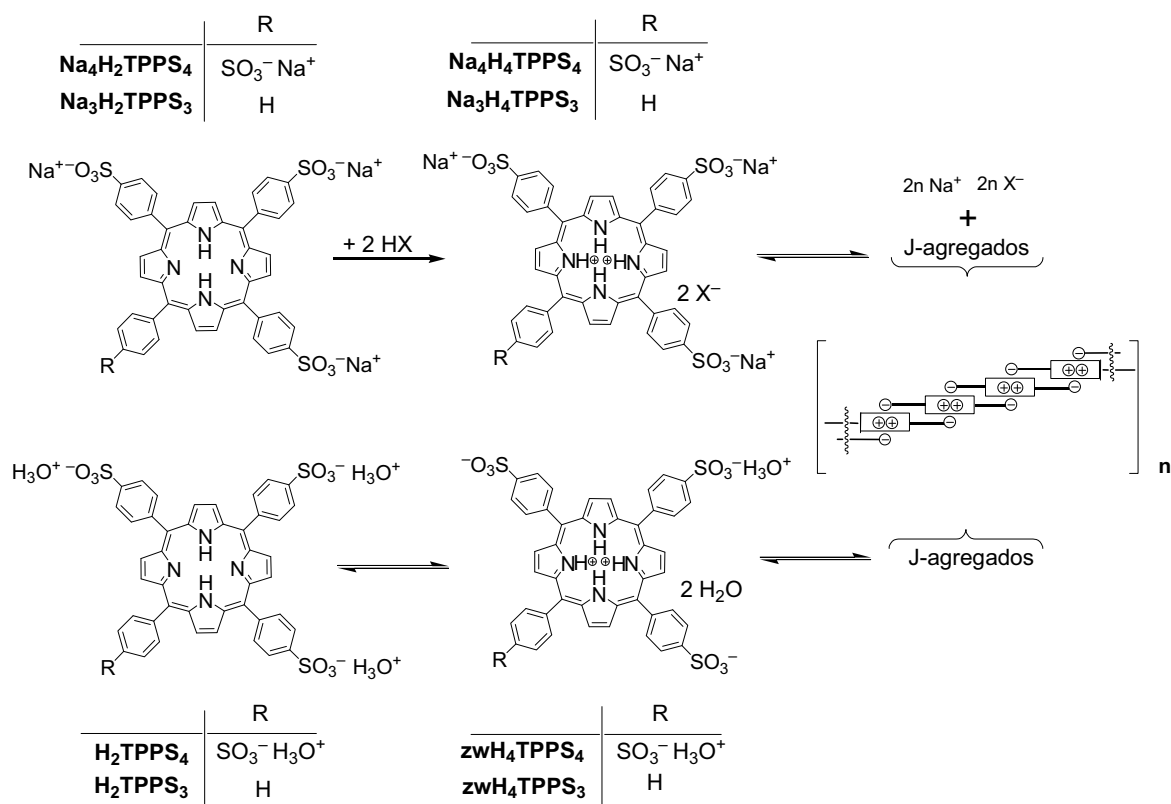
* En el caso de las sales sódicas obtenidos por la adición de ácidos y en el caso de los ácidos sulfónicos por autoprotónación.

En algunos casos al describir las especies en solución también hemos utilizado para hacer referencia a la base-libre: H₂TPPS₄⁴⁻ o H₂TPPS₃³⁻ y para la forma monomérica diprotonada ácida: H₄TPPS₄²⁻, H₄TPPS₃⁻, sin distinguir si su procedencia es de las sales sódicas o de los ácidos sulfónicos.

II.2.1. Preparación de los ácidos sulfónicos de porfirinas *meso*-sustituidas

Se columnaron las porfirinas Na₄TPPS₄, Na₃TPPS₃ y la sal disódica de la 5,10-difenil-15,20-bis(4-sulfonatofenil)porfirina (Na₂TPPS_{2ady}) a través de una columna de intercambio catiónico. Se siguió el mismo procedimiento para las tres porfirinas: se disolvieron aproximadamente 10 mg de porfirina no impurificada con sales inorgánicas en 3 mL de H₂O ultrapura y se columnaron usando también H₂O ultrapura como eluyente a través de una columna de intercambio iónico (forma ácida, 11 mL, ver parte experimental).

Para las tres porfirinas observamos que al cargar la columna con la respectiva solución neutra, ésta se acidifica al entrar en contacto con la fase estacionaria, virando del color pardo-violeta característico de las especies neutras al verde de las respectivas formas ácidas.



Esquema II-1 Esquema comparativo de los equilibrios ácido-base y de las especies en solución de las sales sódicas y ácidos sulfónicos de las 4-sulfonatofenilporfirinas tetra- y trisulfonadas.

La elución de H_4TPPS_4 y de H_3TPPS_3 ($H_nTPPS_n = H_2TPPS_n$ y zwH_4TPPS_n ; $n = 3, 4$; Esquema II-1) requiere respectivamente unos 5 y 20 mL de H_2O . Estas soluciones pueden ser usadas directamente para estudios en solución o bien pueden ser liofilizadas o rotaevaporadas a muestras sólidas. La H_2TPPS_{2ady} en cambio se queda fuertemente anclada en la fase estacionaria de la columna de intercambio catiónico. Esto es consecuencia de la fuerte interacción entre los grupos fenilo de la H_2TPPS_{2ady} y las cadenas de poliestireno de la fase estacionaria.

II.2.2. Estructura en solución acuosa de los ácidos sulfónicos de porfirinas *meso*-sustituidas H_4TPPS_4 y H_3TPPS_3

II.2.2.1. Estudio por Espectroscopia UV-Vis

II.2.2.1.1. H_4TPPS_4

Las soluciones de H_4TPPS_4 pueden mostrar en solución la presencia de tres especies (Fig. II-11): la base-libre monomérica (H_2TPPS_4) con una banda B o de Soret a 414 nm, el zwitterión monomérico diprotonado (zwH_4TPPS_4) que presenta la banda B a 434 nm y el zwitterión polimérico formado por la agregación tipo J de la especie ácida diprotonada, que muestra una banda de Soret a 490-492 nm. Los espectros de absorción de estas especies no son distinguibles de los obtenidos con la Na_4TPPS_4 .

<i>Especie</i>	<i>Banda B ($\lambda_{m\acute{a}x.}$, nm)</i>	<i>Bandas Q ($\lambda_{m\acute{a}x.}$, nm)</i>
H_2TPPS_4	414	516, 552, 583, 637
zwH_4TPPS_4	434	595, 645
J-agregado	490-492	635, 707

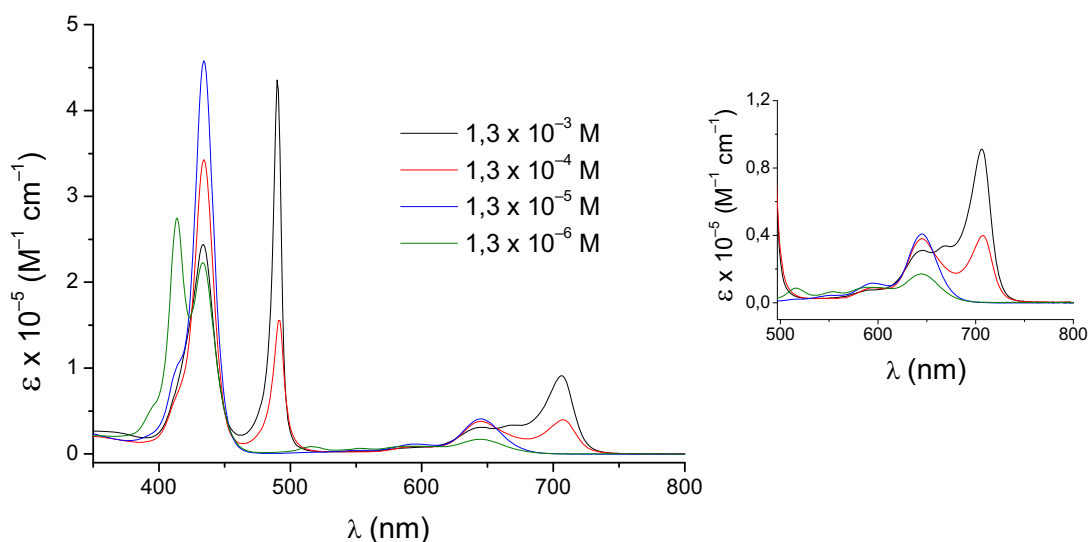


Fig. II-11 Espectros UV-Vis de soluciones acuosas de H_4TPPS_4 : (—) $1,3 \times 10^{-3}$ M; (—) $1,3 \times 10^{-4}$ M; (—) $1,3 \times 10^{-5}$ M; (—) $1,3 \times 10^{-6}$ M. Se utilizaron cubetas de 0,001 cm; 0,01 cm; 0,1 cm; y 1 cm de camino óptico respectivamente (las cubetas de 0,01 cm y 0,001 cm utilizadas son sin entrada y salida).

Las fracciones molares de cada una de estas especies depende de la concentración total de porfirina, ya que una variación de esta concentración desplaza tanto el equilibrio ácido-base como el de agregación debido al cambio concomitante del valor de pH. En el caso de soluciones muy concentradas el empaquetamiento de las cadenas de J-agregado zwitteriónico lineales comporta la aparición de una nueva banda a 420 nm debido a la asociación tipo H de las cadenas de J-agregado. Las soluciones más concentradas de H_4TPPS_4 que se pudieron estudiar por espectroscopia UV-Vis muestran un hombro en la zona más energética de la banda B de la especie monomérica ácida que corresponde a esta agregación tipo H.

La geometría del conjunto del macrociclo y los grupos fenilo sulfonados es más plana en el caso de la forma monomérica ácida zwitteriónica (zWH_4TPPS_4) respecto a su forma base-libre (H_2TPPS_4) lo cual facilita la formación del empaquetamiento en el agregado permitiendo una mayor aproximación e interacción entre las diferentes regiones de porfirina anfifílica. El modelo propuesto implica la estabilización de los zwitteriones mediante interacciones electrostáticas y puentes de hidrógeno¹²⁵ entre el macrociclo de una unidad de porfirina y dos grupos sulfonato de dos porfirinas vecinas. Esta ordenación es la que genera una nueva banda de Soret (B_J) a 490-492 nm y el apilamiento de este agregado monodimensional resulta en la aparición de una banda de Soret a 420 nm (B_H) característica de los agregados tipo H. Tal como era de esperar el comportamiento observado por espectroscopia UV-Vis de esta especie (H_4TPPS_4) no es diferente al de su respectiva porfirina en forma de sal sódica.

La presencia de agregados se observó sólo para valores de concentración de porfirina por encima de 0,1 mM lo que debe ser atribuido, como en el caso de la Na_4TPPS_4 , a la existencia de una cierta concentración micelar crítica. No obstante, si comparamos el valor de concentración micelar crítica para la H_4TPPS_4 con el reportado para su respectiva sal sódica (0,005 mM; a pH= 1; $[HCl]= 0,1 M$)⁹⁷ observamos que para el ácido sulfónico este valor es más alto, lo cual se podría

atribuir a la menor fuerza iónica de la solución. En cualquier caso los resultados indican una sorprendente estabilidad de la especie monomérica ácida a pesar de su gran tamaño y su carácter de doble zwitterión.

Además hay que destacar también que en las soluciones en las cuales hay agregación, la fracción de J-agregado aumenta con el tiempo y el estado estable final no parece que se hubiera alcanzado ni después de varias semanas (Fig. II-12). Esta observación está de acuerdo con estudios previos sobre la presencia de diferentes etapas de agregación jerárquica por encima del nivel nanomolecular. Los últimos estadios de agregación mostrarían una evolución más lenta en contraposición al rápido equilibrio reversible ácido/base inicial ($H_2TPPS_4 \rightleftharpoons zwH_4TPPS_4$) y a las primeras etapas de la agregación. En todo caso esta lenta evolución no se observa en el caso de la agregación de las sales sódicas, en donde se llega muy rápidamente a los últimos estadios de la agregación.

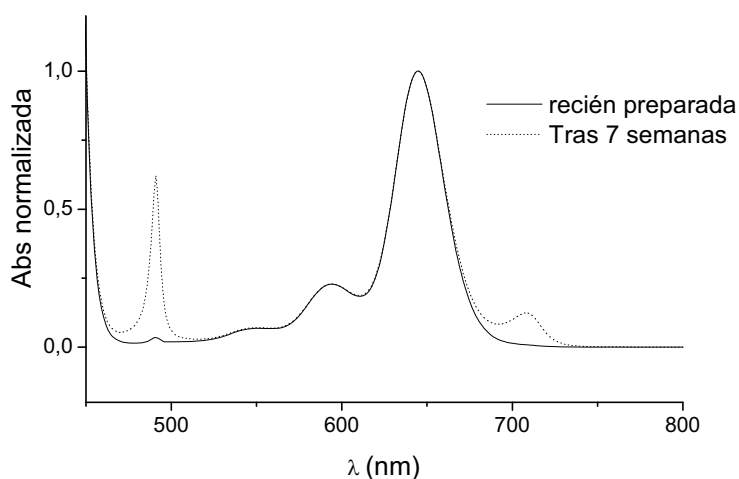


Fig. II-12 Espectros UV-Vis ($l = 0,1$ cm) de una misma solución $5,8 \times 10^{-4}$ M de H_4TPPS_4 (—) recién preparada y (····) tras 7 semanas. Valores de absorbancia normalizados a la absorbancia máxima de la banda a 645 nm.

Estos efectos también pueden ser observados en el comportamiento de agregación/desagregación de los J-agregados, por ejemplo los agregados de más de 10 días desagregaron más lentamente que los recién obtenidos.

Para el estudio de las soluciones más concentradas se utilizaron dos modelos de cubetas de $l= 0,001$ cm y 0,01 cm que se diferencian en que uno presenta unos túbulos para su llenado (A) y el otro no (B).



En los espectros de soluciones con J-agregados utilizando las cubetas tipo B (cubetas sin entrada y salida) de $l= 0,001$ y 0,01 cm se observa siempre aumento en la proporción de J-agregado respecto al monómero diprotonado al disminuir el espesor de la cubeta. En un principio pensamos que la explicación podría ser un proceso de selección de tamaño de partículas por capilaridad, al llenar estas cubetas por desplazamiento “en húmedo” de las dos superficies de la cubeta tras depositar una gota sobre una de ellas. Pero a pesar de las evidencias de esta selección nuevos estudios, actualmente en proceso, indican que el efecto se debe a la interacción entre la capa eléctrica de la superficie de cuarzo y la de la solución, que favorecería la floculación de agregados cerca de la superficie.

Al comparar el espectro de soluciones de concentración $\geq 1 \times 10^{-3}$ M en cubeta de 0,001 cm con el de una solución obtenida por dilución directa de esta misma solución ($1/10, \geq 1 \times 10^{-4}$ M) en la cubeta de 0,01 cm (ambos espectros con cubetas sin entrada y salida), además de la disminución de la proporción de J-agregado se observa un desplazamiento batocrómico de 1 nm de la banda B o banda de Soret correspondiente al J-agregado, de 490-491 nm para la solución $\geq 1 \times 10^{-3}$ M en cubeta de 0,001 cm a 491-492 nm para la solución $\geq 1 \times 10^{-4}$ M en cubeta de 0,01 cm. Este desplazamiento batocrómico es difícil de interpretar debido a los múltiples factores que pueden producirlo y es un punto pendiente de estudio. Los posibles factores a considerar serían de tipo cinético en relación al

tiempo de evolución de los agregados, y de tipo físico como la posible orientación de los agregados con respecto a la superficie de cuarzo y su interacción con ésta.

El estudio de las bandas Q de una solución de H_4TPPS_4 $1,6 \times 10^{-3}$ M al utilizar cubetas con diferente camino óptico (Fig. II-13) indica el claro aumento de la proporción de agregado respecto al monómero ácido al disminuir el camino óptico (0,1 cm \Rightarrow 0,01 cm \Rightarrow 0,001 cm).

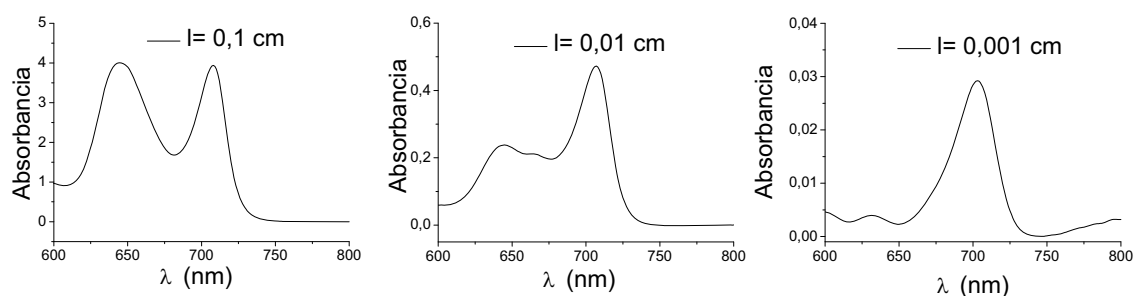


Fig. II-13 Espectros UV-Vis de una misma solución acuosa de H_4TPPS_4 $1,6 \times 10^{-3}$ M en cubetas con diferente camino óptico (las cubetas de 0,01 cm y 0,001 cm utilizadas son sin entrada y salida).

La proporción de agregado observada por espectroscopia UV-Vis en las cubetas de tipo B (sin entrada y salida) es mayor que en las cubetas con túbulos, de tipo A, por tanto la selección de partículas es más importante en el caso de las cubetas sin entrada ni salida (Fig. II-14).

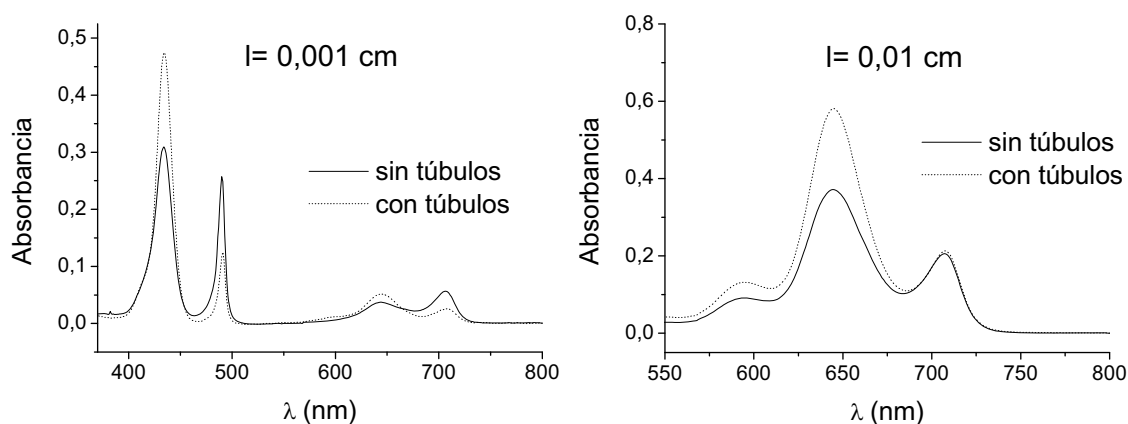


Fig. II-14 Espectros UV-Vis de una misma solución acuosa de H_4TPPS_4 $1,1 \times 10^{-3}$ M, en cubetas con y sin túbulos (tipos A y B respectivamente) de camino óptico $l=0,001$ cm y $l=0,01$ cm.

En las cubetas con túbulos se observan diferencias reproducibles en la proporción de agregado en diferentes zonas de la cubeta (Fig. II-15). En las proximidades del túbulo de entrada de la solución observamos una mayor proporción de agregado respecto de otras zonas de la cubeta, debido a un proceso de “filtrado” durante el llenado de la cubeta por capilaridad.

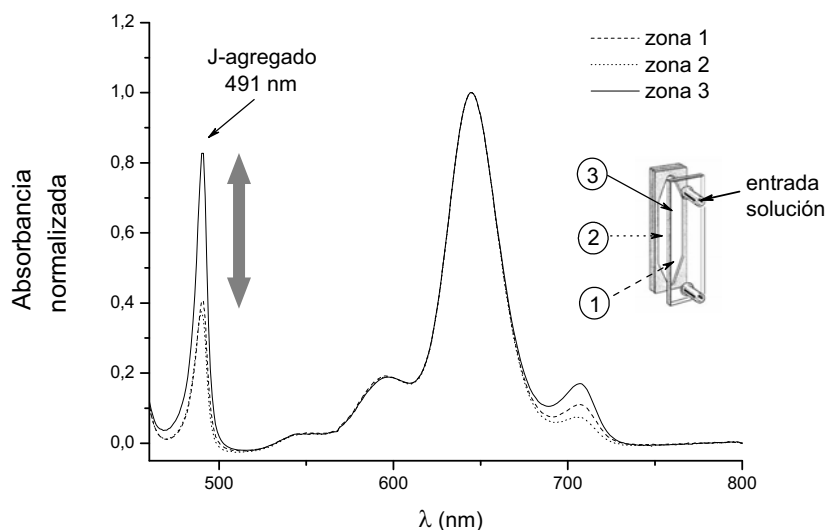


Fig. II-15 Espectros UV-Vis observados en diferentes zonas de la cubeta tipo A ($l = 0,01$ cm) de una solución acuosa $5,5 \times 10^{-4}$ M de H_4TPPS_4 . Absorbancias normalizadas a la intensidad máxima de la banda a 645 nm.

II.2.2.1.2. H_3TPPS_3

Los espectros UV-Vis de las distintas especies de esta porfirina son indistinguibles de los correspondientes a su sal sódica (Na_3TPPS_3) y son muy similares a los de H_4TPPS_4 y Na_4TPPS_4 . Las soluciones de H_3TPPS_3 en agua también pueden mostrar la presencia de tres especies (Fig. II-16): la base-libre monomérica (H_2TPPS_3) con una banda B o de Soret a 414 nm, el zwitterión monomérico diprotonado (zwH_4TPPS_3) que presenta la banda B a 434 nm y el zwitterión polimérico formado por la agregación tipo J de las especies ácidas diprotonadas, que muestra una banda de Soret a 489 nm.

<i>Especie</i>	<i>Banda B ($\lambda_{m\acute{a}x.}$, nm)</i>	<i>Bandas Q ($\lambda_{m\acute{a}x.}$, nm)</i>
H ₂ TPPS ₃	414	515, 553, 581, 636
zwH ₄ TPPS ₃	434	597, 646
J-agregado	489	635, 709

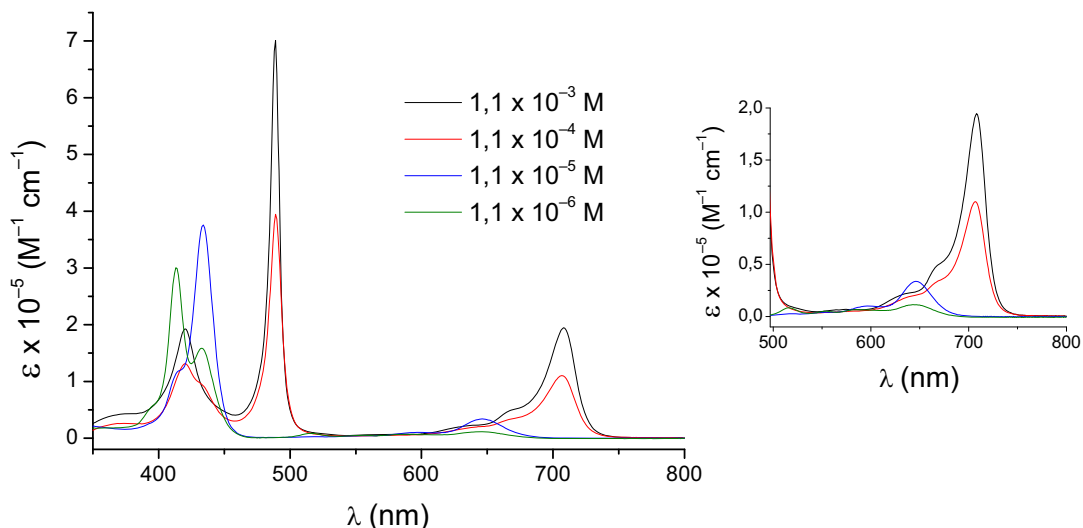


Fig. II-16 Espectros UV-Vis de soluciones acuosas de H₃TPPS₃: (—) $1,1 \times 10^{-3}$ M; (—) $1,1 \times 10^{-4}$ M; (—) $1,1 \times 10^{-5}$ M; (—) $1,1 \times 10^{-6}$ M. Se utilizaron cubetas de 0,001 cm; 0,01 cm; 0,1 cm; y 1 cm de camino óptico respectivamente (las cubetas de 0,01 cm y 0,001 cm utilizadas son sin entrada y salida).

La agregación se detecta por UV-Vis a partir de una concentración de 0,02 mM. En contraste, para la sal trisódica a pH= 1 ([HCl]= 0,1 M) la formación de J-agregados se detecta a concentraciones del orden de 0,002 mM.¹²⁴ O sea que de modo análogo al caso de la porfirina tetrasulfonada, la porfirina H₃TPPS₃ en su forma de ácido sulfónico se agrega a concentraciones mayores que su respectiva sal sódica. Si comparamos la H₃TPPS₃ con la H₄TPPS₄ o bien la Na₃TPPS₃ con la Na₄TPPS₄ observamos que el hecho de tener un fenilo libre aumenta el grado de homoasociación debido al aumento de las interacciones hidrofóbicas. También en soluciones muy concentradas, se observa el empaquetamiento tipo H de las cadenas de J-agregado zwitteriónico lineales a través de una nueva banda a 420 nm. No obstante, en el caso de la H₃TPPS₃ a concentraciones del orden $\sim 1 \times 10^{-3}$ M esta banda se define perfectamente, lo cual contrasta con el caso de la H₄TPPS₄ para la cual esta banda no es observable con tanta facilidad.

Como en el caso de la H_4TPPS_4 , las fracciones molares de cada una de las especies de H_3TPPS_3 en solución vienen determinadas por la concentración total de porfirina, ya que al variar ésta se produce un desplazamiento tanto del equilibrio ácido-base como del equilibrio de agregación debido al cambio concomitante del valor de pH. Se han observado los mismos procesos de selección de J-agregados en el llenado de cubetas de 0,01 cm y 0,001 cm y también se ha observado un incremento de la fracción de J-agregado con el tiempo y que un estado final estable no se consigue ni hasta después de dos meses (Fig. II-17).

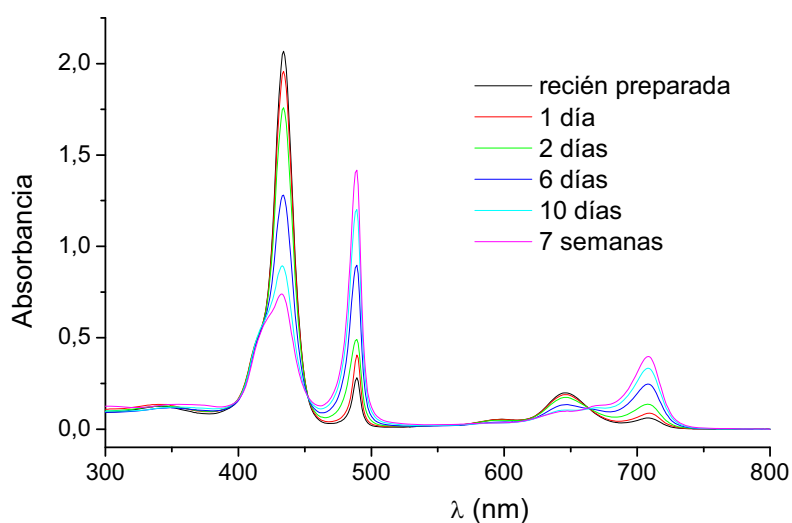


Fig. II-17 Cambios en los espectros UV-Vis ($l= 0,1$ cm) de una solución $5,1 \times 10^{-5}$ M de H_3TPPS_3 .

Los espectros UV-Vis de las soluciones madre, al estar el equilibrio completamente desplazado hacia los J-agregados, no muestran diferencias cualitativas con el paso del tiempo (Fig. II-18a). No obstante, es muy significativo que al cabo de dos semanas se observa una menor intensidad de la banda a 490 nm, lo cual indica que su apilamiento tipo H conduce a partículas más grandes. Esto se traduce en coeficientes de extinción molar aparentemente menores. Además en los espectros UV-Vis obtenidos al diluir soluciones agregadas se observaron diferencias en la desagregación de homoasociados entre soluciones más o menos envejecidas. Los agregados de más de 10 días desagregaron más lentamente que los recién obtenidos. Por ejemplo una dilución

1/100 realizada a partir de una solución de H_3TPPS_3 1×10^{-3} M recién obtenida de la columna de intercambio catiónico, comparada con la misma dilución realizada a partir de esta misma solución madre de H_3TPPS_3 dos semanas después de su obtención, mostraron un espectro UV-Vis muy distinto (Fig. II-18b). La dilución preparada a partir de la solución madre envejecida durante dos semanas mostró una mayor proporción de J-agregados lo que confirma la irreversibilidad de los J-agregados en los últimos estadios de agregación. Además esta característica se observa más fácilmente en el caso de la H_3TPPS_3 en comparación con la H_4TPPS_4 , como es de esperar por su diferente capacidad de homoasociación.

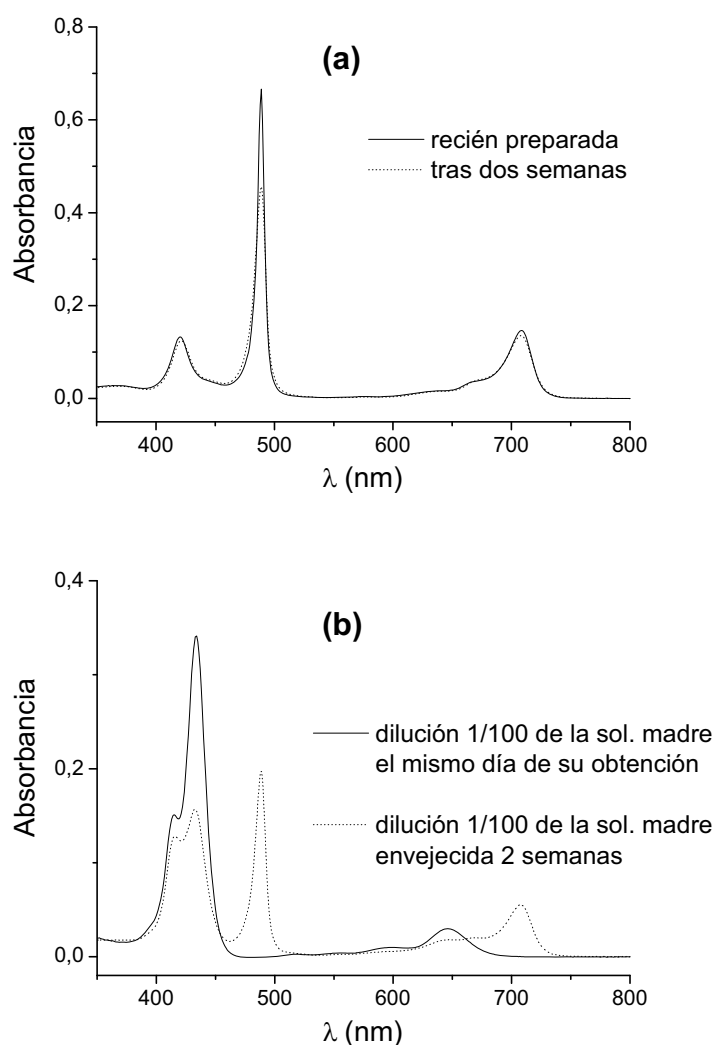
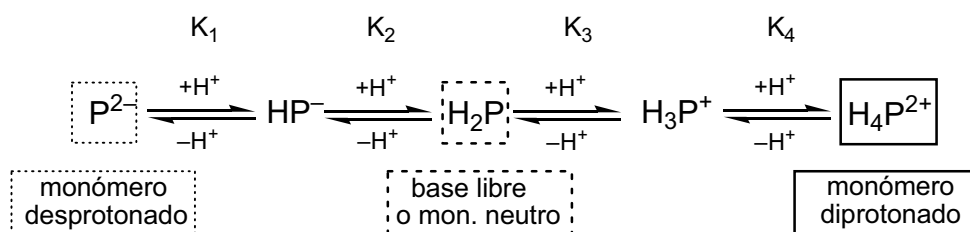


Fig. II-18 Variación con el tiempo de los espectros UV-Vis de soluciones de H_3TPPS_3 : (a) 1×10^{-3} M ($l = 0,001$ cm; sin túbulos); y (b) 1×10^{-5} M, dilución (1/100) de la misma solución anterior ($l = 0,1$ cm).

II.2.3. Estimación de las diferencias de los valores de pK_a entre los ácidos sulfónicos (H_4TPPS_4 y H_3TPPS_3) y las respectivas sales sódicas y pK_a de la sal tetrasódica de la 5,15-disulfonato-10-20-bis(4-sulfonatofenil)porfirina (Na_4DPPS_4)

Tal como es de esperar para grupos NH, las porfirinas se comportan como ácidos débiles, siendo necesarios medios básicos fuertes para detectar espectrofotométricamente los dianiones (P^{2-}). H_2P es la especie estable en medios neutros. La basicidad de las porfirinas se manifiesta por su solubilidad en ácidos minerales, en los que podemos detectar fácilmente el dicatión (H_4P^{2+}).



En los porfirinoides los valores de pK_{a3} y pK_{a4} acostumbran a diferir poco y estas pequeñas diferencias provocan que la especie monoácida (monocación) sea difícil de detectar. En el caso de las porfirinas con sustituyentes en las posiciones *meso* esta diferencia disminuye aún más. Para los porfirinoides en general, se acepta que la base-libre al captar un protón se deforma de tal forma que se favorece la protonación del otro nitrógeno pirrolenínico y esto limita el margen de pH de existencia del monocatión. En el caso de las porfirinas *meso*-aril-sustituidas, este margen es menor, ya que posiblemente la deformación que se produce ayuda al anillo fenílico a rotar hacia una posición casi coplanar respecto al anillo de porfirina, facilitando así la interacción de los sistemas π conjugados.⁸⁴ Por lo tanto se pueden estudiar los equilibrios a diferentes valores de pH siguiendo la evolución de la banda Soret y determinar un pK_a aparente correspondiente a $(pK_{a3} + pK_{a4})/2$. Aparte del efecto de los anillos fenílicos, también hay que considerar los efectos inductivos de los sustituyentes en la basicidad del macrociclo. Así un mayor carácter donador de electrones de los sustituyentes presentes provoca un aumento en la basicidad de la porfirina.

II.2.3.1. Na₄DPSS₄

Uno de los objetivos descritos en la primera parte de este trabajo era el estudio del pK_a de esta porfirina para observar el efecto que el grupo sulfonato, unido directamente en la posición *meso*, puede ejercer sobre la protonación de los N pirrolenínicos del anillo de porfirina. Para ello realizamos medidas de espectroscopia UV-Vis (Fig. II-19) de soluciones acuosas de Na₄DPSS₄, recién preparadas y a temperatura ambiente, de concentración $5,5 \times 10^{-6}$ M y a diferentes pH (para más detalle, ver parte experimental).

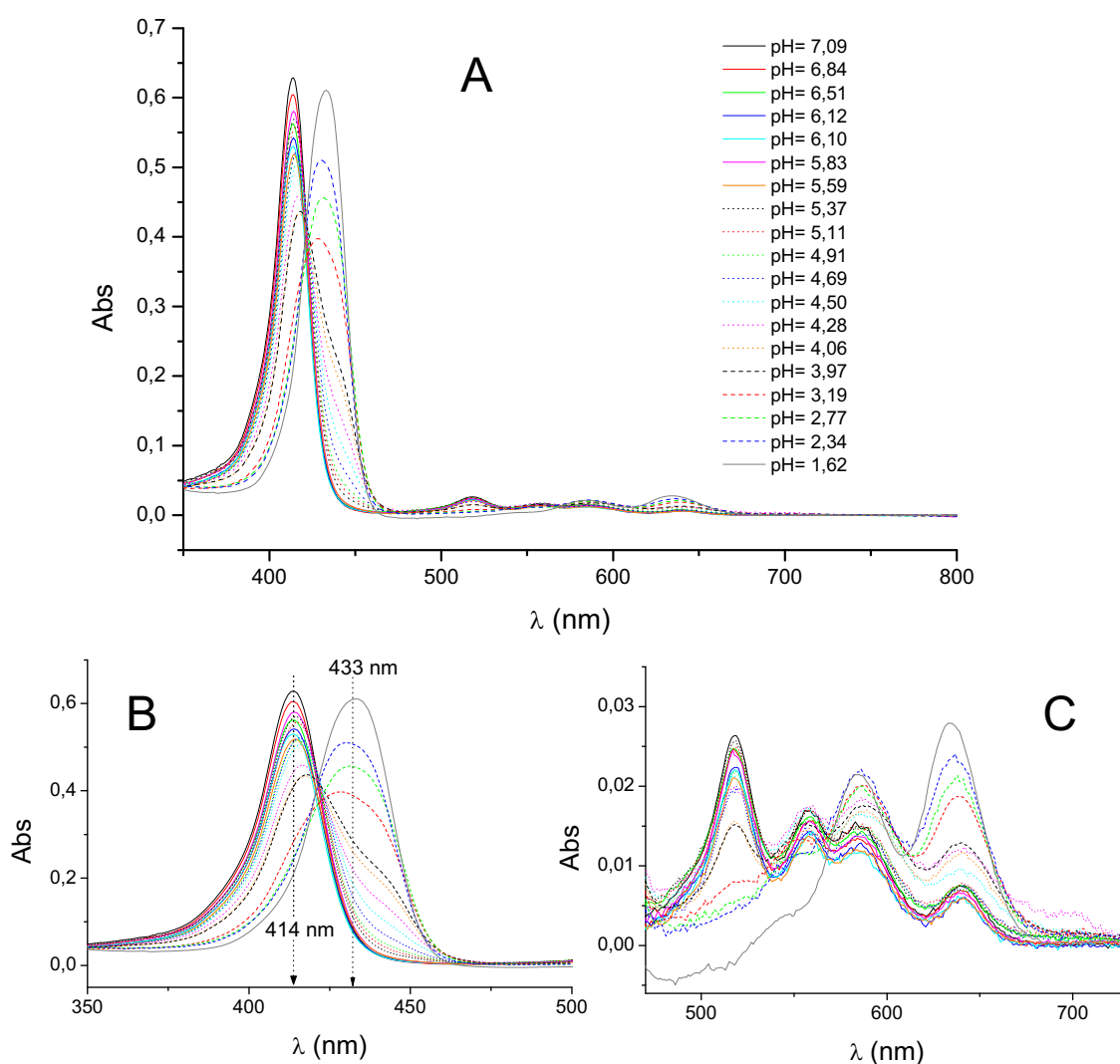


Fig. II-19 A) Variación con el pH de los espectros UV-Vis ($l = 0,1$ cm) de Na₄DPSS₄ ($5,5 \times 10^{-6}$ M); B) ampliación de la zona de la banda B (banda de Soret, $S_0 \rightarrow S_2$) del monómero ácido: $H_4DPSS_4^{2-}$, $\lambda_{m\acute{a}x.} = 433$ nm y de la base-libre: $H_2DPSS_4^{4-}$, $\lambda_{m\acute{a}x.} = 414$ nm; C) ampliación de la zona de las bandas Q ($S_0 \rightarrow S_1$).

A pH= 1,6 toda la Na_4DPPS_4 se encuentra en forma ácida ($\text{H}_4\text{DPPS}_4^{2-}$) y a pH= 7,1 en forma base-libre ($\text{H}_2\text{DPPS}_4^{4-}$). Las bandas características de ambas especies se detallan en la Tabla II-2:

Tabla II-2 Bandas observadas por espectroscopia UV-Vis para la Na_4DPPS_4 .

Compuesto	Banda B (nm) *	Bandas Q (nm) *
<i>base-libre ($\text{H}_2\text{DPPS}_4^{4-}$)</i>	413 (120000)	518 (5500), 559 (3300), 584 (2900) y 640 (1500)
<i>ácido diprotonado ($\text{H}_4\text{DPPS}_4^{2-}$)</i>	433 (110000)	584 (3900) y 634 (5030)

* Entre paréntesis se detallan los valores del coeficiente de absorptividad molar ϵ ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) para cada una de las bandas.

Los espectros no muestran puntos isobésticos, por tanto hay más de dos especies involucradas en el equilibrio, lo cual sugiere la presencia del monocatión. La transición entre las dos bandas de Soret sugiere la presencia de dos quasi-centros isobésticos. Esto estaría de acuerdo con la presencia de dos especies ácidas: el monocatión y el dicatión. Se observa que el monocatión absorbe en la zona de la banda del monómero neutro, con la banda Soret aproximadamente a 420 nm. La representación de los valores de pH frente al logaritmo decimal de la relación de concentraciones de la base y de su ácido conjugado pone de manifiesto la existencia de dos valores de pK_a . Siguiendo el método descrito en la parte experimental se obtuvieron las representaciones mostradas en la Fig. II-20 a las longitudes de onda siguientes: a) 414 nm (longitud de onda de máxima absorción de la porfirina base-libre) y b) 433 nm (longitud de onda de máxima absorción de la porfirina ácida diprotonada). El desplazamiento hacia valores de $\log ([\text{H}_2\text{DPPS}_4^{4-}]/[\text{H}_4\text{DPPS}_4^{2-}]) > 0$ es consecuencia de la medición simultánea a $\lambda = 414$ nm de la especie neutra y de la especie monoprotonada, cuyo máximo de absorción difiere en algunos nanómetros.

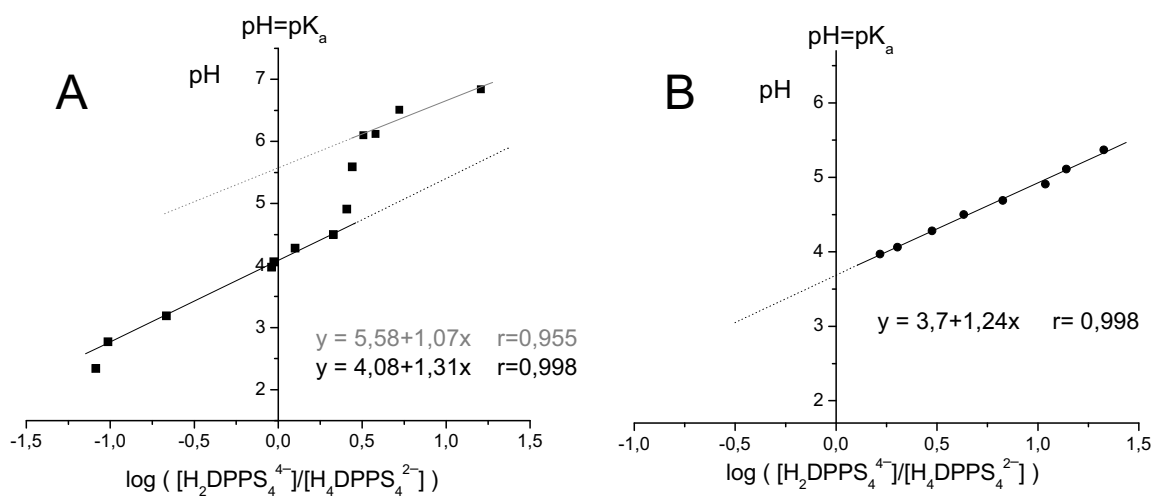


Fig. II-20 Representación del pH vs. $\log ([H_2DPPS_4^{4-}] / [H_4DPPS_4^{2-}])$, A) a $\lambda_{anal.} = 414 \text{ nm}$; B) a $\lambda_{anal.} = 433 \text{ nm}$.

Para $\lambda_{anal.} = 414 \text{ nm}$ obtenemos una curva de valoración que indica la presencia de dos pK_a separados por unas dos unidades de pH: con los valores aproximados $pK_{a3} = 5,6 \pm 0,1$ (monoácido) y $pK_{a4} = 4,1 \pm 0,1$ (diácido). En cambio para $\lambda_{anal.} = 433 \text{ nm}$ obtenemos sólo un valor de $pK_{a(1/2)} = 3,7 \pm 0,1$ [$pK_{a(1/2)} = (pK_{a3} + pK_{a4})/2$], debido a que el monómero base-libre y el monocatión absorben en la misma región del espectro. Teniendo en cuenta los posibles errores experimentales (p. ej. contaminación de la banda de Soret de H_2P con la banda de Soret de H_3P^+) es evidente la detección de dos pK_a diferenciados aproximadamente en dos unidades de pH. Esto contrasta con los valores de pK_a de porfirinas sustituidas en *meso* por grupos arilo,⁸⁴ en donde sólo es posible la detección de una única transición promedio debido a la poca diferencia entre los valores de pK_{a3} y pK_{a4} .

El valor de pK_{a3} para la Na_4DPPS_4 sólo difiere cerca de media unidad con respecto al $pK_{a(1/2)}$ (valor promedio; $pK_{a(1/2)} = (pK_{a3} + pK_{a4})/2$) de la Na_4TPPS_4 (4,8-4,9)^{78,82-84} y el valor de pK_{a4} difiere en aproximadamente una unidad. La presencia de sustituyentes sulfonato unidos directamente en las posiciones *meso*

convierte en más básico el anillo de porfirina para la primera protonación y hace más difícil la segunda protonación, que tiene lugar a medios más ácidos respecto a la Na_4TPPS_4 . Esto sugiere que el efecto de los grupos sulfonato en *meso* se manifiesta por factores de tipo estérico (conformación de anillo de la porfirina con tres protones). Estos factores probablemente tienen relación con los procesos tautoméricos de esta porfirina cuando es estudiada por RMN- ^1H ,¹²⁶ que contrastan con los de las porfirinas *meso*-tetrafenilsustituidas.

II.2.3.2. H_4TPPS_4 y H_3TPPS_3 en ausencia de contraiones distintos a los generados por autoionización (de los correspondientes ácidos sulfónicos)

Los ácidos sulfónicos H_4TPPS_4 y H_3TPPS_3 ofrecen la posibilidad de estudiar los equilibrios ácido-base correspondientes a K_3 y K_4 en ausencia de contraiones. Esto permitiría observar el efecto de la presencia de un exceso de contraiones en la solución sobre la estabilidad de las especies diprotonadas zwitteriónicas (sería de esperar que un zwitterión formado por un doble catión con las cargas negativas muy alejadas, debería ser más estable en presencia de un exceso de contraiones). Para este estudio se requirió el uso de soluciones en donde no existiera agregación, o sea en donde sólo estuvieran presentes las especies monoméricas H_2TPPS_n y $\text{zWH}_4\text{TPPS}_n$ ($n=3, 4$). Esto implica el uso de rangos de concentración distintos para H_4TPPS_4 y H_3TPPS_3 debido a su diferente comportamiento en la agregación.

Las concentraciones se determinaron por espectroscopia UV-Vis y el pH se calculó a partir de las concentraciones de porfirina base-libre y diprotonada. En el caso de la H_4TPPS_4 , 2 moles de H_3O^+ por mol de $\text{zWH}_4\text{TPPS}_4$ y 4 moles de H_3O^+ por mol de H_2TPPS_4 y para la H_3TPPS_3 , 1 mol de H_3O^+ por mol de $\text{zWH}_4\text{TPPS}_3$ y 3 moles de H_3O^+ por mol de H_2TPPS_3 (ver parte experimental). Las estimaciones de estos valores aparentes de $\text{pK}_{a(1/2)}$ se realizaron mediante la determinación del valor de pH en donde se cumple:

$$\log \frac{[\text{H}_2 \text{TPPS}_n]}{[\text{zWH}_4 \text{TPPS}_n]} = 0 \quad n = 3, 4$$

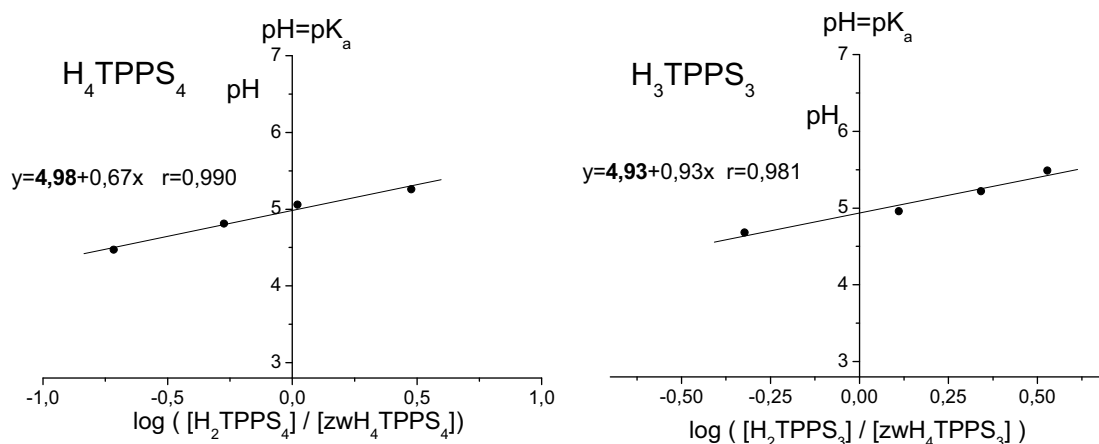


Fig. II-21 Representación del pH vs. $\log ([H_2TPPS_n]/[zwH_nTPPS_n])$; $n = 3, 4$, ($\lambda_{anal.} = 434 \text{ nm}$).

El valor de $pK_{a(1/2)}$ obtenido (Fig. II-21) fue $5,0 \pm 0,1$ para la H_4TPPS_4 y $4,9 \pm 0,1$ para la H_3TPPS_3 , valores similares o en todo caso mayores a los reportados previamente para la Na_4TPPS_4 (*i.e.* 4,6 y 4,8) medidos usando soluciones tampón,^{82,84} es decir cuando el electrolito presente es suficiente para nivelar los efectos de par iónico lo que permite la comparación de los valores de pK_a entre diferentes compuestos. Estos valores de pK_a implican que los pasos de mono- y diprotonación son simultáneos, una tendencia común en porfirinas *meso*-sustituidas.^{127,128} En estas porfirinas aniónicas la protonación representa una disminución de la carga negativa total de la molécula ($4- \Rightarrow 3- \Rightarrow 2-$), lo cual probablemente constituye la fuerza impulsora que conduce a una basicidad relativamente alta de los N pirrolenínicos. En relación con esto es significativo que para la porfirina catiónica 5,10,15,20-tetraquis(N-metil-4-piridil)porfirina, en donde la protonación implica un progresivo incremento de la carga positiva total ($4+ \Rightarrow 5+ \Rightarrow 6+$), se puede distinguir entre los pasos de mono- y diprotonación.¹²⁹

Hemos estudiado también la dependencia con la temperatura (Fig. II-22) del $pK_{a(1/2)}$ de H_4TPPS_4 y Na_4TPPS_4 (acidificada con H_2SO_4) (valores aproximados a partir de la relación de concentraciones). No se observaron diferencias significativas entre ellas, no obstante estas porfirinas comparadas con otros

derivados de imina¹³⁰ muestran una dependencia remarcable del $pK_{a(1/2)}$ con la temperatura, con una variación de hasta una unidad de pH en un margen pequeño de temperaturas (25-85°C).

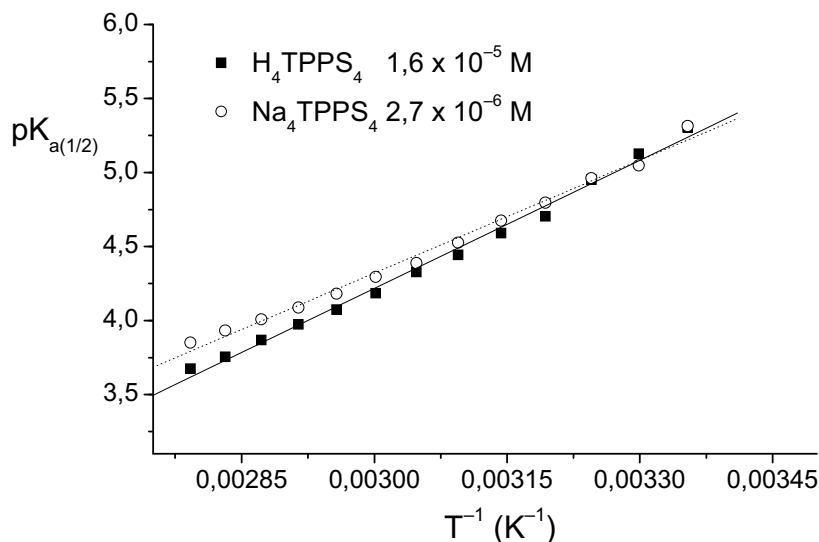


Fig. II-22 Dependencia del $pK_{a(1/2)}$ con la temperatura (25-85°C) para (■) H_4TPPS_4 $1,6 \times 10^{-5} M$; y (○) Na_4TPPS_4 $2,7 \times 10^{-6} M$.

Estos resultados muestran un comportamiento ácido/base similar para H_nTPPS_n y Na_nTPPS_n ($n=3,4$). La estructura de la especie diprotonada es la de un doble zwitterión de gran tamaño con una larga separación entre sus cargas formales positivas y negativas ($\sim 7 \text{ \AA}$ entre un grupo sulfonato con carga negativa y su posición α -pirrólica más cercana, ver Fig. II-23). Los resultados indican que la estabilidad relativa entre la especie de base-libre y la diprotonada no se ve afectada por la ausencia de contraiones.

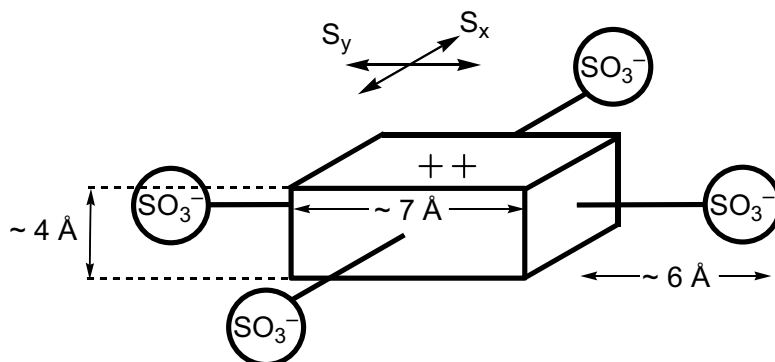


Fig. II-23 Representación simplificada de algunas distancias características de la porfirina H_4TPPS_4 .

II.2.4. Interacción de las porfirinas *meso*-sustituidas (H_4TPPS_4 y H_3TPPS_3) sobre superficies de cuarzo y vidrio

II.2.4.1. Estudio por Espectroscopia UV-Vis

A pesar las similitudes en el equilibrio ácido-base de las porfirinas sales sódicas y de sus formas de ácido sulfónico, se observaron diferencias importantes en la interacción de sus soluciones acuosas cuando está presente un tercer componente, por ejemplo las superficies del recipiente de vidrio o cuarzo.

La manipulación o almacenamiento de soluciones de estos ácidos sulfónicos usando recipientes o pipetas de vidrio neutro o de borosilicato resultó en su parcial o total neutralización. Por ejemplo una gota de una solución 1×10^{-5} M de H_4TPPS_4 de color verde, propio de su forma ácida zwitteriónica predominante a esta concentración (zwH_4TPPS_4), tras pocos segundos en contacto con una pipeta de vidrio Pyrex viró a un color rojizo (*i.e.* H_2TPPS_4). El tratamiento previo del vidrio Pyrex de borosilicato con HCl retrasa este efecto de neutralización. La silanización del material evita el fenómeno, el cual tampoco se observa si se utilizan materiales de plástico (p. ej. PELD y PEHD). Los experimentos siguientes ilustran este comportamiento. Preparamos una serie de diluciones en H_2O y en H_2SO_4 0,1 M en recipientes de cuarzo, Pyrex y vidrio topacio. Los espectros UV-Vis mostraron un efecto de neutralización con el tiempo para las soluciones no acidificadas con H_2SO_4 según el orden siguiente: Pyrex>vidrio topacio>>cuarzo (Fig. II-24). En las soluciones acidificadas con H_2SO_4 0,1 M no se detectó este efecto.

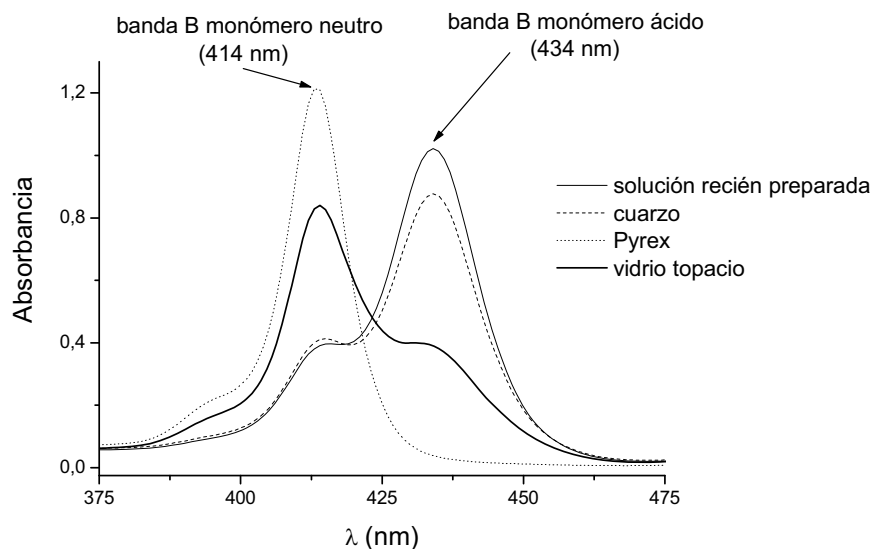


Fig. II-24 Variación de los espectros UV-Vis ($l = 0,1$ cm) de una solución 5×10^{-5} M de zWH_4TPPS_4 ($pH = 4,7$) acabada de preparar y al cabo de 26 días de estar almacenada en recipientes de distintos materiales.

II.2.4.1.1. Interacción con vidrio neutro

En el caso del vidrio neutro, además de la neutralización, tras un periodo de contacto de dos semanas se observaron indicios de contaminación con la presencia de un compuesto de tipo porfirinoide, cuyo espectro UV-Vis muestra una banda B a 420 nm y dos bandas Q a 555 nm y 593 nm. Originalmente su espectro UV-Vis era el típico de la especie base-libre con la banda B a 414 nm. En la Fig. II-25 se muestran los espectros ($l = 1$ cm) de una misma solución 1×10^{-6} M de H_2TPPS_4 preparada por dilución acuosa de una solución 5×10^{-5} M de H_4TPPS_4 contenida durante más de dos semanas en un vial de vidrio topacio. Después de dos semanas la solución presenta un espectro UV-Vis con una banda a 420 nm que atribuimos a la formación del porfirinato de Si ($SiTPPS_4$) puesto que al añadir unas gotas de H_2SO_4 1 M se obtiene la banda B característica de la especie zwitteriónica ácida (zWH_4TPPS_4) y al neutralizar la solución con $NaHCO_3$ se obtiene de nuevo la banda B propia de la base-libre volviendo a la situación inicial (H_2TPPS_4), cuando fue preparada la solución. Este comportamiento coincide con el esperado para los porfirinatos de Si, los cuales se desmetalan en HCl.¹³¹

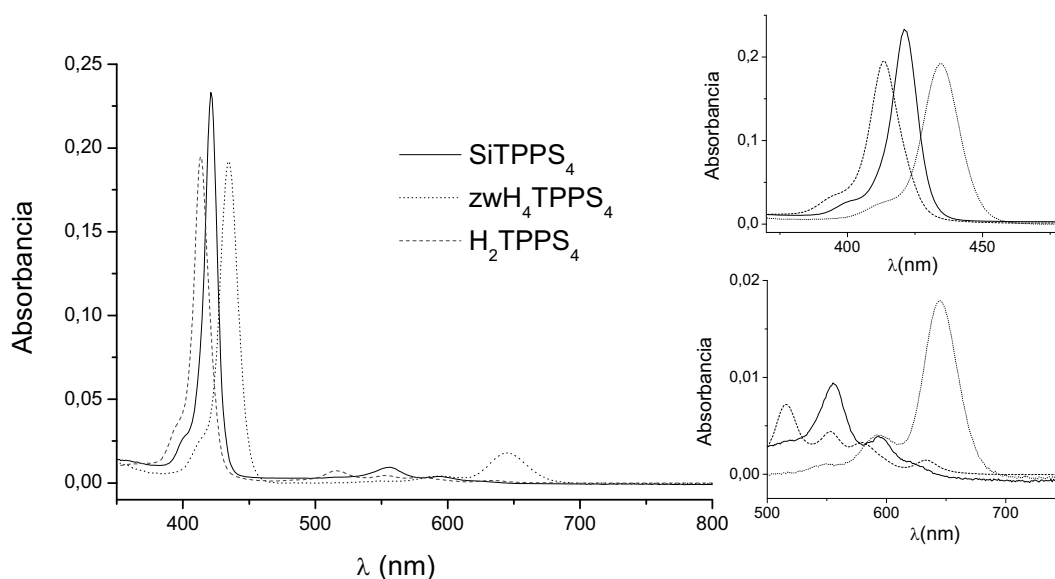


Fig. II-25 Espectros UV-Vis ($l = 1$ cm) de una solución 1×10^{-6} M de H_4TPPS_4 después de estar más de dos semanas en un vial de vidrio topacio ($SiTPPS_4$) y después de acidificar con H_2SO_4 (zwH_4TPPS_4) y neutralizar con $NaHCO_3$ (H_2TPPS_4).

II.2.4.1.2. Interacción con cuarzo

En el caso de materiales de cuarzo se observa un efecto similar de neutralización pero éste tiene lugar en menor extensión que el detectado en materiales de vidrio (véase Fig. II-24; pág. anterior). Hemos observado un claro efecto de la superficie de cuarzo sobre la relación $[H_2TPPS_4]/[zwH_4TPPS_4]$ de soluciones de porfirina como evidencia la dependencia del pK_a aparente con el camino óptico de la cubeta usada para su medida. Por ejemplo, para la H_4TPPS_4 en cubetas de 1 cm y 0,1 cm de camino óptico, el pK_a estimado fue de 5,0; pero al utilizar cubetas (de llenado por capilaridad sin tubos de entrada y salida) con menores caminos ópticos, de 0,01 cm y 0,001 cm, se observó una disminución a 4,4 y $\sim 4,1$ respectivamente del valor de pK_a aparente (Fig. II-26). Sólo para una relación superficie/volumen elevada se puede detectar el efecto de neutralización de la superficie de cuarzo: el área en contacto con la solución es la suma de las dos superficies de la cubeta ($5,2 \text{ cm}^2$) y el volumen es de $2,6 \mu\text{L}$ y $26 \mu\text{L}$ para las

cubetas de 0,001 cm y 0,01 cm respectivamente. Además para cubetas de caminos ópticos 0,001 cm y 0,01 cm con tubos de entrada y salida, el efecto de neutralización no fue tan importante ya que la solución contenida en los túbulos implica un mayor volumen de solución. A relaciones superficie/volumen bajas, por ejemplo en el caso de cubetas estándar de 0,1 cm, con 8,4 cm² de la suma de las dos superficies y 350 μL de volumen, el valor aparente de pK_a no difiere del medido en una cubeta de 1 cm de camino óptico.

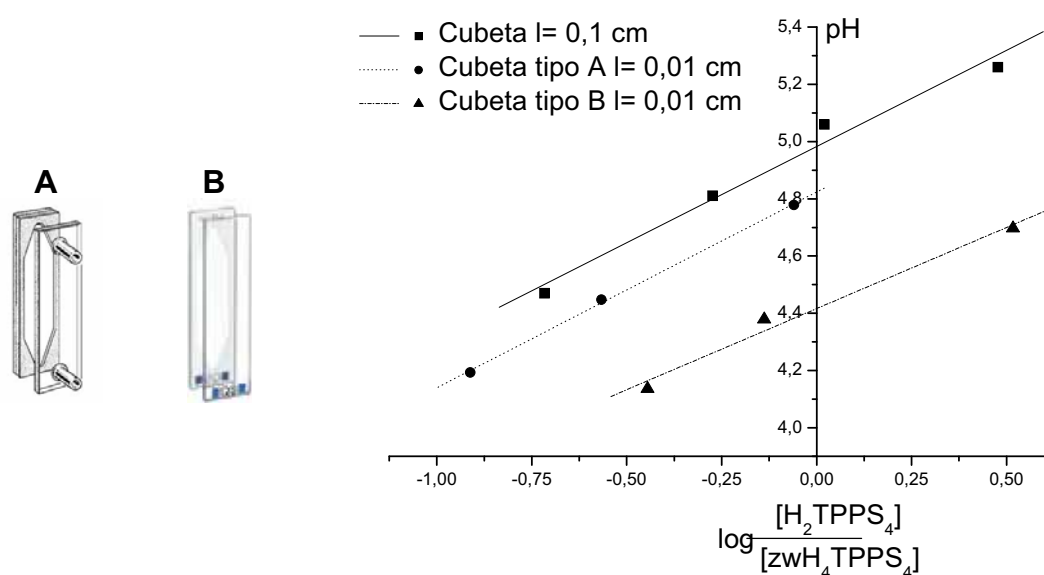


Fig. II-26 Representación gráfica del pH vs. $\log ([H_2P]/[H_4P^{2+}])$ para soluciones de H_2TPPS_4/zwH_4TPPS_4 en cubetas de (■) $l = 0,1$ cm; (●) 0,01 cm con túbulos (A); y (▲) 0,01 cm sin túbulos (B). El valor de pH está calculado a partir de la concentración de H_2TPPS_4 (x4) y de zwH_4TPPS_4 (x2).

Este efecto de neutralización podría ser explicado por la presencia de posiciones con un carácter fuertemente alcalino en la superficie de cuarzo (e. g., RO^-). No obstante, no hay reportes previos en la literatura sobre la presencia de grupos alcoxi muy básicos en superficies de cuarzo fundido equilibrado con agua a temperatura ambiente. Esto se confirma porque el tratamiento previo de las superficies de cuarzo con HCl no condujo a cambio ninguno sobre el efecto observado.

Por UV-Vis se detectó la presencia de H_2TPPS_4 adsorbida sobre la superficie de cuarzo (Fig. II-27) indicando que el fenómeno de neutralización observado ocurre simultáneamente a la adsorción de la porfirina en su forma base-libre (414 nm). Esta capa de porfirina puede desorberse fácilmente con lavados con H_2O pero se mantiene una capa fuertemente adsorbida de porfirina, que presenta la banda de Soret a 420 nm en lugar de 414 nm. Esta capa resiste los lavados con H_2O pero se puede desorber con soluciones acuosas ácidas o salinas.

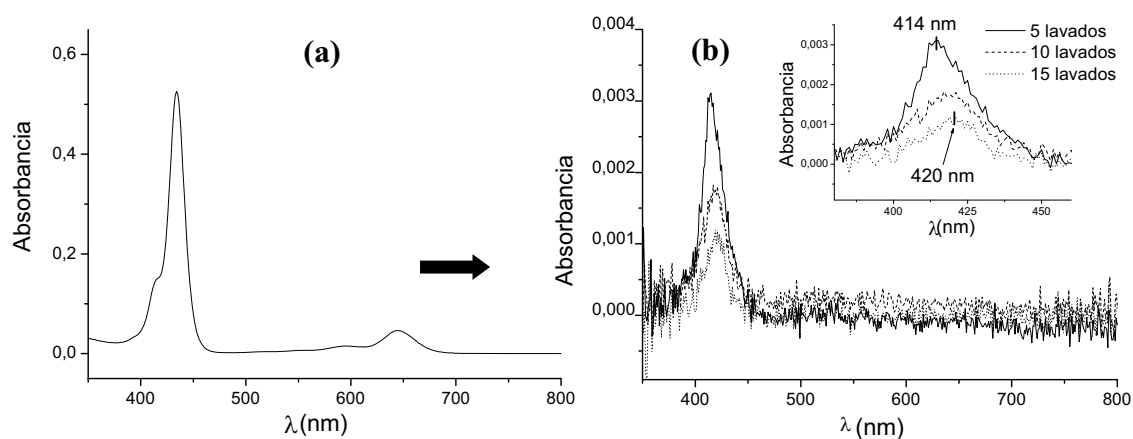


Fig. II-27 Espectros UV-Vis ($l = 0,1$ cm) de (a) una solución de H_4TPPS_4 1×10^{-5} M; y (b) de la misma cubeta (llena de agua) tras sucesivos lavados con agua.

En soluciones concentradas que contenían J-agregado se observó además la presencia de J-agregado adsorbido en las paredes de cuarzo de la cubeta, pero tras varios lavados con H_2O sólo se detectó la banda a 420 nm correspondiente a la capa de porfirina fuertemente adsorbida sobre la superficie de cuarzo (Fig. II-28). Al realizar los lavados con H_2O y llenar de nuevo la cubeta con H_2O para realizar un nuevo espectro, parte del agregado se disuelve y se observa un hombro en la zona de 434 nm indicativo de la presencia de la forma diprotonada ácida. Cuando por lavados sucesivos desaparece el agregado este hombro no se detecta y tenemos únicamente la banda a 420 nm, que no desaparece con lavados con H_2O (es necesario un tratamiento con soluciones salinas o ácidas para su desaparición). Esta adsorción de J-agregados se observa para soluciones ácidas agregadas de H_4TPPS_4 tanto procedentes de la forma de ácido sulfónico como de la sal tetrasódica.

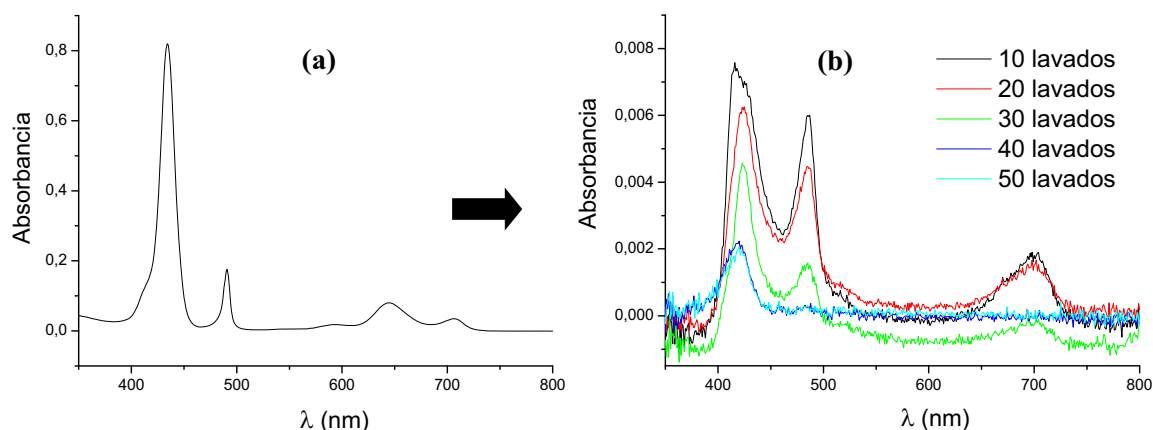


Fig. II-28 Espectros UV-Vis ($l = 0,1$ cm) de (a) una solución de H_4TPPS_4 $2,3 \times 10^{-5}$ M (H_2SO_4 $0,05$ M); y (b) espectros en H_2O tras sucesivos lavados de la cubeta utilizada para realizar el espectro (a).

El fenómeno de adsorción también pudo ser observado, con una mayor sensibilidad, mediante espectros de fluorescencia de excitación e incluso se pudieron detectar claramente 4 bandas Q asociadas a la banda B a 420 nm, lo cual corrobora que la capa fuertemente adsorbida en superficie corresponde a una porfirina en su forma base-libre. Este fenómeno de adsorción se observa también con la H_3TPPS_3 .

II.2.4.2. Estudio por Microscopia de Fuerzas Atómicas (AFM) de la porfirina adsorbida sobre cuarzo

Se utilizó una placa de las cubetas de cuarzo de tipo “cerrado” de $l = 0,01$ cm (véase Fig. II-26; pág. 68), sobre el centro de la cual depositamos 50 μ L de una solución de H_4TPPS_4 $1,3 \times 10^{-5}$ M (que no presenta J-agregado). Posteriormente preparamos una película líquida como si fuésemos a utilizar la cubeta para realizar una medida de UV-Vis y dejamos la solución en contacto con el cuarzo de la cubeta durante 5 min, después separamos las placas y las lavamos con un chorro de H_2O varias veces. Utilizamos una placa de la cubeta de cuarzo, que no ha estado en contacto con la solución, como blanco y la otra placa de la cubeta, que ha estado en contacto con la solución monomérica de porfirina, como muestra para el estudio de de la capa adsorbida. La placa de cuarzo que ha estado en contacto con la solución presenta un espectro UV-Vis correspondiente a la

porfirina monomérica no protonada (H_2TPPS_4) adsorbida sobre la superficie de cuarzo, con una absorbancia de la banda Soret (420 nm) del orden de $\leq 1 \times 10^{-3}$. Esta adsorción como hemos visto anteriormente en el estudio del fenómeno mediante espectroscopia UV-Vis parece ser independiente de la relación de H_2TPPS_4/zwH_4TPPS_4 presente en la solución de contacto.

Las medidas de Microscopia de Fuerzas Atómicas en modo *tapping* (Fig. II-29) no indicaron ningún ordenamiento especial de la capa, pero los análisis topográficos de sección sugirieron que la capa adsorbida correspondía a una monocapa de porfirinas depositadas de forma planar sobre la superficie de cuarzo. El incremento de rugosidad observado en la placa de cuarzo con porfirina adsorbida respecto de la placa de cuarzo utilizada como blanco sugiere un grosor de la capa de porfirina entre 0,5 nm y 1 nm. Esto estaría de acuerdo con el grosor esperado para una monocapa de porfirinas dispuestas de forma plana respecto de la superficie (sección ortogonal de porfirina $\approx 0,75$ nm).

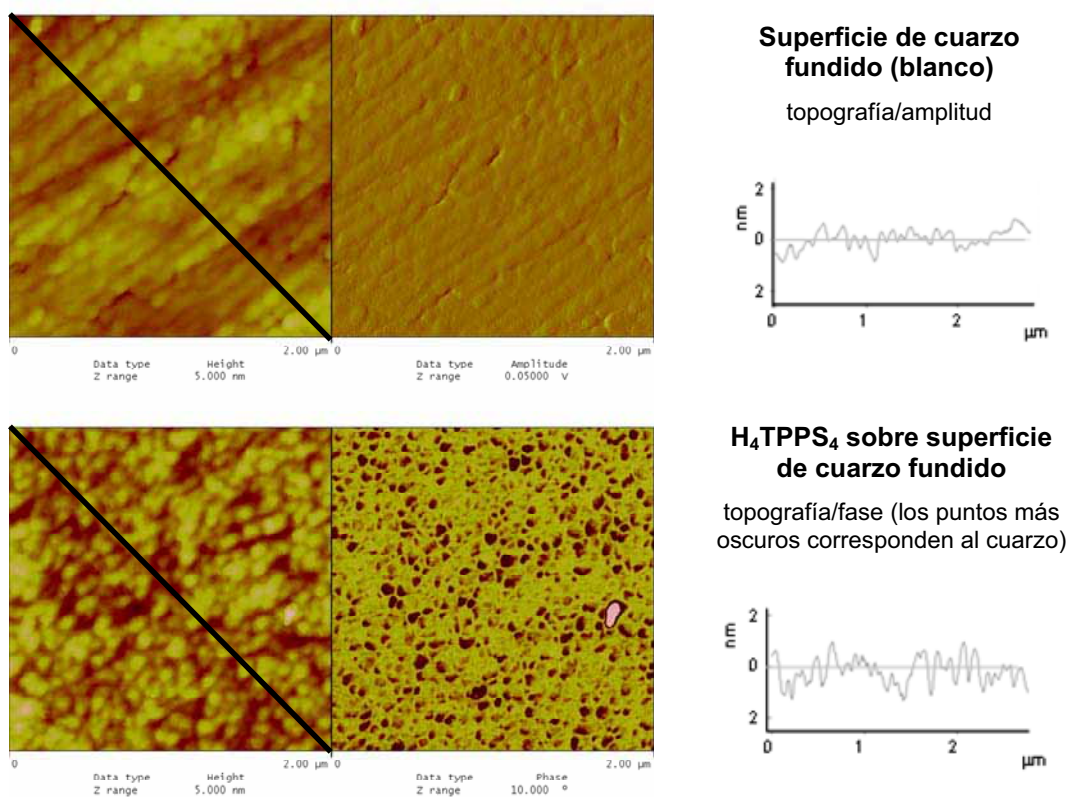


Fig. II-29 Imágenes de AFM ($2 \mu\text{m} \times 2 \mu\text{m}$) de la superficie de cuarzo fundido antes y después de haber estado en contacto con una solución de H_4TPPS_4 $1,5 \times 10^{-5}$ M (ver texto).

II.2.4.3. Estudio por Espectrometría Fotoelectrónica de Rayos X (XPS)

Para el estudio por XPS de la adsorción de porfirina sobre cuarzo utilizamos las mismas placas de cuarzo preparadas como se describe en el apartado anterior para las pruebas de AFM. En la Tabla II-3 se muestran los valores de energía de enlace para el N 1s de los dos tipos de N presentes en las porfirinas en su forma base-libre, en este caso la 5,10,15,20-tetrafenilporfirina (TPP) y la 2,3,7,8,12,13,17,18-octaetilporfirina (OEP) descritos en la literatura.¹³²

Tabla II-3 Energía de la banda N 1s en porfirinoides.¹³²

Compuesto	N pirrolenínico	N pirrólico	Intensidad relativa de las señales para el N 1s (N pirrolenínicos :N pirrólicos)
TPP	398,2 eV	400,1 eV	2 : 2
OEP	397,8 eV	399,9 eV	2 : 2
meso-trifenilcorrol	397,7 eV	399,9 eV	3 : 1

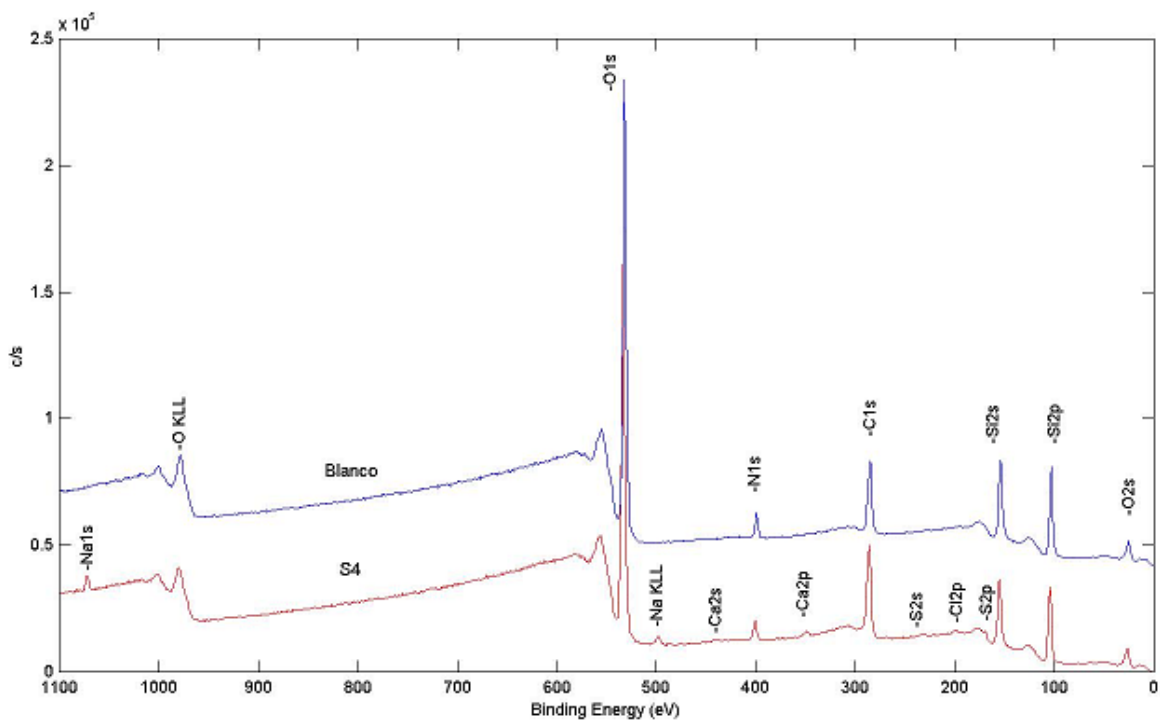


Fig. II-30 Espectros de XPS de baja resolución de la superficie de cuarzo fundido utilizado como blanco (**Blanco**) y de la superficie de cuarzo fundido lavado con H₂O tras estar en contacto durante 5 min con una solución de H₄TPPS₄ (1,3 x 10⁻⁵ M) sin J-agregado (**S4**).

Se registraron espectros de baja resolución (Fig. II-30) y de alta resolución para las energías de C 1s, N 1s, O 1s, S 2s, S 2p, Si 2s y Si 2p.

La superficie del blanco aparte de las señales de Si (2s y 2p) y O (1s y 2s) mostró señales de contaminación importantes de C (1s) grafitico y N (1s). La superficie de cuarzo que había estado en contacto con la solución de H₄TPPS₄ además de los picos correspondientes a los elementos Ca (2s y 2p), Cl (2p) y Na (1s), provenientes seguramente de la contaminación del agua, mostró los picos de S (2s y 2p) provenientes de la porfirina adsorbida.

Aplicando la siguiente expresión:

$$\% \text{ elemento } 1 = \frac{\text{Área pico elemento } 1 / \text{ct (factor)}}{\sum \text{Área pico todos los elementos}}$$

se realizó un análisis semicuantitativo elemental a partir de las áreas relativas de los picos de los espectros de baja resolución y de los valores de intensidades espectrales que se atribuyen a estas señales.¹³³ Los valores obtenidos se reflejan en la Tabla II-4:

Tabla II-4 Composición elemental (%) determinada a partir de las áreas relativas y los factores de sensibilidad de los picos de los espectros de baja resolución.

Superficie de cuarzo con porfirina adsorbida

C	N	O	Na	Si	S	Cl	Ca	
28,67	3,24	45,58	0,96	19,77	1,11	0,39	0,29	con S 2p
28,75	3,25	45,71	0,96	19,82	0,83	0,39	0,29	con S 2s

Superficie de cuarzo (blanco)

C	N	O	Si
2,72	4,07	50,11	23,10

Se observaron diferencias en los % calculados para cada elemento según consideramos el pico correspondiente al S 2p o al S 2s. Teniendo en cuenta uno u otro pico obtenemos relaciones Si/S de 17,8/1 y 23,9/1 respectivamente.

Tomando como referencia el valor de 284,8 eV para el C 1s gráfico las energías de los picos del S 2s y del S 2p son de 231,5 eV y 167,8 eV respectivamente, la energía del O 1s 532,5 eV y la del Si 2p 103,1 eV. En la Fig. II-31 se muestran como ejemplo los espectros del S 2s y del S 2p.

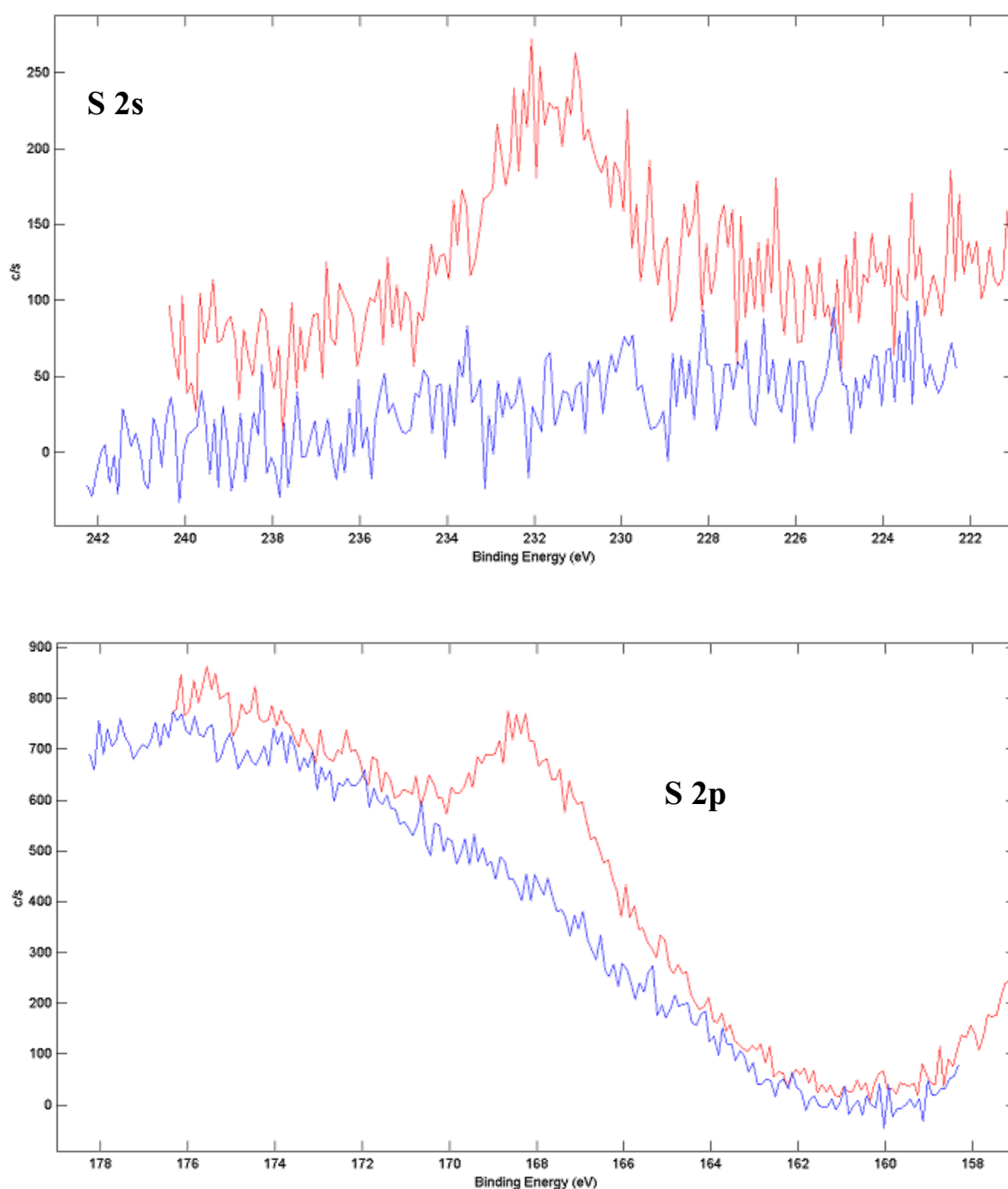


Fig. II-31 Espectros de XPS de alta resolución de S 2s y S 2p, para el blanco de la superficie de cuarzo (*azul*) y para la superficie de cuarzo tras estar en contacto durante 5 min con una solución de H₄TPPS₄ ($1,3 \times 10^{-5}$ M) monomérica (sin J-agregado) (*rojo*).

En el caso del N 1s (Fig. II-32) la importante contaminación de origen indefinido impidió sacar conclusiones de tipo cuantitativo puesto que presenta un pico a 399,09 eV que coincide con la energía N 1s de los N pirrólicos de la porfirina (a 399,9 - 400,1 eV). No obstante en la muestra se observa un hombro a energías más bajas indicativo de los N pirrolenínicos de la porfirina (397,7 eV - 398,2 eV; ref. 132). La contaminación no identificada de N impidió llegar a conclusiones claras sobre el grosor de la capa de porfirina.

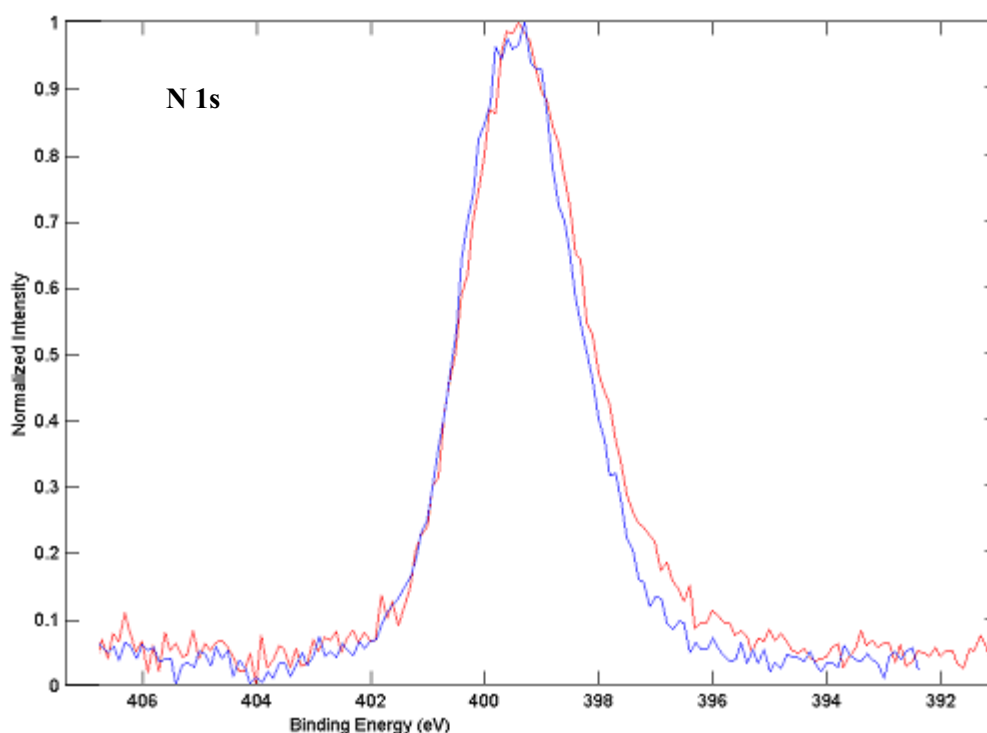
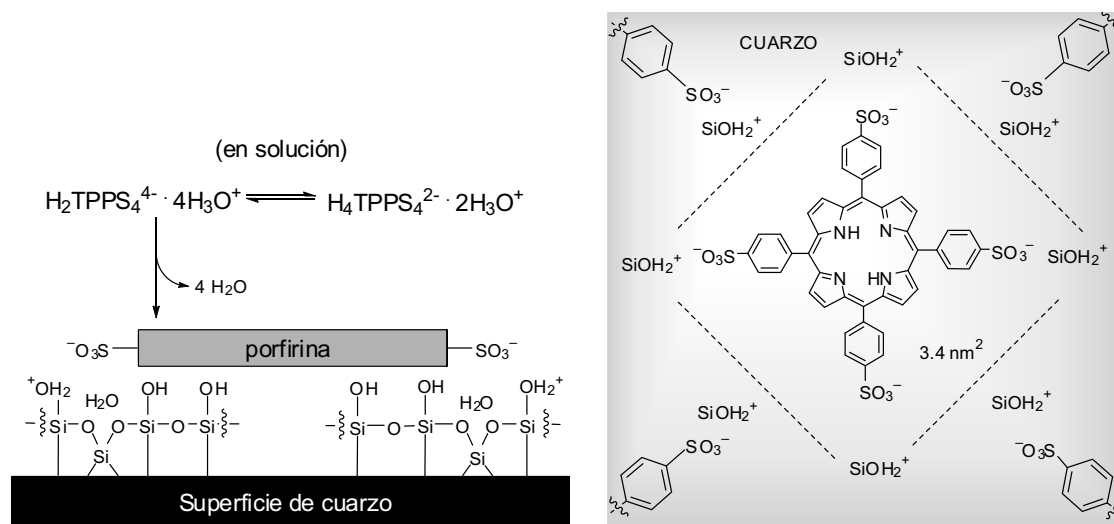


Fig. II-32 Espectros de XPS de alta resolución de N 1s, para la superficie del blanco de cuarzo (*azul*) y para la superficie de cuarzo tras estar en contacto durante 5 min con una solución de H_4TPPS_4 ($1,3 \times 10^{-5} M$) monomérica (sin J-agregado) (*rojo*).

II.2.4.4. Modelo de adsorción de porfirinas zwitteriónicas

Las medidas de AFM muestran como la adsorción corresponde a una monocapa de porfirinas depositadas de forma planar. Por UV-Vis se detecta que la especie adsorbida es la porfirina base-libre y que además la aparición de esta adsorción va acompañada de la desaparición de protones de la solución. Por lo

tanto la única explicación es un anclaje al cuarzo tanto de la porfirina sulfonada como de los protones procedentes de la autoionización de los grupos sulfónicos, o sea que las porfirinas establecen interacciones electrostáticas con las posiciones protonadas de la superficie. Esto explicaría además la resistencia a los lavados con soluciones de agua pura y la desorción por cationes como Na^+ o H_3O^+ . Este modelo se explica a continuación y se resume en el Esquema II-2.



Esquema II-2 Modelo propuesto para la adsorción de H_4TPPS_4 sobre superficies de cuarzo fundido.

Las superficies de cuarzo fundido muestran grupos silanol (SiOH) y SiOSi y ambos grupos pueden ser protonados a SiOH_2^+ y SiOHSi^+ .^{134,135} De la estimación del efecto de neutralización observado en las medidas del pK_a en cubetas muy delgadas (0,01 y 0,001 cm) el cambio de pH originado por la adsorción de porfirina se debe aproximadamente al anclaje de 4 protones por $3,4 \text{ nm}^2$. Este valor de área está de acuerdo con el ocupado por una porfirina adsorbida permaneciendo plana respecto a la superficie de cuarzo con sus grupos aniónicos sulfonato enlazados iónicamente a las posiciones $-\text{SiOH}_2^+$ y $-\text{SiOHSi}^+$. Otra explicación alternativa, la cual no modificaría el número ni la superficie ocupada por la porfirina, sería la adsorción de la especie de ácido sulfónico sin ionizar ($-\text{SO}_3\text{H}$). El grupo $-\text{SO}_3\text{H}$ establecería puentes de hidrógeno con los oxígenos de los grupos $-\text{SiOH}$ y $-\text{SiOSi}$.

Esta monocapa actuaría como soporte para la deposición de capas hidratadas de la porfirina en su forma de base-libre (H_2TPPS_n ; $n= 3, 4$), las cuales estarían en equilibrio e intercambio catiónico con el seno de la solución. Por lo tanto el efecto en la acidez del seno de solución sólo debería atribuirse a la primera monocapa fuertemente adsorbida en la superficie de cuarzo. Téngase presente que la formación de la monocapa de H_2TPPS_4 adsorbida sobre la superficie de cuarzo descrita en los experimentos anteriores ocurre al utilizar soluciones de las especies monoméricas ($H_2TPPS_4 \rightleftharpoons zWH_4TPPS_4$). En el caso de soluciones con J-agregados también puede justificarse de este mismo modo la detección de la banda de absorción correspondiente a la porfirina neutra detectada después de lavar los J-agregados depositados sobre el cuarzo. Además al frotar sobre una superficie de cuarzo una muestra sólida seca de H_4TPPS_4 (o sea de sus especies zwitteriónicas diprotonadas como veremos en la caracterización del estado sólido de esta porfirina) se detecta también base-libre adsorbida, la cual se puede interpretar de la misma manera: la capa de porfirina base-libre adsorbida actuaría de soporte para la adherencia de J-agregado.

Son de remarcar las diferencias de esta adsorción de H_2TPPS_n ($n= 4, 3$) sobre cuarzo con la reportada previamente para la Na_4TPPS_4 sobre vidrio,¹³⁶ la cual está mediada por la presencia de un polímero básico protonado (polietilenimina). Sin embargo la interacción de la polimina protonada con el cuarzo podría ser similar a la reportada aquí para la porfirina. En relación con esto hay resultados previos sobre la polianilina protonada que sugieren que estos procesos de adsorción sobre superficies de cuarzo fundido podrían ser generales para derivados imínicos protonados.^{137,138} En el caso de la polianilina protonada, los cambios de pH al utilizar cubetas estrechas de camino óptico 0,001 cm ha sido malinterpretado,^{137,138} atribuyendo su causa a un efecto de confinamiento espacial sobre el valor de pK_a del polímero. En nuestro grupo de investigación hemos reproducido estos últimos resultados y hemos identificado la adsorción sobre la superficie de cuarzo de emeraldina neutra, situación análoga a la descrita aquí para las porfirinas H_nTPPS_n ($n= 4, 3$).

Es de señalar que estos efectos en la interacción con superficies de vidrio no pudieron ser detectados en el caso de soluciones de las sales sódicas de estas porfirinas (Na_4TPPS_4 , Na_3TPPS_3) en medio neutro, lo cual está de acuerdo con el modelo de absorción discutido más arriba.

En resumen, en porfirinas amfifílicas los contraiones de los sustituyentes iónicos pueden tener un importante papel en los procesos de adsorción sobre superficies funcionalizadas. En relación con esto, es significativo como intentos previos en nuestro grupo de preparar aerogeles de sílica conteniendo J-agregados de porfirina resultaron infructuosos. Cuando se prepararon a partir de soluciones acidificadas de H_4TPPS_4 (libre de Na^+), el envejecimiento del aerogel fue simultáneo a la transformación de los J-agregados en la especie de porfirina base-libre (H_2TPPS_4). Este fenómeno podría ser explicado por la existencia de un proceso de adsorción similar al descrito anteriormente para la interacción con superficies de cuarzo fundido. Estos resultados junto con otros aparecidos recientemente sobre la adsorción de porfirinas amfifílicas sobre superficies de vidrio¹³⁹ sugieren que los materiales basados en Si son sustratos apropiados para obtener capas de porfirinas adsorbidas.

Otra consecuencia práctica y simple de estos resultados es la precaución de utilizar materiales plásticos (pipetas y contenedores de PE-LD) para la manipulación y almacenamiento de soluciones de porfirinas amfifílicas en forma de ácido sulfónico (H_4TPPS_4 y H_3TPPS_3).

II.2.5. Estructura en estado sólido de los ácidos sulfónicos de porfirinas *meso*-sustituidas H_4TPPS_4 y H_3TPPS_3

II.2.5.1. Estudio por Espectroscopia FT-IR

Los espectros de FT-IR (pastillas de KBr) de muestras sólidas de H_nTPPS_n ($n= 3, 4$), obtenidas por liofilización o por rotaevaporación a 50°C , mostraron las bandas características de absorción del $-\text{SO}_3^-$ ($1229, 1188, 1168, 1030 \text{ cm}^{-1}$)

(Fig. II-33).^{140,141} Esto junto con la ausencia de la absorción del *stretching* asimétrico a $1350\text{-}1340\text{ cm}^{-1}$ característica del grupo $\text{-SO}_3\text{H}$ indica que los grupos de ácido sulfónico se encuentran en la forma de aniones sulfonato (sulfonatos de hidronio), siguiendo la tendencia común en la mayoría de ácidos sulfónicos aromáticos.

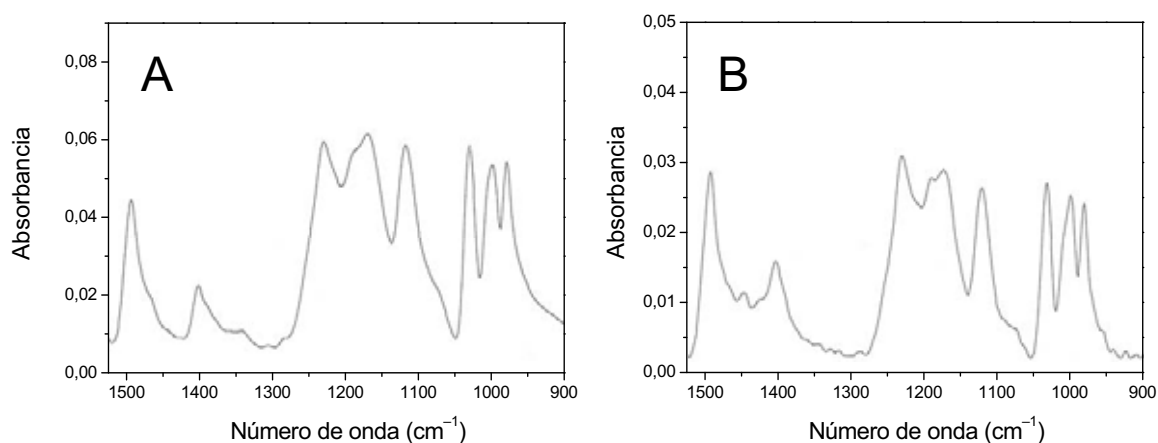


Fig. II-33 Espectro FT-IR en absorbancia de una disolución sólida en KBr de A) H_4TPPS_4 ; y B) H_3TPPS_3 , mostrando las bandas de *stretching* características del anión sulfonato.

II.2.5.2. Estudio por Espectroscopia UV-Vis

Las películas húmedas obtenidas por evaporación de soluciones acuosas mostraron espectros UV-Vis [Fig. II-34; (—)] similares a los obtenidos¹⁴² de soluciones acuosas ácidas de Na_4TPPS_4 . Se obtuvieron la banda B y las bandas Q características de J-agregados (banda B a 490 nm y bandas Q a 635 y 707 nm) y una banda B (420 nm) menos intensa correspondiente a la homoasociación tipo H de estos J-agregados, por apilamiento cara a cara. Las películas obtenidas a partir de soluciones acuosas de H_4TPPS_4 mostraron además una pequeña banda a 455 nm que también se detecta en el caso de soluciones acuosas ácidas de Na_4TPPS_4 . Las películas obtenidas por evaporación de soluciones de H_4TPPS_4 sólo pueden realizarse sobre vidrio recién silanizado puesto que en caso contrario se produce la neutralización de la solución a través del mecanismo de adsorción descrito anteriormente.

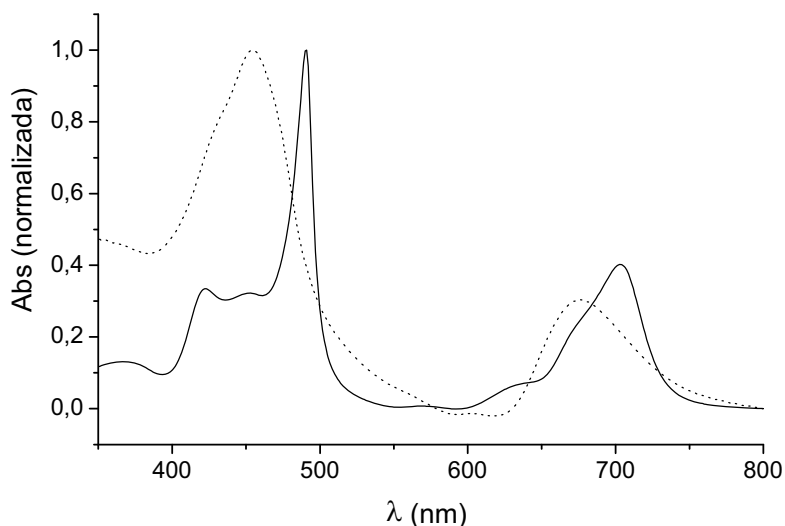


Fig. II-34 Espectros UV-Vis de H_4TPPS_4 : (—) película de J-agregado obtenida por evaporación a temperatura ambiente de una solución acuosa de H_4TPPS_4 (2 mg/mL) sobre vidrio silanizado; (·····) pastilla de KBr ($\approx 1,5$ mg / 150 mg) de H_4TPPS_4 sólida obtenida por rotaevaporación a 50°C .

Los espectros de UV-Vis de muestras sólidas de H_nTPPS_n ($n=3, 4$) en ausencia de agua, tal cual o en pastillas de KBr, mostraron diferencias sustanciales con respecto a los obtenidos en solución acuosa. En el caso de muestras sólidas de H_4TPPS_4 en pastillas de KBr concentradas (> 1 mg porfirina / 150 mg KBr) el espectro UV-Vis [Fig. II-34; (·····)] presenta la banda B y las bandas Q desplazadas batocrómicamente respecto a la especie monomérica en solución e hipsocrómicamente respecto a los J-agregados. El espectro muestra una banda B ancha a 455 nm y dos bandas Q a 602 nm y 675 nm (muy intensa). Es de remarcar que las muestras de películas húmedas de J-agregados muestran también la banda a 455 nm junto con un hombro alrededor de 680 nm lo cual indica que esta especie de las muestras sólidas (libres de H_2O) también está presente como componente minoritario en las películas húmedas. De hecho, cuando las muestras sólidas no estaban suficientemente secas, la banda B correspondiente al J-agregado (490 nm) también se detecta como componente minoritario. Además varios experimentos en los que se obtenían sólidos menos secos o películas menos húmedas han confirmado la correlación entre la cantidad de agua en la muestra y el predominio de una u otra especie.

La comparación entre la H_4TPPS_4 y la H_3TPPS_3 , esta última de carácter más lipofílico, muestra como la H_3TPPS_3 presenta una mayor tendencia a dar J-agregados que la H_4TPPS_4 . Por ello en el caso de la H_3TPPS_3 es necesario un mayor secado de la muestra para poder detectar la especie a 455 nm.

En el caso que la muestra de porfirina contenga un ácido extra (*e. g.*, ácido sulfúrico o ácido *p*-toluensulfónico con una relación estequiométrica ácido/porfirina ≥ 2) al probar diferentes condiciones de secado se comprobó que el secado progresivo de soluciones acuosas de H_4TPPS_4 conducía primero a películas de J-agregado, pero que un mayor proceso de secado resultaba en un espectro UV-Vis correspondiente a la sal de las especies monoméricas diprotonadas con la base conjugada del ácido añadido. Las bandas de absorción obtenidas son aquellas de las sales correspondientes, por ejemplo 442 y 445 nm para HSO_3^- y TsO^- respectivamente (ver ref. 143 para un reporte previo sobre las sales con HSO_3^-). Por ello la absorción de la especie a 455 nm probablemente no corresponde al zwitterión monomérico sino al dímero, lo cual viene confirmado por los experimentos de dilución discutidos a continuación.

II.2.5.2.1. Efecto de la dilución en el caso de soluciones sólidas

Al comparar los espectros UV-Vis de soluciones sólidas de H_4TPPS_4 y H_3TPPS_3 en KBr, se observó un comportamiento similar. Cuando la proporción de H_nTPPS_n ($n= 3, 4$) / KBr es $> 1,5$ mg / 150 mg aparece una banda a 455 nm y al aumentar progresivamente la proporción de KBr aparece un hombro en la parte más energética de la banda a 455 nm hasta que a una proporción $< 0,1$ mg H_4TPPS_4 / 150 mg KBr, el hombro inicial pasa a ser la banda predominante (424 nm). Además aparecen nuevas bandas Q entre 500 y 600 nm, cuyo valor de $\lambda_{m\acute{a}x.}$ es indicativo de la formación de las especies base-libre (Fig. II-35). El número y posición de algunas de las bandas Q observadas no pudo ser determinado a causa de la interferencia con las bandas Q de las especies

diprotonadas ($\text{zWH}_4\text{TPPS}_4$), pero la posición de estas nuevas bandas a energías menores está de acuerdo con aquellas esperadas para una porfirina en su forma base-libre. Este resultado indica que la dilución de H_nTPPS_n ($n=3, 4$) en pastillas de KBr también muestra un equilibrio ácido/base entre las especies diprotonadas y las especies base-libre.

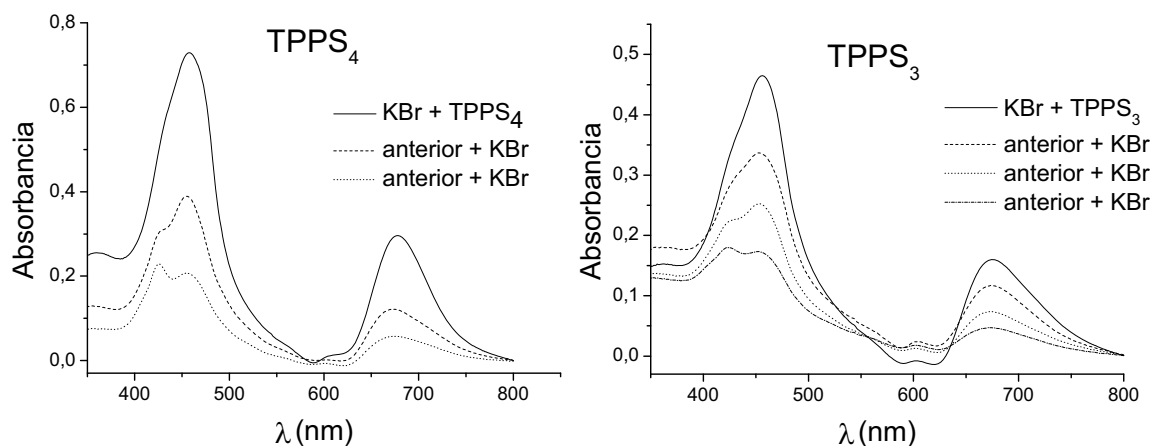


Fig. II-35 Espectros UV-Vis de pastillas de KBr de H_4TPPS_4 y H_3TPPS_3 (—) y de pastillas preparadas a partir de las anteriores aumentando la proporción de KBr.

El cambio de 455 nm a 424 nm correspondería al paso de dímero diprotonado a base libre. Sin embargo, esta banda B de la porfirina que corresponde a la especie base-libre (424 nm) presenta un desplazamiento batocrómico respecto al monómero neutro de porfirina en solución acuosa (414 nm), lo cual sugiere una agregación tipo J para la base-libre, un hecho inusual en la agregación de porfirinas en su forma de base-libre. Normalmente las porfirinas en forma de base-libre se agregan formando apilamientos π (homoasociación cara a cara) que comportan desplazamientos hipsocrómicos. Por ejemplo, pastillas de KBr de Na_4TPPS_4 muy concentradas muestran la banda B a 408 nm y al realizar una gran dilución con KBr, esta banda se desplaza hacia el valor característico en solución para la especie monomérica base-libre (414 nm). En nuestro caso, el desplazamiento batocrómico de la banda B (414 nm \rightarrow 424 nm) se justificaría por el hecho de mantener en estado sólido una geometría similar a la del dímero diprotonado.

Recientemente, otros autores¹⁴⁴⁻¹⁴⁶ han reportado espectros UV-Vis de especies porfirínicas con una banda B similar alrededor de 420-424 nm. Por ejemplo, en el caso de la Na₄TPPS₄ en micelas inversas (agua/decano/AOT)^{144,146} o lo que es lo mismo, cuando el agua se encuentra presente en poca proporción y también en heteroasociados con algunas proteínas.^{145,146}

II.2.5.2.2. Estimación de la interacción de acoplamiento excitónico para un dímero de zWH₄TPPS_n; (n= 3, 4)

La presencia de agua es necesaria para la formación de los J-agregados, lo cual implica el importante rol de los efectos hidrofóbicos en su estabilidad y su carácter de estructura del tipo cristal líquido liotrópico, es decir su estabilidad depende tanto de la porfirina como del solvente. Cuando el agua está presente por debajo de la cantidad necesaria para estabilizar el J-agregado, el zwitterión zWH₄TPPS₄ de acuerdo con los resultados anteriores está también estabilizado intermolecularmente pero no forma cadenas poliméricas largas de J-agregado. La banda a 455 nm desplazada batocrómicamente respecto de la característica para las especies monoméricas diprotonadas (434 nm) sugiere el mismo tipo de interacciones electrostáticas laterales entre porfirinas vecinas como en el caso de la J-agregación (490 nm), pero en menor extensión, lo cual puede correlacionarse con el número de unidades de porfirina que interactúan. Como veremos mediante el cálculo aproximado que se presenta a continuación, la banda de absorción a 455 nm estaría de acuerdo con la absorción esperada para un dímero.

El valor experimental de la energía correspondiente al acoplamiento excitónico del J-agregado de porfirina (cadenas lineales a partir de la homoasociación lado a lado de las unidades de porfirina zwitteriónica) es 2675 cm⁻¹ para la banda B (434 nm para el monómero diprotonado y 491 nm para el J-agregado). Este valor, según lo reportado previamente, corresponde a una cadena muy larga de J-agregado que representa el límite mayor (ΔE_{∞}) del valor

del desplazamiento en energías debido a estas interacciones entre cromóforos.^{120,147-150}

Para este tipo de sistemas de cromóforos que interactúan, normalmente se asume un modelo de acoplamiento extendido, aunque en el caso de estas porfirinas también se ha propuesto un modelo localizado.^{101,150} Como mostraremos a continuación la aplicación de ambos modelos conduce a estimaciones similares.

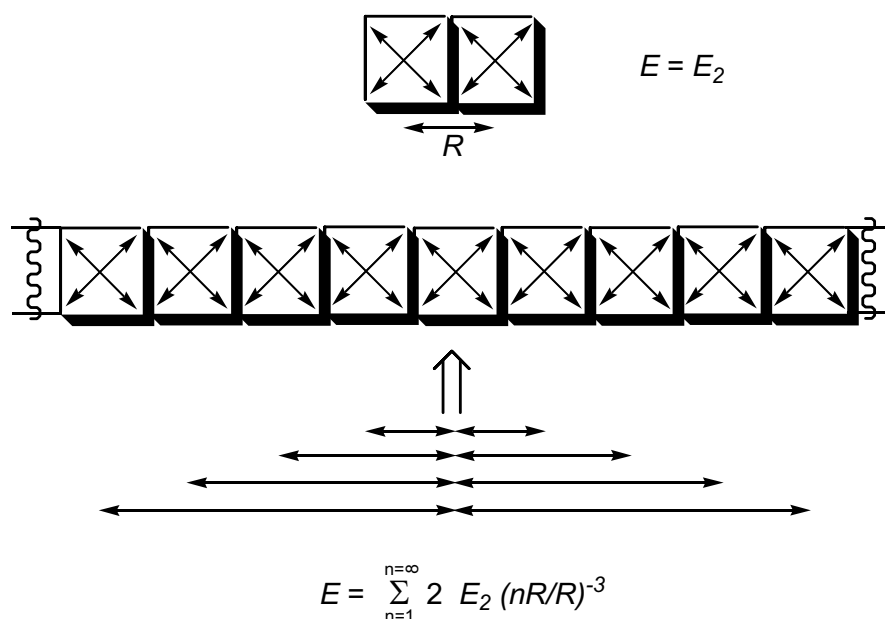
Para el modelo de acoplamiento extendido se puede definir la energía resultante de la interacción de n cromóforos (ΔE_n) como:

$$\Delta E_\infty = \Delta E_n \cos[\pi/(n+1)]$$

en el caso de $n=2$ (dímero), tenemos como consecuencia que $\Delta E_2 = 1388 \text{ cm}^{-1}$ [434 nm (monómero) \Rightarrow 461 nm (dímero)].

Para el modelo de acoplamiento localizado, las interacciones entre los diferentes cromóforos depende de la distancia ($\propto R^{-3}$) entre los modelos de transición de dipolo individuales de cada cromóforo. En el caso de las cadenas de J-agregado tenemos que $R \approx 11 \text{ \AA}$ para dos cromóforos adyacentes y en general $(n-1)R$. En este modelo cada cromóforo debería mostrar su absorción específica, pero en los casos extremos de un dímero o de una cadena infinita, ΔE debería ser el mismo para todos los cromóforos del sistema. Para un determinado cromóforo en una cadena finita, el valor de ΔE corresponde al valor resultante de las series mostradas en el Esquema II-3. Los valores límite en este caso serían $\Delta E_\infty = 2675 \text{ cm}^{-1}$ y $\Delta E_2 = 1118 \text{ cm}^{-1}$ [434 nm (monómero) \Rightarrow 456 nm (dímero)].

En definitiva, si asumimos una geometría similar para la interacción entre las unidades que conforman un J-agregado o un oligómero, la banda de absorción a 455 nm debería ser atribuida a un dímero.



Esquema II-3 Modelo de acoplamiento excitónico localizado para cromóforos de porfirina interactuando formando J-agregados.

II.2.6. Estudio por Microscopia de Campo Cercano de los ácidos sulfónicos de porfirinas *meso*-sustituidas H₄TPPS₄ y H₃TPPS₃

Para completar el estudio y caracterización de las mesofases formadas en solución por ambas porfirinas anfifílicas hemos utilizado dos de las principales Microscopias de Campo Cercano: la Microscopia de Fuerzas Atómicas (AFM) y la Microscopia de Efecto Túnel (STM), el fundamento de las cuales se describe en el anexo. El principal sustrato utilizado ha sido grafito pirolítico muy ordenado (HOPG) y hemos trabajado siempre al aire.

En el proceso de preparación de la muestra, al depositar una gota de una solución de una porfirina a una determinada concentración hemos de considerar que pueden producirse tres fenómenos:

- a) la deposición por gravedad de una muestra representativa de partículas coloidales presentes en la solución.
- b) la floculación por adsorción superficial de las partículas coloidales de J-agregados.
- c) la ordenación sobre la superficie de HOPG de las especies monoméricas o de oligómeros presentes en solución.

Estos tres mecanismos ocurrirán a velocidades distintas y los casos b) y c) es de esperar que sean muy rápidos.

II.2.6.1. Microscopia de Fuerzas Atómicas (*Atomic Force Microscopy*)

Estudios previos por AFM de soluciones de las porfirinas Na_4TPPS_4 y Na_3TPPS_3 diprotonadas y agregadas mostraron que el tamaño y forma de las partículas en la solución depende del número y patrón de distribución de sus grupos hidrofílicos e hidrofóbicos así como de las condiciones experimentales que conducen a la agregación.¹²³ El problema al utilizar las formas sódicas de estas porfirinas es que para la formación de los J-agregados es necesaria la adición de un ácido lo cual produce la formación de sales (p.ej. al utilizar H_2SO_4 se genera NaHSO_4 o Na_2SO_4). Al realizar la deposición de soluciones de estos agregados sobre grafito se produce la deposición de importantes cúmulos salinos que dificultan la observación de la muestra por AFM. No obstante en el caso de las formas de ácido sulfónico de este trabajo, las mesofases se forman sin segregar sales y por lo tanto no existen estas interferencias. Debemos recordar que al trabajar con las soluciones acuosas de los ácidos sulfónicos H_4TPPS_4 y H_3TPPS_3 , tenemos como contraiones únicamente protones y un medio de baja fuerza iónica y que la agregación depende únicamente de la concentración de porfirina. Esta concentración determina tanto el pH necesario para proporcionar la porfirina diprotonada como el desplazamiento del equilibrio hacia la formación de

J-agregados. Las soluciones recién preparadas de estas porfirinas (0,1-1 mM) mostraron una rápida homoasociación de los zwitteriones monoméricos (detectada por la banda de absorción característica de los J-agregados a 490 nm). No obstante, se observó que la agregación progresaba lentamente y de forma continua durante varias semanas o meses. Esta lenta evolución temporal de la homoasociación contrasta con la agregación prácticamente inmediata de soluciones acidificadas de las sales sódicas. Por ello la preparación de soluciones en agua pura de H_4TPPS_4 y H_3TPPS_3 ha permitido estudiar por medio de AFM la evolución de la forma de sus mesofases durante el proceso de homoasociación.

Si no se indica lo contrario las imágenes están realizadas sobre depósitos en grafito HOPG (se han utilizado también cuarzo, silicio y mica en experimentos puntuales). Se han utilizado soportes de cuarzo fundido para completar el estudio de la interacción de los ácidos sulfónicos H_4TPPS_4 y H_3TPPS_3 con superficies de este material, y se utilizaron silicio monocristalino y mica para distinguir si los depósitos de homoasociados en HOPG provenían de la solución o se formaban por inducción del sustrato en el proceso de secado. El pre-tratamiento que requieren las superficies de Si (HF) y de mica (funcionalización con aminopropilsiloxano) hacen del grafito (HOPG) el sustrato más adecuado para estos estudios de microscopia de fuerzas atómicas (para más detalle ver parte experimental).

II.2.6.1.1. AFM de depósitos de soluciones con ácidos sulfónicos de H_4TPPS_4

II.2.6.1.1.1. Estudio de depósitos de soluciones que no presentan J-agregados

Para estudiar las estructuras formadas en ausencia de homoasociados de porfirina se utilizaron soluciones de varias concentraciones obtenidas por dilución de la solución madre obtenida de la columnación de Na_4TPPS_4 (ver parte experimental). Para las deposiciones de soluciones muy diluidas ($\leq 1 \times 10^{-6}$ M) fue difícil obtener buenas imágenes debido a los problemas de enganche con la punta, que arrastra los depósitos porfirínicos con suma facilidad. En el caso de soluciones

de concentración 1×10^{-5} M, en cuyo espectro UV-Vis únicamente se detecta la especie monomérica ácida diprotonada, se obtiene y se observa con facilidad una capa completa (Fig. II-36). Esta capa presenta una altura de $0,8 \pm 0,1$ nm que coincide con la altura esperada para una porfirina en disposición planar y por tanto debe atribuirse a una monocapa de porfirina diprotonada. De esta misma placa con la monocapa de H_4TPPS_4 realizamos un análisis de microscopía confocal, pero la técnica no fue suficientemente sensible para corroborar la naturaleza de la especie que forma la monocapa. No obstante la baja fluorescencia de la especie diprotonada comparada con la de la especie neutra está de acuerdo con la presencia de la especie diprotonada, ya que seguramente no detectaríamos su fluorescencia.

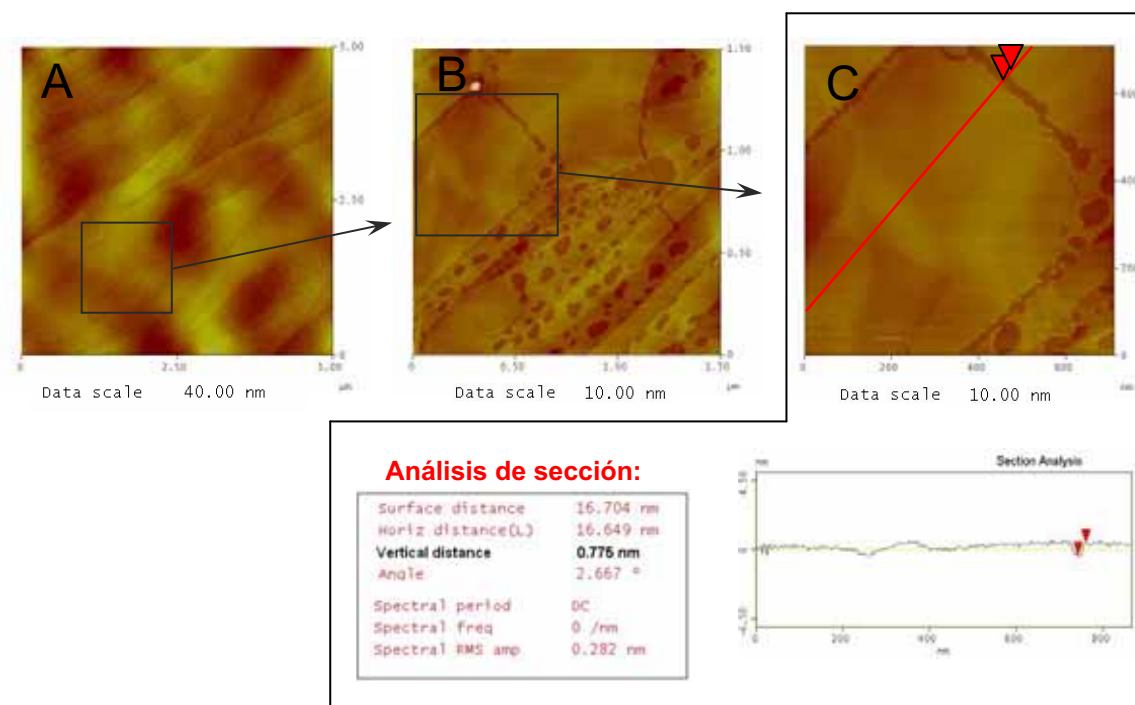


Fig. II-36 Imágenes de AFM del depósito de una solución $1,5 \times 10^{-5}$ M de H_4TPPS_4 recién preparada (tiempo de deposición 1 min): A) $5 \mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$; B) $1,5 \mu\text{m} \times 1,5 \mu\text{m}$; y C) $700 \text{ nm} \times 700 \text{ nm}$, con análisis de sección.

En algunos casos para soluciones de monómero ácido de concentraciones $\geq 1 \times 10^{-5}$ M también observamos bolas sobre la monocapa o intercaladas en ésta, que podrían corresponder a J-agregados formados por evaporación de la solución durante la preparación de la muestra (ver parte experimental). En un experimento

de deposición a diferentes tiempos de una solución $1,3 \times 10^{-5}$ M de H_4TPPS_4 (Fig. II-37), se observó que al aumentar el tiempo de deposición se favorecía la presencia de estas bolas y a un tiempo de deposición de 10 min incluso se detectaron partículas más grandes. En la Fig. II-37A se observa una terraza de grafito a mayor altura que cruza de arriba a abajo la imagen, por tanto la altura de los depósitos sobre esta terraza se debe considerar respecto a ésta misma y resulta también una altura de 0,8 nm igual a la obtenida en otras zonas de la imagen.

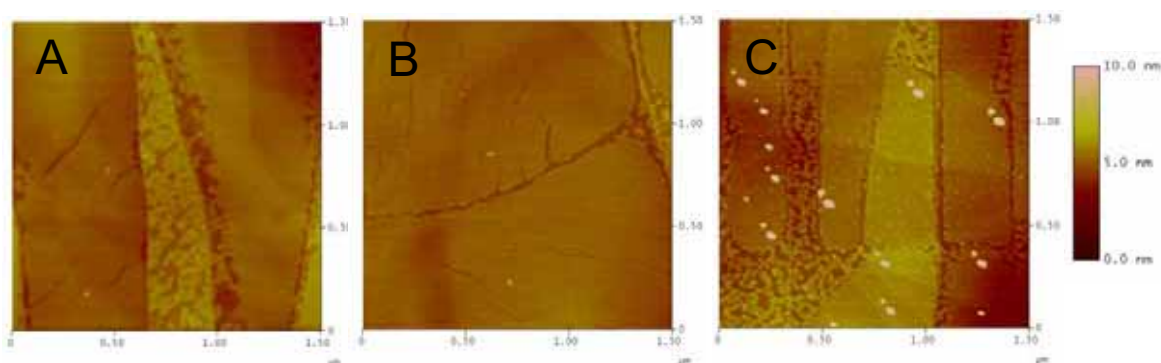


Fig. II-37 Imágenes de AFM ($1,5 \mu\text{m} \times 1,5 \mu\text{m}$) del depósito obtenido de una solución $1,3 \times 10^{-5}$ M de H_4TPPS_4 recién preparada a diferentes tiempos de deposición: A) 1 min; B) 3 min; y C) 10 min.

Otro aspecto a remarcar es cómo se ve afectado el depósito al interactuar con la punta. Hemos trabajado en modo *tapping* en vez de contacto (véase anexo) para evitar el arrastre de material orgánico blando, como ocurre con estas porfirinas. Pero aún así en algunos casos al realizar varias imágenes en una misma zona hemos comprobado cómo transformamos la estructura al realizar un escaneo en modo *tapping* de la superficie, tal como se observa en la Fig. II-38. En este experimento primero se obtuvo una imagen de $5 \mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$ (Fig. II-38A), luego ampliamos una zona de ésta de $900 \text{ nm} \times 900 \text{ nm}$ (Fig. II-38B) y la porfirina que conformaba la monocapa de altura $0,8 \pm 0,1 \text{ nm}$ (en forma de monómero ácido) se observó agregada en partículas en forma de bola de altura variable (altura media $\sim 6 \text{ nm}$, Fig. II-38C). Posteriormente en la sucesiva ampliación de $2,5 \mu\text{m} \times 2,5 \mu\text{m}$ se observó un cuadro afectado por la interacción con la punta en comparación con la imagen original.

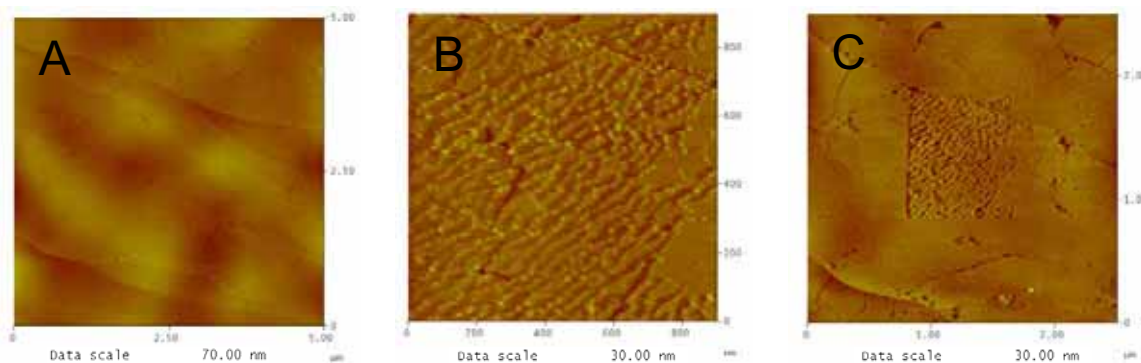


Fig. II-38 Imágenes sucesivas de AFM del depósito de una solución $1,4 \times 10^{-5}$ M de H_4TPPS_4 recién preparada (depositada durante 1 min): A) $5 \mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$; B) $900 \text{ nm} \times 900 \text{ nm}$; y C) $2,5 \mu\text{m} \times 2,5 \mu\text{m}$.

Todo ello sugiere que el desplazamiento mecánico de la punta de AFM sobre la monocapa de porfirina monomérica diprotonada o el aumento del tiempo de deposición conducen al contacto entre monómeros y a la formación de J-agregados. Estos corresponderían a las bolas de la Fig. II-37C y a las partículas no homogéneas de la Fig. II-38B,C.

II.2.6.1.1.2. Estudio de depósitos de soluciones de J-agregados

En soluciones de H_4TPPS_4 de concentración 1,0-1,6 mM recién obtenidas por cromatografía de intercambio catiónico, ya se pueden detectar J-agregados. Los depósitos a partir de estas soluciones recién preparadas mostraron por AFM mesofases en forma de cintas rectas de 35–60 nm de ancho, 300 nm – 1 μm de longitud y altura de $3,2 \pm 0,2$ nm (Fig. II-39). Estas cintas se observaron claramente para soluciones de H_4TPPS_4 de concentración superior a 5×10^{-4} M. El estudio de los depósitos de soluciones de $H_4TPPS_4 \sim 1 \times 10^{-4}$ M por AFM mostró que las estructuras en forma de cinta se observaban en muy pocos casos.

En la preparación de estas muestras (ver parte experimental) se utilizaron tiempos de deposición variables (1 s – 10 min) observando que a mayor tiempo se depositan más cintas sobre la superficie de grafito (HOPG), lo cual indica que se encuentran ya presentes en la solución. En otros sustratos: mica, Si y cuarzo, también se pudo observar este mismo tipo de estructuras.

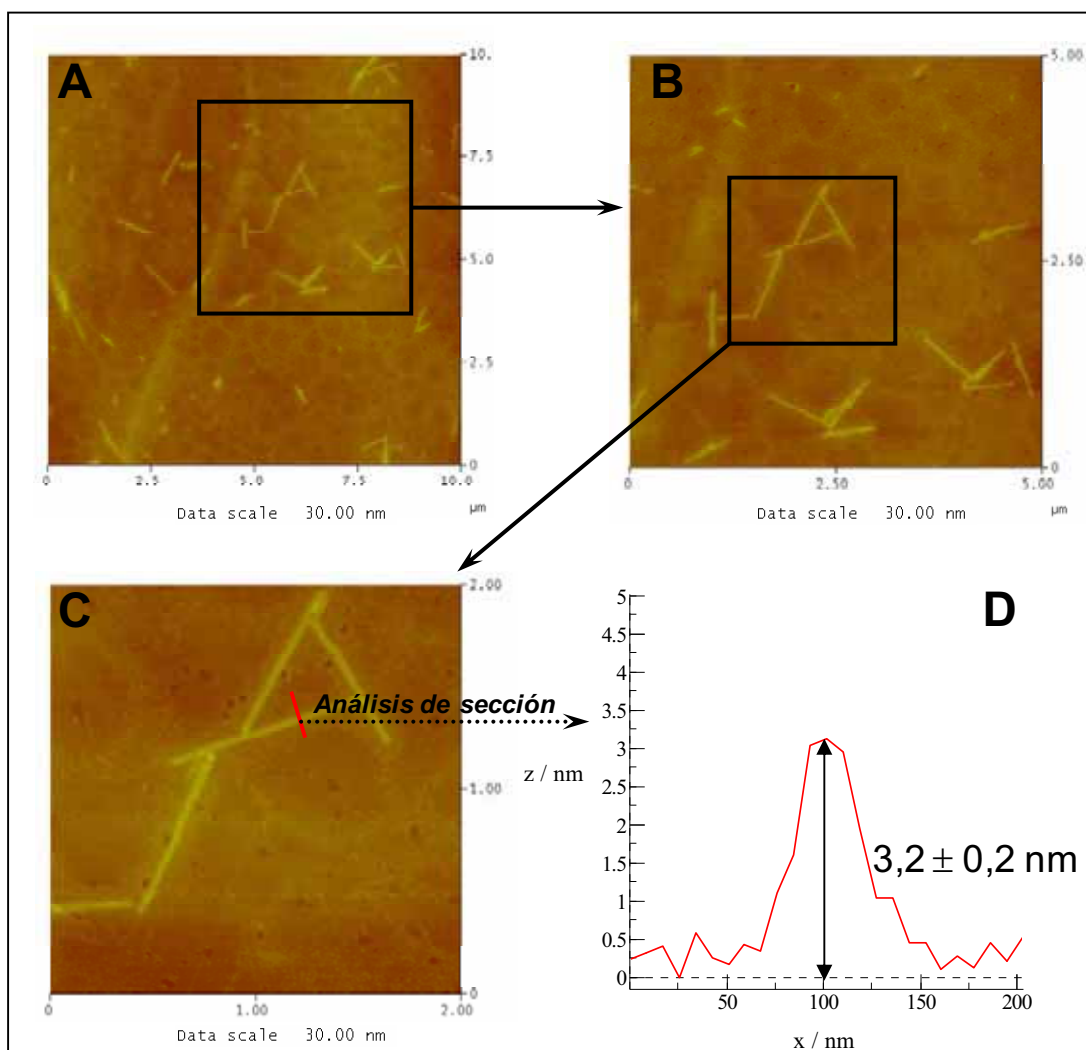


Fig. II-39 Imágenes de AFM (topografía) del depósito de una solución 1,6 mM de H_4TPPS_4 recién obtenida (tiempo de deposición 1 min): A) 10 μm x 10 μm; B) 5 μm x 5 μm; C) 2 μm x 2 μm; y D) análisis de sección de una de las cintas de la imagen C.

La espectroscopia UV-Vis mostró que la proporción de J-agregado aumentaba lentamente con el tiempo. El seguimiento de esta agregación por AFM mostró un aumento del número de partículas tipo cinta y de su longitud, pero su anchura era aproximadamente del mismo orden (35–60 nm) y la altura mantenía un valor uniforme de $3,2 \pm 0,2$ nm. Al cabo de dos meses se observó que este patrón de crecimiento se mantenía, llegando las partículas a longitudes de más de 10 μm, pero conservando el intervalo de anchuras original (35–60 nm) y la altura

constante de $3,2 \pm 0,2$ nm (Fig. II-40). Por debajo de estas partículas de J-agregados también se detectó una capa (Fig. II-41) de $0,8 \pm 0,1$ nm de altura sobre el sustrato de grafito, con las mismas características que la monocapa obtenida de las soluciones monoméricas de porfirina (sin J-agregados). Esto se confirmó porque las soluciones agregadas muy envejecidas, es decir con menos proporción de porfirina monomérica, mostraron esta capa más incompleta. Como se ha explicado anteriormente la agregación de estas porfirinas evoluciona lentamente con la consiguiente desaparición de monómero ácido en favor de la especie homoasociada.

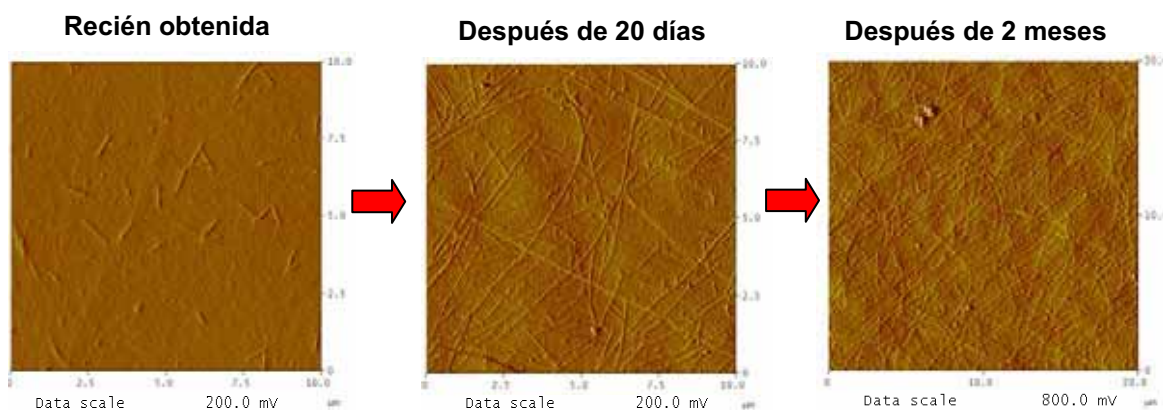


Fig. II-40 Imágenes de AFM (amplitud) del depósito de una solución 1,6 mM de H_4TPPS_4 (depositada durante 1 min): A) recién obtenida ($10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$); B) 20 días después ($10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$); y C) después de 2 meses ($20 \mu\text{m} \times 20 \mu\text{m}$).

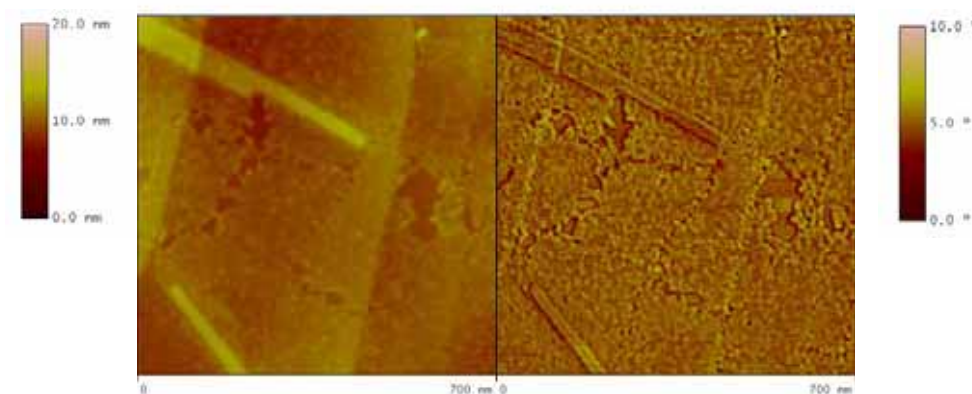


Fig. II-41 Imagen de AFM ($700 \text{ nm} \times 700 \text{ nm}$) del depósito de una solución 1,3 mM de H_4TPPS_4 recién obtenida (depositada durante 1 min). A la izquierda la imagen de altura y a la derecha la imagen de fase.*

* Para más información acerca del tipo de imágenes: altura, amplitud y fase, véase anexo.

En algunos casos se observan partículas con forma de bola, sobre la monocapa o intercaladas en ésta, de 2 – 15 nm de diámetro y con alturas respecto a la monocapa de 0,5 a 4 nm (Fig. II-42). Estas bolas corresponderían a J-agregados pero con distinta forma de mesofase puesto que en ausencia de J-agregados (UV-Vis) este tipo de partículas no se observan.

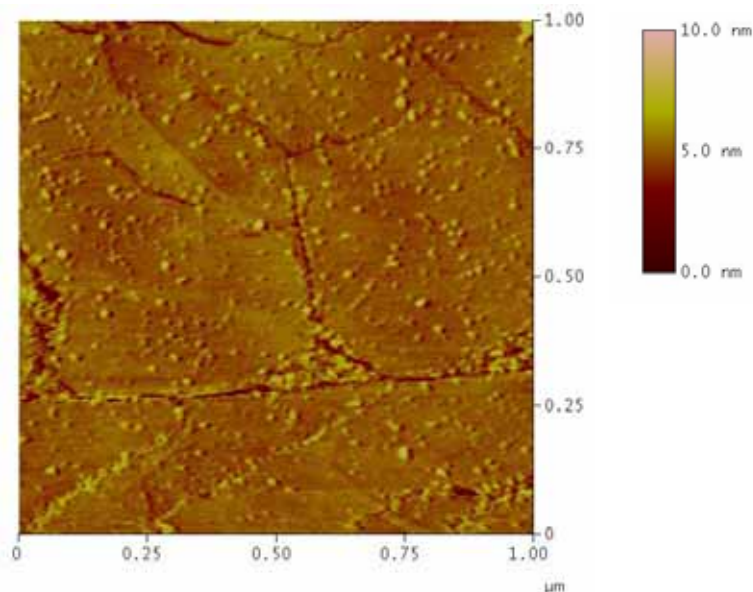


Fig. II-42 Imagen de AFM ($1 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$) del depósito de una solución $1,4 \times 10^{-4} \text{ M}$ de H_4TPPS_4 recién preparada (depositada durante 1 min).

II.2.6.1.2. AFM de depósitos de soluciones con ácidos sulfónicos de H_3TPPS_3

II.2.6.1.2.1. Estudio de depósitos de soluciones que no presentan J-agregados

Utilizamos diferentes diluciones en agua de la solución madre recién obtenida de columna para estudiar las estructuras formadas en ausencia de homoasociados de porfirina. Al igual que se observó para la H_4TPPS_4 , en las deposiciones de soluciones muy diluidas ($\leq 1 \times 10^{-6} \text{ M}$) es muy difícil obtener buenas imágenes: al no haber suficiente materia depositada en la superficie, la punta arrastra los depósitos porfirínicos con suma facilidad.

El espectro UV-Vis de soluciones de H_3TPPS_3 de concentración 1×10^{-5} M recién preparadas mostró que la especie monomérica ácida diprotonada era la mayoritaria pero se observó un hombro correspondiente a la especie monomérica base-libre, en relación 1 : 2,5–3 (base-libre:diprotonada). En los depósitos realizados con estas soluciones se obtiene la formación de una capa completa. Esta capa presenta una altura de $0,8 \pm 0,1$ nm, similar a la formada con los depósitos de H_4TPPS_4 , que atribuimos a una monocapa de porfirina diprotonada. A igual concentración y tiempo de deposición la monocapa formada por la H_3TPPS_3 es más completa que la de H_4TPPS_4 y en algunos casos para poder realizar medidas de altura hemos realizado un barrido en *modo contacto* (véase anexo) para realizar un agujero en la capa (Fig. II-43).

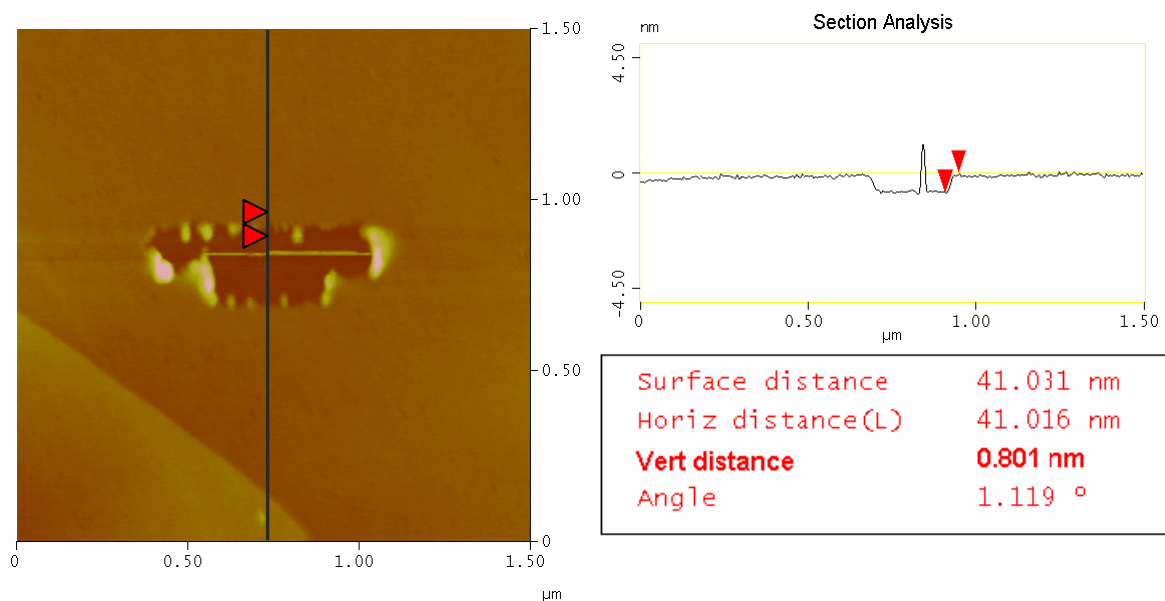


Fig. II-43 Imagen de AFM ($1,5 \mu\text{m} \times 1,5 \mu\text{m}$) con análisis de sección del depósito de una solución 1×10^{-5} M de H_3TPPS_3 recién preparada (tiempo de deposición 1 min) tras haber realizado un barrido de $300 \text{ nm} \times 300 \text{ nm}$ en modo contacto.

Como sucede para la H_4TPPS_4 , el desplazamiento mecánico de la punta de AFM sobre la monocapa de porfirina diprotonada al realizar varias imágenes en

una misma zona (de 900 x 900 nm o menos) o simplemente al realizar una única imagen (en determinadas condiciones de barrido), condujo a la destrucción de la monocapa de monómero y a la formación de J-agregados. Mediante el análisis por Microscopia Confocal no se pudo confirmar qué especie formaba la monocapa de H_3TPPS_3 . El aumento del tiempo de deposición también condujo a la obtención de partículas de J-agregados de altura variable pero mayor que la de la capa (Fig. II-44). En conclusión, en ausencia de homoasociados los depósitos obtenidos a partir de soluciones de H_4TPPS_4 y H_3TPPS_3 son muy similares.

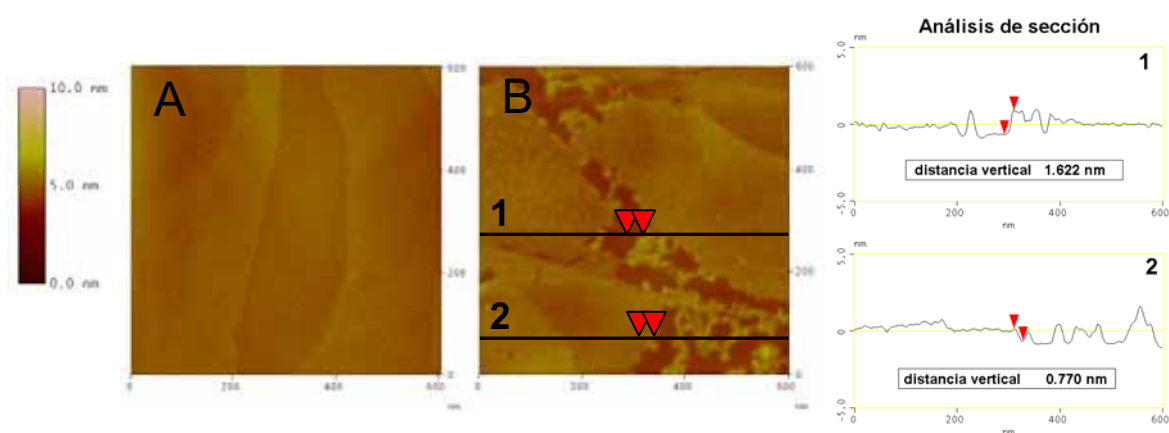


Fig. II-44 Imágenes de AFM (600 nm x 600 nm) del depósito obtenido de una solución 1×10^{-5} M de H_3TPPS_3 recién preparada a diferentes tiempos de deposición: A) 1 min; y B) 10 min, con análisis de sección.

II.2.6.1.2.2. Estudio de depósitos de soluciones de J-agregados

Las soluciones recién obtenidas de H_3TPPS_3 (1,0-1,6 mM) a través de la columna de intercambio catiónico (ver parte experimental) con presencia de J-agregado, mostraron unas cintas rectas (similares a las obtenidas con H_4TPPS_4) de 35 nm – 80 nm de ancho; 200 nm – 800 nm de longitud; y una altura de $3,2 \pm 0,1$ nm. En este caso se observaron cintas con asiduidad a partir de soluciones de concentración $> 5 \times 10^{-5}$ M. En las soluciones más concentradas (del orden de 1×10^{-3} M) estas cintas se encuentran por lo general adheridas unas con otras formando cúmulos (Fig. II-45).

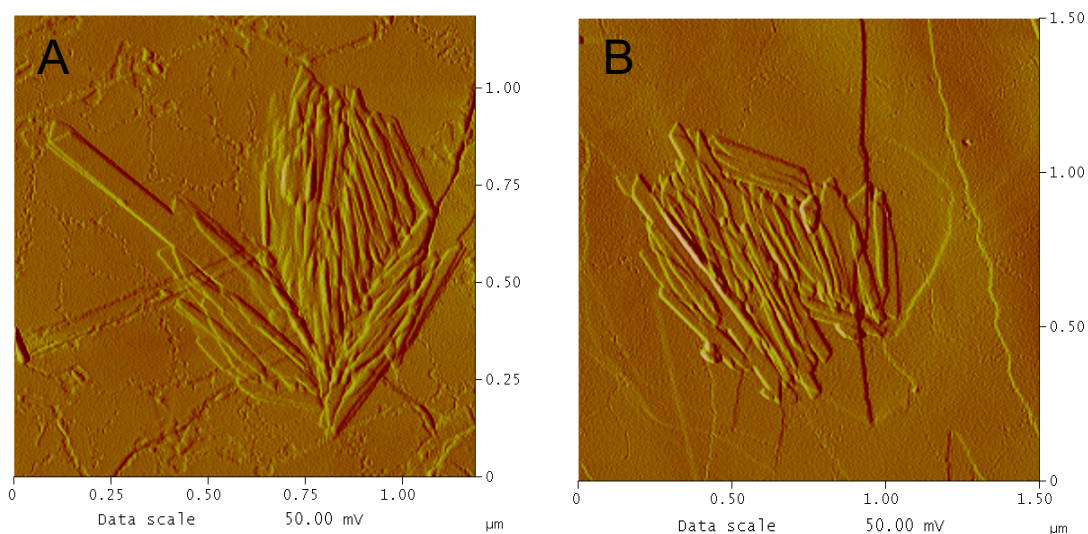


Fig. II-45 Imágenes de AFM en modo amplitud (véase anexo) del depósito de una solución de H_3TPPS_3 recién preparada (depositada durante 1 min): A) $1,4 \times 10^{-3} M$ ($1,2 \mu m \times 1,2 \mu m$); y B) $1,3 \times 10^{-3} M$ ($1,5 \mu m \times 1,5 \mu m$).

Además en los depósitos de soluciones recién preparadas de H_3TPPS_3 con agregado ($1 \times 10^{-3} M - 1 \times 10^{-4} M$) se observaron unas planchas planas (Fig. II-46) de altura constante: $1,2 \pm 0,1 nm$ y tamaño variable, las cuales en algunos casos mostraban indicios de plegamiento o bien de crecimiento de una segunda capa (Fig. II-46C).

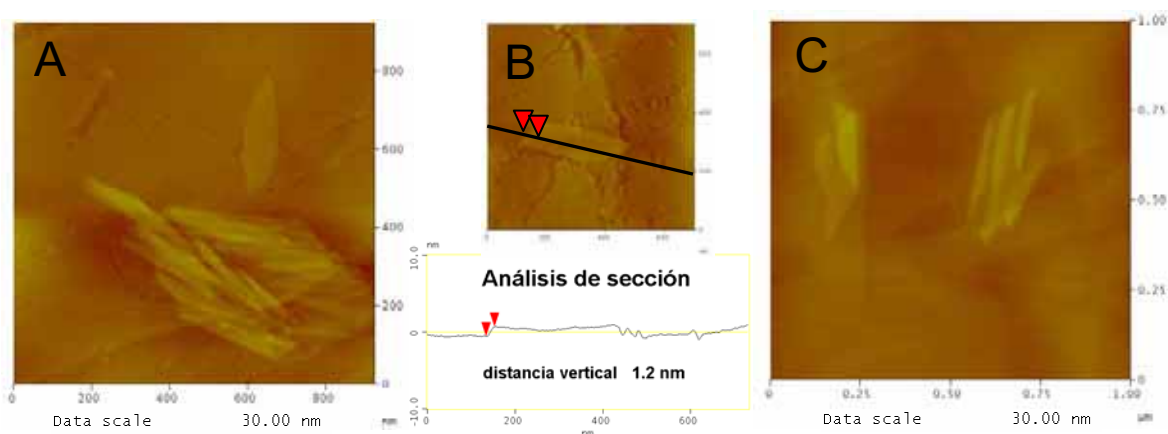


Fig. II-46 Imágenes de AFM del depósito de una solución de H_3TPPS_3 recién preparada (depositada durante 1 min): A) $1,3 \times 10^{-3} M$ ($925 nm \times 925 nm$); B) $9 \times 10^{-4} M$ ($700 nm \times 700 nm$) con análisis de sección; y C) $1,8 \times 10^{-4} M$ ($1 \mu m \times 1 \mu m$).

En depósitos de soluciones de J-agregado se detectó también la presencia de una monocapa estructurada en dominios (Fig. II-46B) con una altura de $0,8 \pm 0,1$ nm, que atribuimos a la porfirina monomérica diprotonada. La solución se agrega lentamente y va desapareciendo el monómero ácido en favor de la especie homoasociada. Las soluciones agregadas muy envejecidas, es decir con menos proporción de porfirina monomérica diprotonada, mostraron esta capa pero incompleta, con un mayor número de agujeros en comparación con las recién obtenidas, lo cual está de acuerdo con la hipótesis de que esta monocapa es de monómero diprotonado.

Si comparamos los depósitos de soluciones de H_3TPPS_3 con J-agregados a diferentes concentraciones observamos un menor número de partículas de homoasociado (cintas y planchas) a menor concentración. Las planchas que hemos visto anteriormente probablemente son la mesofase precursora de las estructuras tipo cinta puesto que sólo se han observado en los depósitos de soluciones recién preparadas y de soluciones obtenidas desde hacía una semana y conservadas en el congelador. En algunos casos los bordes y esquinas de las cintas mostraron un grosor de 1,5 nm lo cual indica claramente la naturaleza de bicapa de estas partículas (véanse los análisis de sección de la Fig. II-47).

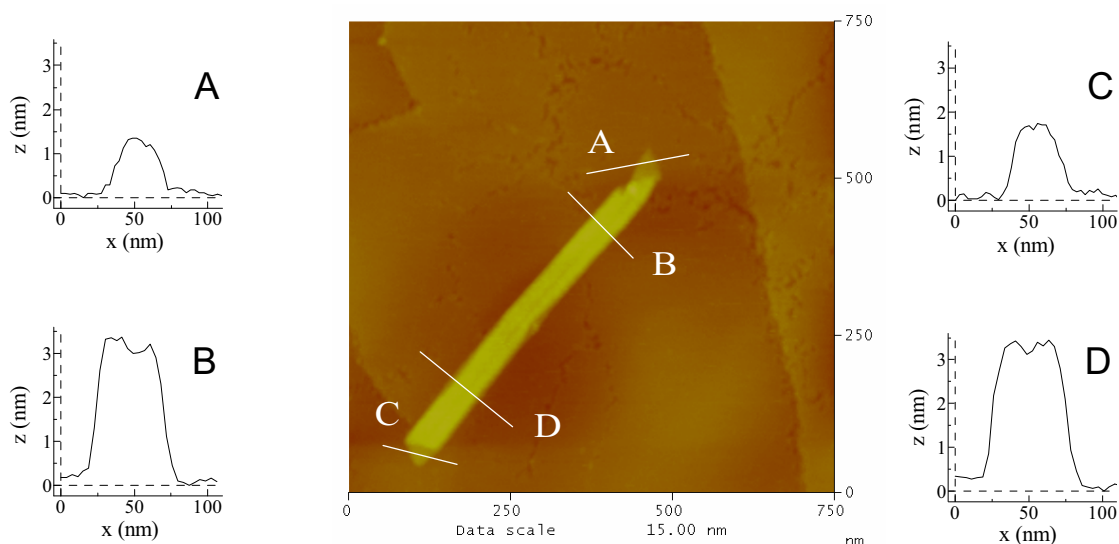


Fig. II-47 Imagen de AFM (900 nm x 900 nm) del depósito de una solución 1,3 mM de H_3TPPS_3 recién preparada (depositada durante 1 min). Los análisis de sección realizados confirman la naturaleza de bicapa de esta mesofase.

Un grosor de 1,5 – 1,6 nm estaría de acuerdo con una molécula inclinada 45°. Esto teniendo en cuenta una longitud total de aproximadamente 2,2 nm (1,95 nm para la molécula de porfirina más las capas de agua necesarias para solvatar los protones actuando como contraiones de los grupos sulfonato). Considerando que las cintas o cintas de H_3TPPS_3 y H_4TPPS_4 presentan una misma altura de 3,2 nm probablemente las cintas corresponden a una estructura de bicapa. Este modelo de bicapa implica una región central de carácter iónico para la H_4TPPS_4 (Fig. II-48A) y una región central hidrofóbica para la H_3TPPS_3 (Fig. II-48B). Los datos experimentales no permiten inferir si las dos monocapas son oblicuas (Fig. II-48A) o bien paralelas (Fig. II-48B).

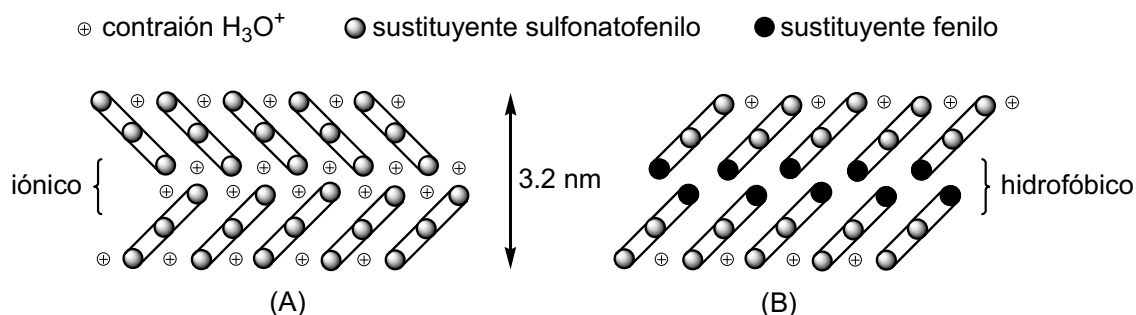


Fig. II-48 Modelo de bicapa para las mesofases de: (A) H_4TPPS_4 ; y (B) H_3TPPS_3 . El eje de agregación viene de detrás hacia el frente y forma un ángulo aproximadamente de 70° con el plano del papel. La inclinación relativa de las dos capas puede ser la misma o alternada.

II.2.6.1.2.2.1. Evolución de soluciones de H_3TPPS_3 con J-agregados

El incremento de la agregación con el tiempo observado por UV-Vis correspondió a un aumento de la longitud de las partículas tipo cinta de H_3TPPS_3 pero se mantuvieron la anchura (35 nm - 80 nm) y la altura (3,2 nm) constantes. Estas cintas posteriormente se plegaron espontáneamente (Fig. II-49).

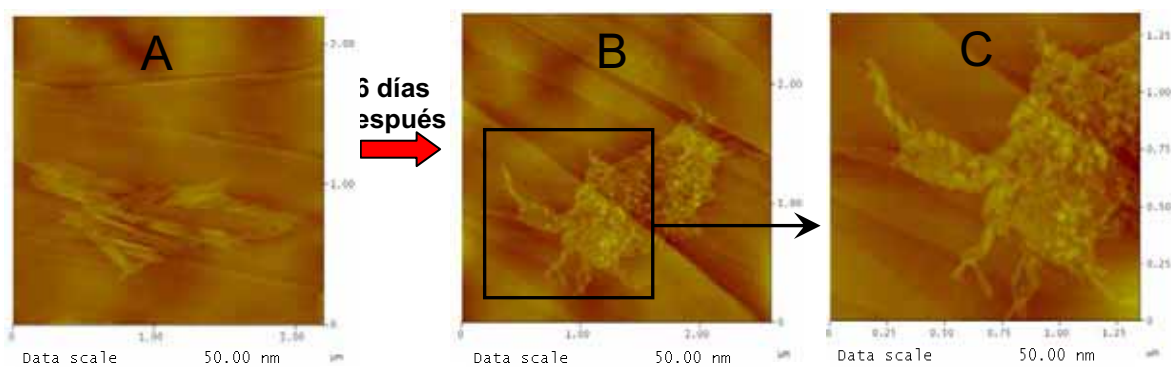


Fig. II-49 Imágenes de AFM del depósito de una solución de H_3TPPS_3 9×10^{-4} M (depositada durante 1 min): A) un día después de su preparación ($2,2 \mu\text{m} \times 2,2 \mu\text{m}$); B) una semana después de su preparación ($2,6 \mu\text{m} \times 2,6 \mu\text{m}$); y C) ampliación de una zona de B ($1,35 \mu\text{m} \times 1,35 \mu\text{m}$).

Hemos estudiado la evolución de este proceso de plegamiento en distintas condiciones experimentales, los resultados obtenidos se explican a continuación.

A) Influencia de la concentración

En soluciones recién preparadas de H_3TPPS_3 de concentración $\sim 1 \times 10^{-3}$ M se observó que mayoritariamente las cintas se agrupaban en cúmulos y se detectaban pocas cintas aisladas. En soluciones recién preparadas de concentración $\sim 1 \times 10^{-4}$ M las cintas estaban dispersas en su mayoría y sólo algunas agrupadas en cúmulos. Se procedió a estudiar cómo afectaba el grado de concentración en la cinética de plegamiento. Para ello se estudiaron los depósitos de soluciones de concentración $\sim 1 \times 10^{-3}$ M y $\sim 1 \times 10^{-4}$ M de soluciones recién preparadas y a diferentes tiempos, siguiendo por AFM la evolución en la forma de las mesofases.

En los depósitos de soluciones más concentradas ($\sim 1 \times 10^{-3}$ M) se retardó el plegamiento con respecto a las más diluidas ($\sim 1 \times 10^{-4}$ M). Las cintas provenientes de soluciones más concentradas tardaron más de 3-4 días en comenzar a plegarse e incluso después de 5 días aún observamos alguna cinta recta, pero al cabo de una semana todas las cintas presentan plegamiento helicoidal (Fig. II-50).

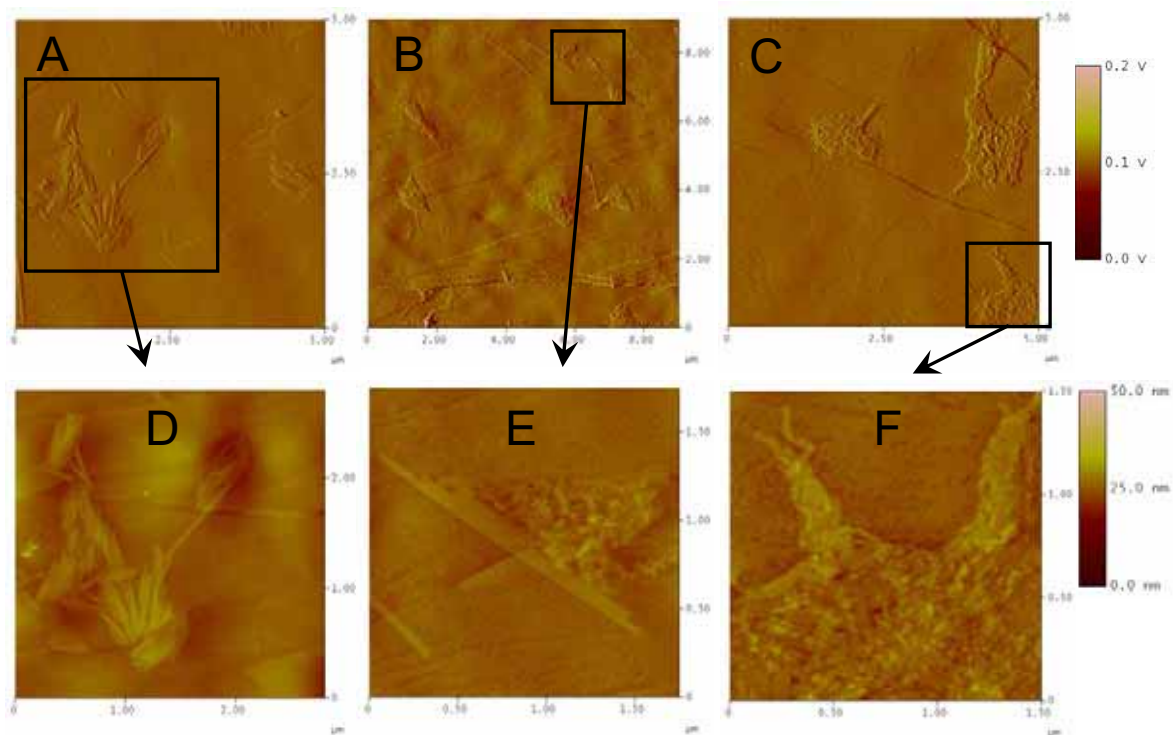


Fig. II-50 Imágenes de AFM del depósito (durante 1 min) de una solución de H_3TPPS_3 1×10^{-3} M: A) un día después de su preparación ($5 \mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$); B) 5 días después ($9 \mu\text{m} \times 9 \mu\text{m}$); y C) una semana después. D) Ampliación de A ($2,8 \mu\text{m} \times 2,8 \mu\text{m}$); E) Ampliación de B ($1,75 \mu\text{m} \times 1,75 \mu\text{m}$); y F) Ampliación de C ($1,5 \mu\text{m} \times 1,5 \mu\text{m}$). A, B y C están realizadas en modo amplitud y D, E y F en modo altura.

En cambio para las soluciones de H_3TPPS_3 ($\sim 1 \times 10^{-4}$ M) al cabo de 24 h ya se detectó el inicio del plegamiento de las cintas y después de 2-3 días todas las cintas presentaban plegamiento (Fig. II-51).

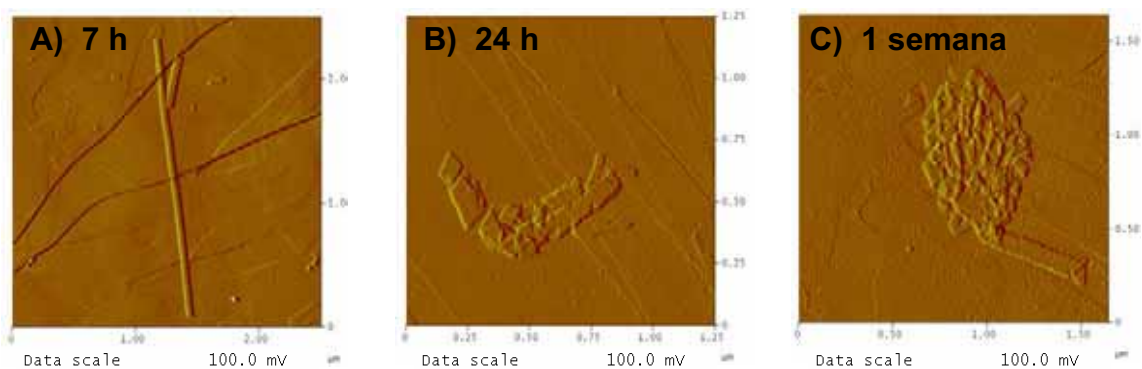


Fig. II-51 Imágenes de AFM de amplitud del depósito (durante 1 min) de una solución de H_3TPPS_3 $1,3 \times 10^{-4}$ M: A) 7 h después de su preparación ($2,5 \mu\text{m} \times 2,5 \mu\text{m}$); B) 24 h después ($1,25 \mu\text{m} \times 1,25 \mu\text{m}$); y C) una semana después ($1,6 \mu\text{m} \times 1,6 \mu\text{m}$).

Además del crecimiento de las cintas, descrito anteriormente, observamos que cuando éstas estaban formando cúmulos ($\text{H}_3\text{TPPS}_3 \sim 1 \times 10^{-3} \text{ M}$, Fig. II-50) la interacción entre ellas dificultó el plegamiento, el cual se retardó varios días y al cabo de una semana observamos que todas las cintas estaban plegadas entrelazándose las unas con las otras. En cambio cuando las cintas estaban más dispersas ($\text{H}_3\text{TPPS}_3 \sim 1 \times 10^{-4} \text{ M}$, Fig. II-51) observamos que primero se plegaron individualmente o en pequeños grupos y con el paso del tiempo también acabaron entrelazándose entre ellas formando cúmulos más grandes. De esto se deduce que la formación de cúmulos no hace tan necesario el plegamiento. Como se discute más adelante, el plegamiento tendría lugar con la finalidad de disminuir el volumen de interacción de los agregados con la especie monomérica diprotonada y pequeños oligómeros presentes en solución.

B) Influencia de la temperatura

En las soluciones conservadas en la nevera el plegamiento se observó mucho más tarde con respecto a las soluciones conservadas a temperatura ambiente. Tres alícuotas de una misma solución de H_3TPPS_3 $9 \times 10^{-4} \text{ M}$ fueron conservadas a temperatura ambiente, a 6°C (nevera) y a -25°C (congelador) y fuimos siguiendo la forma de las mesofases por AFM (Fig. II-52).

Observamos, aparte de la esperada mayor presencia de partículas de agregado a baja temperatura, como ésta es un factor clave de cara al control del plegamiento de las cintas de H_3TPPS_3 . Después de diversas semanas las soluciones conservadas a menor temperatura también mostraron plegamiento de las cintas, por lo tanto las bajas temperaturas retardaron el proceso de plegamiento pero no llegaron a evitarlo.

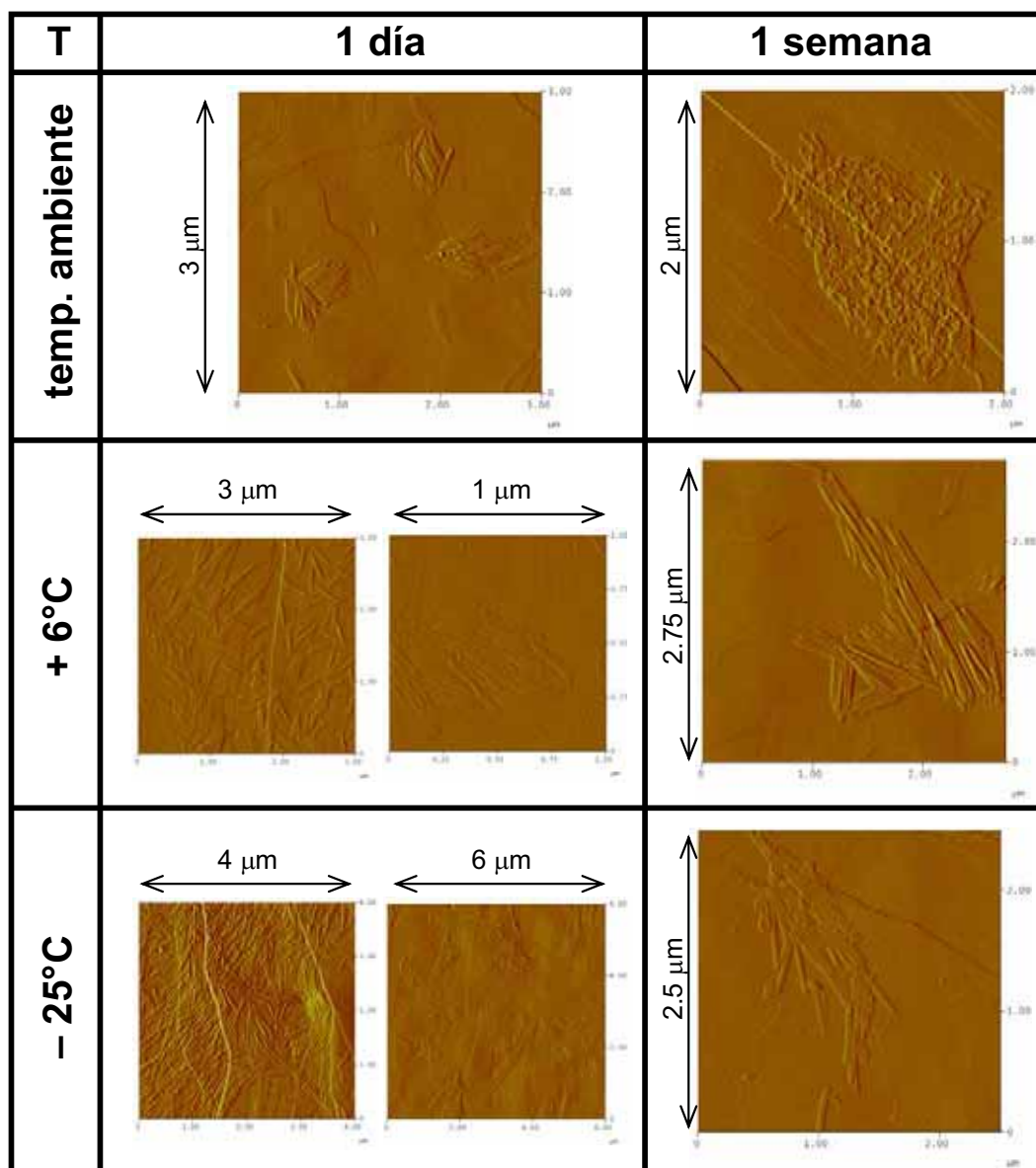


Fig. II-52 Imágenes de AFM de amplitud (todas a escala 0-200 mV) del depósito de alicuotas de una solución 9×10^{-4} M de H_3TPPS_3 (depositada durante 1 min) después de un día y una semana tras haber sido conservadas a temperatura ambiente, a 6°C y a -25°C .

II.2.6.1.3. Comparación de los depósitos obtenidos para H_3TPPS_3 y H_4TPPS_4 con los de sus respectivas sales sódicas acidificadas

Si comparamos las imágenes de los agregados de H_4TPPS_4 con los obtenidos a partir de su sal sódica (Na_4TPPS_4) en solución acuosa ácida (p. ej. HCl , H_2SO_4),¹²³ estos presentan la misma apariencia: cintas de longitud y anchura similares a las de los homoasociados de H_4TPPS_4 , pero con la diferencia

remarcable de que su altura es mayor (5 – 15 nm). No obstante estas alturas son múltiplos de ~ 1,5 nm, lo cual sugiere un carácter de multicapa para estos agregados obtenidos a partir de las porfirinas en forma de sal sódica y de dicapa en el caso de los obtenidos a partir de sus ácidos sulfónicos.

Los agregados de la sal sódica Na_3TPPS_3 en solución acuosa ácida (p. ej. HCl , H_2SO_4),¹²³ presentaron una apariencia similar a la del estado final de los homoasociados de H_3TPPS_3 : cintas plegadas de longitud variable (1-3 μm), con una anchura de 40-120 nm y un grosor constante de $3,2 \pm 0,1$ nm. El plegamiento de las cintas tiene lugar cada 50 nm o 120 nm, pero cuando la anchura de la cinta plegada (helicoidal) es constante el plegamiento exhibe un paso de rosca (*pitch*) regular. La longitud del paso de rosca disminuye ligeramente al aumentar la anchura. Generalmente se detectan las cintas plegadas agrupadas en cúmulos, que pueden incluir partículas de forma irregular. En el caso de la Na_3TPPS_3 al acidificar una solución de base libre e inmediatamente estudiar su depósito por AFM también se llegaron a observar cintas rectas, como en los estados iniciales de agregación de la H_3TPPS_3 , de: 0,7-1,5 μm de longitud, 10-40 nm de anchura y una altura constante y uniforme de $2,3 \pm 0,1$ nm (diferente respecto a la altura de las cintas de H_3TPPS_3).

II.2.6.2. Microscopia de Efecto Túnel (*Scanning Tunneling Microscopy*)

Para completar el estudio y caracterización de las monocapas formadas a partir de depósitos de soluciones de las sulfonatoporfirinas anfifílicas H_4TPPS_4 y H_3TPPS_3 utilizando como sustrato grafito pirolítico muy ordenado (HOPG), hemos utilizado la microscopia de Efecto Túnel (STM) trabajando siempre al aire. Esta técnica como se explica en el anexo se aplica a muestras conductoras, que no es el caso de estas porfirinas, pero al detectar por AFM una monocapa de altura constante y estructurada en dominios decidimos probar esta técnica, ya que la poca altura de la monocapa podría permitir el paso de corriente túnel, lo que nos permitiría obtener imágenes de STM con resolución atómica.

Realizamos medidas de STM sobre placas de grafito (HOPG) recién clivado y sobre placas de grafito (HOPG) recubiertas de una monocapa de H_3TPPS_3 y otras de una monocapa de H_4TPPS_4 . Las monocapas de los ácidos sulfónicos de estas porfirinas (H_4TPPS_4 y H_3TPPS_3) se prepararon a partir de soluciones recién preparadas de concentración $\sim 1 \times 10^{-5}$ M. Estas soluciones a su vez se prepararon partir de una solución $\sim 1 \times 10^{-3}$ M envejecida un día y utilizando tiempos de deposición entre 1-3 min. Siempre, antes de la medidas de STM, comprobamos por AFM si obteníamos una monocapa lo bastante completa para ambas porfirinas anfifílicas.

En ciertas zonas muy difíciles de detectar de algunas imágenes, tanto del grafito considerado como blanco como del grafito con porfirina depositada, observamos una serie de bolas con un patrón periódico diferente al de la red del sustrato grafitico (Fig. II-53). Estas bolas se encontraron raramente, formando pequeños dominios alrededor de los escalones del grafito.

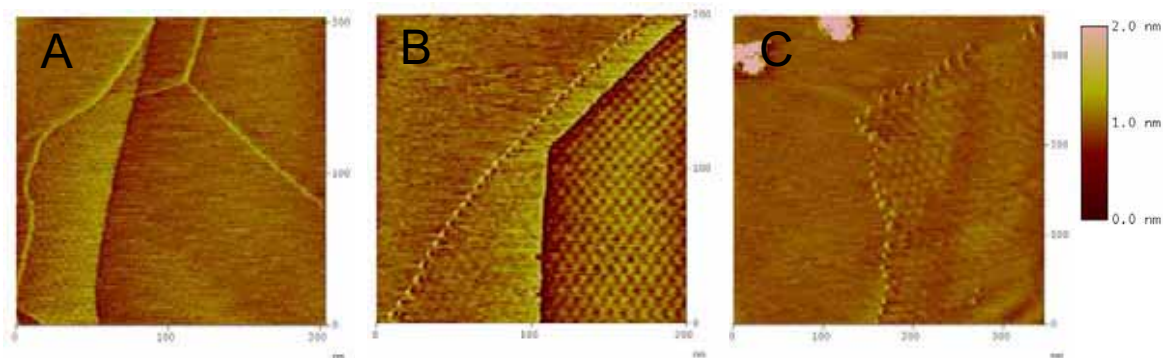


Fig. II-53 Imágenes de STM de A) el depósito durante 3 min de una solución de H_3TPPS_3 $1,4 \times 10^{-5}$ M, (200 nm x 200 nm); B) el depósito durante 3 min de una solución de H_3TPPS_3 $1,1 \times 10^{-5}$ M (200 nm x 200 nm); y C) el grafito tal cual, sin deposición alguna (345 nm x 345 nm).

Para el cálculo de las distancias se consideró como referencia el valor de periodicidad (R) del grafito: $R_{HOPG} = 2,46 \text{ \AA}$.¹⁵¹ Para ello tomamos varias imágenes de la red grafitica, realizamos la transformada de Fourier de estas imágenes e hicimos una media de las periodicidades observadas para el HOPG, determinando así el patrón de periodicidad experimental y por tanto el factor de corrección a aplicar (Fig. II-54).

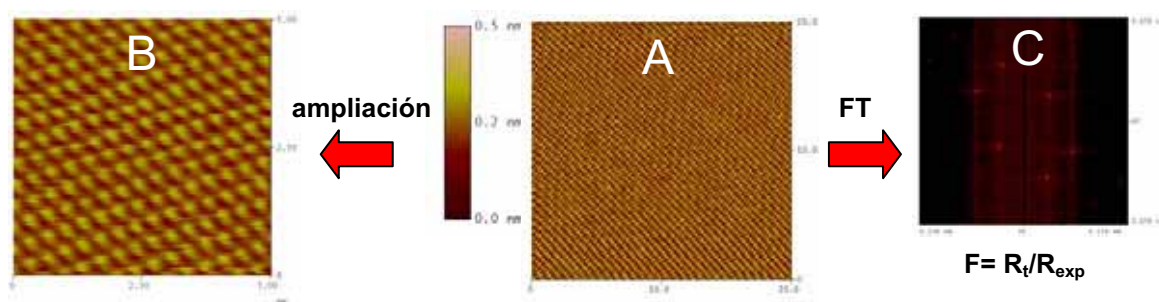


Fig. II-54 A) Imagen de STM del grafito pirolítico utilizado como sustrato sin deposición alguna (20 nm x 20 nm); B) ampliación de la imagen anterior a igual escala (5 nm x 5 nm); y C) resultado de la transformada de Fourier de la imagen A.

Teniendo en cuenta este factor de corrección observamos que el patrón de periodicidad de las bolas variaba considerablemente obteniendo diferentes valores (corregidos): 2,2 nm; 3,8 nm; 7,5 nm; y 13,2 nm entre muestras diferentes e incluso entre distintas zonas de una misma muestra. En algunas imágenes (Fig. II-55) podemos ver los dos patrones (el correspondiente al carbono grafitico y el de las bolas) superpuestos.

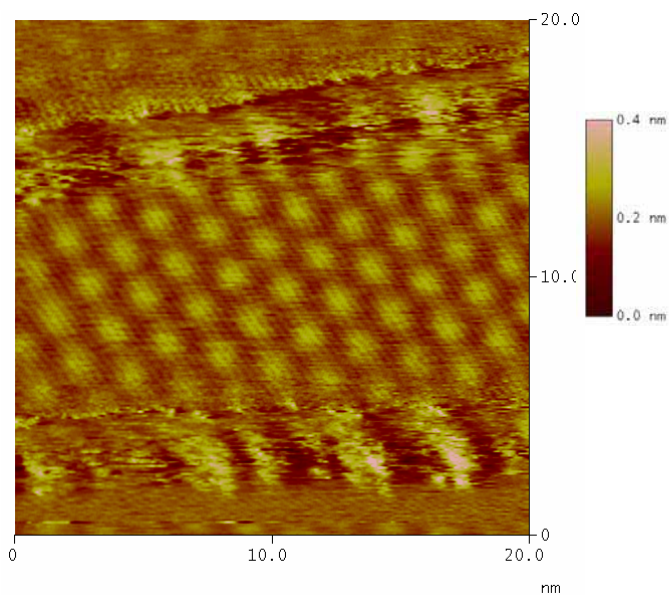


Fig. II-55 Imagen de STM (20 nm x 20 nm) del grafito HOPG.

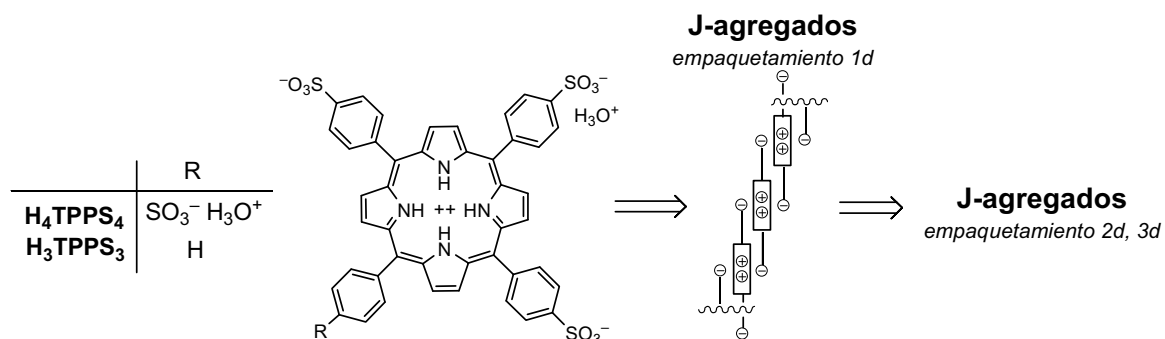
En los primeros experimentos realizados utilizábamos diferentes tipos de grafito (de diferentes casas comerciales y de diferentes calidades, ver parte experimental) para el blanco y las muestras ya que el grafito debe presentar el

mismo patrón siempre y la corrección se debe al calibrado del escáner. Pero observamos que el patrón de bolas no correspondía al depósito porfirínico sino al propio sustrato grafitico y únicamente aparecía con una determinada placa de HOPG de peor calidad (MicroMasch ZYB), es decir, con más defectos. Algunos autores describen patrones similares a los observados (bolas de periodicidad variable) para el propio grafito y atribuyen estas superestructuras del HOPG a la presencia de dislocaciones entre planos del sustrato,¹⁵² aunque actualmente todo son especulaciones respecto al origen de estos patrones anómalos para el grafito.¹⁵¹

En conclusión, la Microscopia de Efecto Túnel no ha permitido resolver la estructura de las monocapas de H_3TPPS_3 y H_4TPPS_4 .

II.2.7. Selección del signo de quiralidad en J-agregados de *meso*-4-sulfonatofenilporfirinas

Las porfirinas aniónicas anfifílicas (Na_nTPPS_n y H_nTPPS_n ; $n= 3, 4$) estudiadas son moléculas aquirales. Estas porfirinas en su forma diprotonada se homoasocian formando J-agregados y en este proceso tiene lugar una ruptura espontánea de la simetría especular (Esquema II-4).^{110,120,123,153} En el caso de los homoasociados de Na_3TPPS_3 se ha demostrado estadísticamente que el vórtice de agitación puede seleccionar el signo de quiralidad resultante, lo cual no ocurre con los agregados de Na_4TPPS_4 .^{110,153}



Esquema II-4 Fórmulas constitucionales de H_nTPPS_n ($n= 3, 4$) y estructura de los J-agregados monodimensionales.

A pesar de que se han descrito resultados similares en otros sistemas supramoleculares,¹⁵⁴ el origen y causa de este efecto singular todavía no se comprenden.^{155,156}

El estudio del signo de quiralidad de los homoasociados de estas porfirinas anfifílicas se realiza mediante medidas de dicroísmo circular de sus soluciones. En estudios previos¹²² se observó que soluciones agregadas de estas porfirinas (H_nTPPS_n ; $n= 3, 4$) presentan señales de dicroísmo circular, centradas en las tres bandas de absorción características de los agregados: ~ 490 nm (transición B_J); ~ 707 nm (transición Q_J); y ~ 420 nm (transición B_H). La señal más intensa corresponde a la transición B de los J-agregados (banda B_J), que es la que también presenta la mayor absorción. Estas bandas son generalmente bisignadas pero pueden presentar intensidades distintas para las dos bandas (Fig. II-56) según las condiciones experimentales en las que se obtienen los J-agregados.

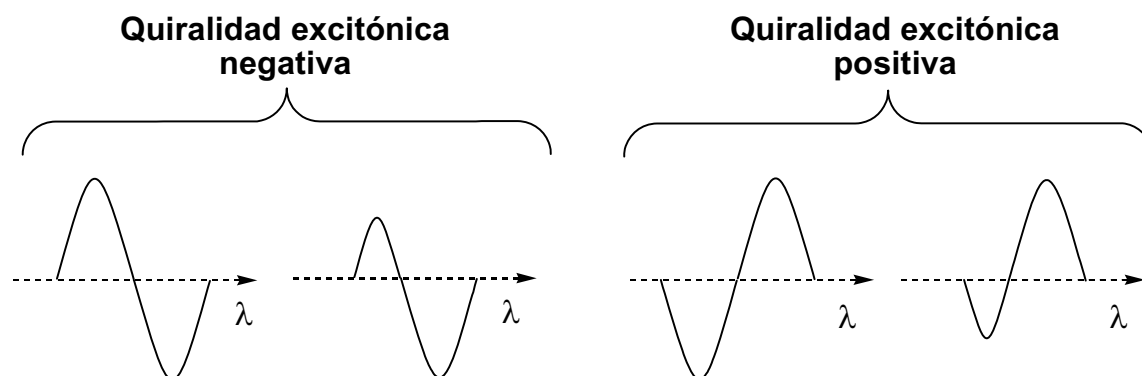


Fig. II-56 Ejemplos del aspecto de las bandas de DC en las soluciones agregadas de meso-sulfonatofenilporfirinas.

El signo de quiralidad y la forma que presentan las bandas de homoasociación J (B_J , Q_J) y H (B_H) en una misma muestra son siempre las mismas, aunque en un número reducido de casos se pueden llegar a observar señales de quiralidad diferentes para las bandas B_J y B_H . En estos casos las soluciones evolucionan dando el mismo tipo de señal para las dos absorciones (la quiralidad obtenida siempre es la correspondiente a la banda B_J y es el signo de la banda B_H la que cambia).

Como se ha indicado antes, resultados previos en el caso de la Na_3TPPS_3 mostraron estadísticamente que el vórtice de agitación puede seleccionar el signo de quiralidad resultante.^{110,153} La correlación entre el sentido de agitación y el signo de quiralidad de los espectros de dicroísmo circular sólo se pudo obtener a partir de la rotaevaporación de soluciones de porfirina muy diluidas. Se partía de una solución con toda la porfirina en su forma monomérica diprotonada y al ir concentrando la solución comenzaban a formarse J-agregados, cuyo signo de quiralidad se correlacionaba con el sentido de giro del matraz en el rotaevaporador. En nuestro caso se han realizado los experimentos por agitación magnética de soluciones recién preparadas de H_3TPPS_3 , a una concentración constante de porfirina realizando el seguimiento simultáneo por UV-Vis, DC y AFM. También se ha estudiado la influencia de la agitación en soluciones de H_4TPPS_4 en condiciones similares.

II.2.7.1. Procedimiento general de las pruebas de agitación

Se utilizaron soluciones de H_4TPPS_4 y $\text{H}_3\text{TPPS}_3 \sim 1 \times 10^{-3}$ M recién obtenidas por cromatografía de intercambio catiónico a partir de sus respectivas sales sódicas (ver parte experimental). También se han realizado experimentos de agitación de soluciones de $\text{H}_3\text{TPPS}_3 \sim 1 \times 10^{-4}$ M preparadas por dilución directa de las soluciones más concentradas.

Se separaron tres partes alícuotas de 1 mL de la solución y se trasvasaron a un tubo plástico de microcentrífuga de 2 mL; 3,5 cm de altura; 0,9 cm de diámetro interno; y de base cónica casi plana (0,2 cm de altura). Un tubo se dejó en reposo y los otros dos se agitaron a un número de revoluciones (rpm) determinado, uno en sentido horario (*clockwise*, CW) y otro en sentido antihorario (*anticlockwise*, ACW). Para agitar utilizamos una barra magnética de 5 mm de longitud y 2 mm de diámetro y un agitador magnético que permite seleccionar el sentido de giro (ver parte experimental). El sentido de agitación CW o ACW se define desde la parte superior a la parte inferior del tubo de plástico, tal como se indica en la Fig. II-57:

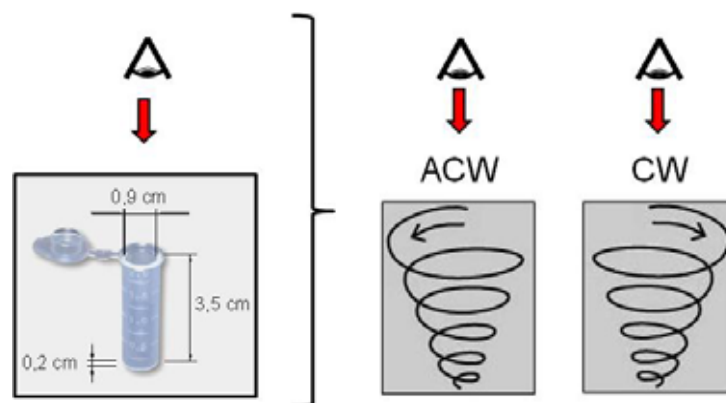


Fig. II-57 Vista de referencia para definir ambos sentidos posibles de agitación: horario (clockwise, CW) y antihorario (anticlockwise, ACW).

II.2.7.2. Efecto de la agitación en soluciones agregadas de H_4TPPS_4

En el estudio previo realizado por AFM de soluciones de H_4TPPS_4 $\sim 1 \times 10^{-3}$ M, obtenidas directamente de la columna de intercambio catiónico, se observó que los agregados forman largas cintas de longitud variable (300 nm – 1 μ m) con una distribución de anchuras relativamente pequeña (35 nm – 60 nm) y de altura constante ($3,2 \pm 0,2$ nm). Estas estructuras supramoleculares crecieron en longitud con el tiempo pero no en anchura, mantuvieron su forma recta y no se plegaron (Fig. II-58) ni después de dos meses (véase Fig. II-40; pág. 92).

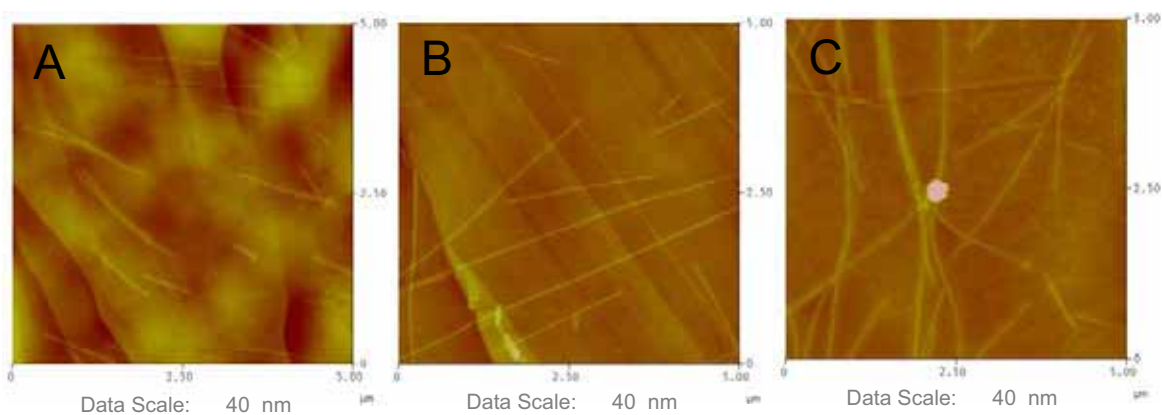


Fig. II-58 Imágenes de AFM (5 μ m x 5 μ m) de los depósitos (durante 1 min) de una solución $1,6 \times 10^{-3}$ M de H_4TPPS_4 : A) recién obtenida; B) 24 después; y C) una semana después.

Para soluciones de $H_4TPPS_4 \sim 1 \times 10^{-3} \text{ M}$, obtenidas directamente de la columna de intercambio catiónico, las medidas de DC de soluciones no son fiables debido a que hemos de utilizar cubetas de camino óptico estrecho ($l= 0,01 \text{ cm}$). Las contribuciones dicroicas lineales podrían interferir en las medidas de dicroísmo circular debido a la posible ordenación vertical de los J-agregados.

Como se ha descrito anteriormente, en el estudio por AFM de los depósitos de soluciones de $H_4TPPS_4 \sim 1 \times 10^{-4} \text{ M}$, las estructuras en forma de cinta atribuibles a los homoasociados de H_4TPPS_4 se observan en muy pocos casos. Por tanto, para los experimentos de agitación utilizamos soluciones de H_4TPPS_4 entre $1,0 \text{ mM} - 1,5 \text{ mM}$ recién obtenidas de la columna de intercambio catiónico. Realizamos un experimento de agitación en estas soluciones siguiendo el procedimiento general y comparamos por AFM (Fig. II-59) la evolución en el tiempo de la solución en reposo y de los depósitos obtenidos a partir de estas soluciones agitadas.

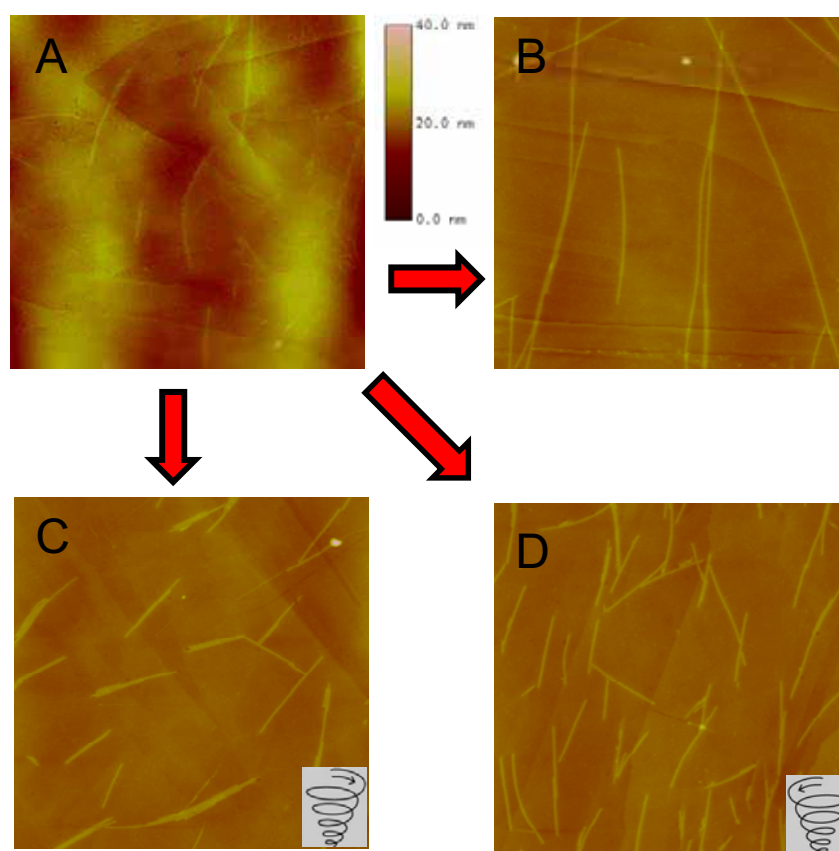


Fig. II-59 Imágenes de AFM ($5 \mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$) de los depósitos (durante 1 min) de una solución $1,6 \times 10^{-3} \text{ M}$ de H_4TPPS_4 : A) recién preparada; B) en reposo, después de una semana; C) agitando a 1600 rpm en sentido horario después de una semana; y D) agitando a 1600 rpm en sentido antihorario durante una semana.

Las imágenes de AFM de depósitos de soluciones agitadas indican claramente la ruptura de las cintas, obteniendo longitudes finales bastante regulares ($1,5 \pm 0,5 \mu\text{m}$), debido a las fuerzas generadas en la agitación. El hecho de obtener longitudes de partícula similares al agitar, indica la existencia de un módulo mecánico de fractura para estos agregados. Esto no está en desacuerdo con el modelo de bicapa iónica (véase Fig. II-48; pág. 98) propuesto para los J-agregados de H_4TPPS_4 .

El espectro de DC de soluciones agregadas H_4TPPS_4 presentó siempre el mismo tipo de señal (bisignada positiva) para los J-agregados.

II.2.7.3. Efecto de la agitación en soluciones agregadas de H_3TPPS_3

II.2.7.3.1. Soluciones de $\text{H}_3\text{TPPS}_3 \sim 1 \times 10^{-3} \text{ M}$

En el estudio por AFM previo de los depósitos de estas soluciones obtenidas directamente de la columna de intercambio, hemos visto que inicialmente se observan cúmulos o apilamientos de cintas rectas. Después de 3-4 días se observa el inicio del plegamiento de estas cintas rectas para formar cintas plegadas helicoidalmente y al cabo de una semana todas las cintas del cúmulo se han plegado (Fig. II-60).

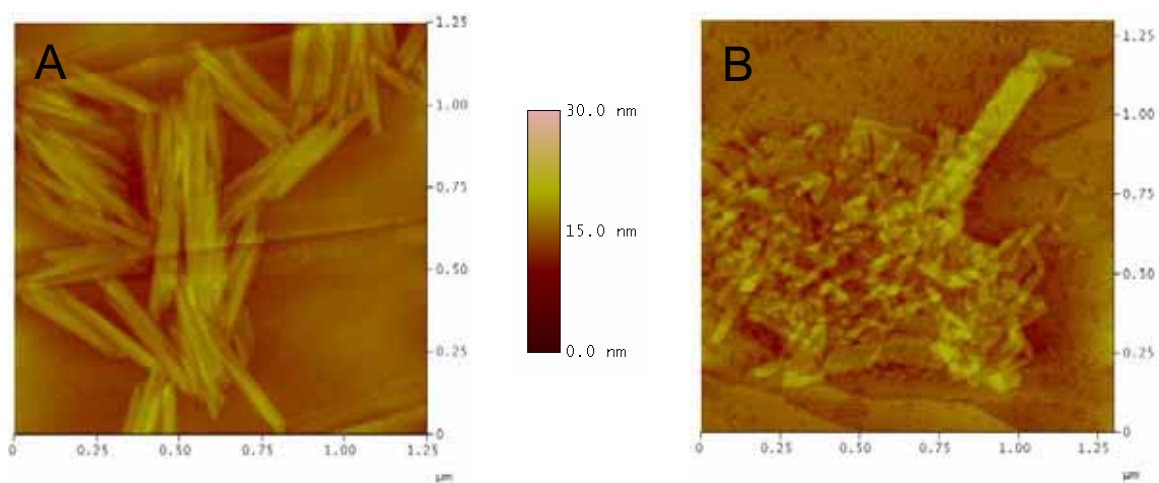


Fig. II-60 Imágenes de AFM del depósito de una solución de H_3TPPS_3 $1,3 \times 10^{-3} \text{ M}$ (depositada durante 1 min): A) 24 h después de su preparación ($1,25 \mu\text{m} \times 1,25 \mu\text{m}$); B) una semana después de su preparación ($1,3 \mu\text{m} \times 1,3 \mu\text{m}$).

Realizamos experimentos de agitación siguiendo el procedimiento general en sentido horario (CW) y antihorario (ACW) de estas soluciones y comparamos por AFM los depósitos obtenidos para las soluciones agitadas respecto a los de la solución en reposo. Observamos cómo el flujo de agitación ayudó a dispersar los cúmulos (Fig. II-61), y se observaron plegamientos en los dos sentidos en todas las muestras.

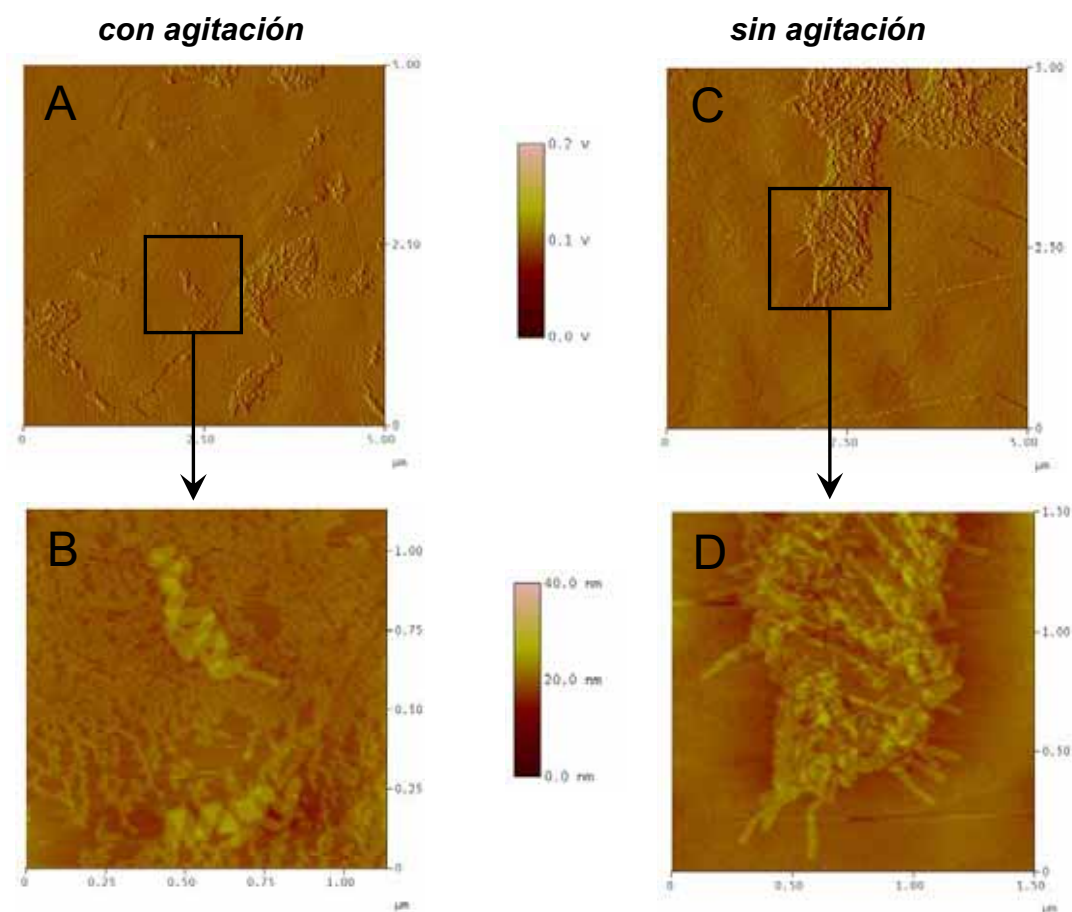


Fig. II-61 Imágenes de AFM del depósito de una solución de H_3TPPS_3 $1,3 \times 10^{-3}$ M envejecida durante una semana (depositada durante 1 min): A) agitada con núcleo magnético ($5 \mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$); B) ampliación de A ($1,2 \mu\text{m} \times 1,2 \mu\text{m}$); C) sin agitar ($5 \mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$); D) Ampliación de B ($1,5 \mu\text{m} \times 1,5 \mu\text{m}$). A y B están realizadas en modo amplitud y C y D en modo altura.

La conclusión de los resultados de estos experimentos es que las soluciones $H_3TPPS_3 \sim 1 \times 10^{-3}$ M no son adecuadas para estudiar la influencia de la agitación en la señal de dicroísmo circular obtenida para los agregados por ser demasiado concentradas (caso análogo al reportado previamente para soluciones de H_4TPPS_4

$\sim 1 \times 10^{-3}$ M). Las interacciones partícula-partícula podrían interferir con las interacciones de la partícula con el flujo de la solución. Por ello procedimos a estudiar el efecto de agitación en soluciones más diluidas ($\sim 1 \times 10^{-4}$ M) de esta porfirina.

II.2.7.3.2. Soluciones de $H_3TPPS_3 \sim 1 \times 10^{-4}$ M

Tal como hemos indicado anteriormente (apdo. II.2.6.1.2.2.), las soluciones agregadas de $H_3TPPS_3 \sim 1 \times 10^{-4}$ M recién preparadas muestran cintas rectas. Estas cintas en soluciones en reposo al cabo de 24 h empiezan a plegarse y después de 2-3 días todas ellas muestran plegamientos (Fig. II-62).

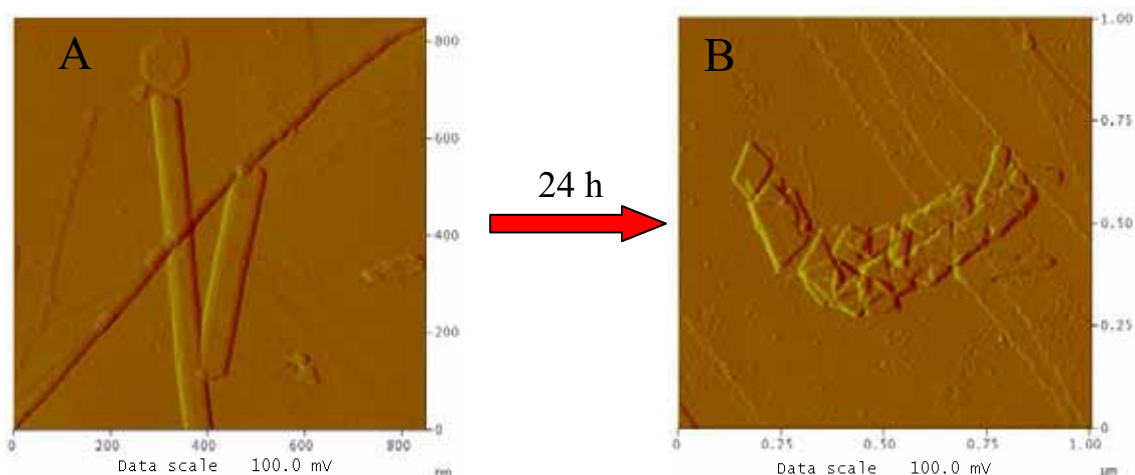


Fig. II-62 Imágenes de AFM del depósito de una solución de H_3TPPS_3 $1,3 \times 10^{-4}$ M (depositada durante 1 min): A) 7 h después de su preparación (850 nm x 850 nm); B) 24 h después de su preparación (1 μ m x 1 μ m).

Para las medidas de dicroísmo circular de soluciones de $H_3TPPS_3 \sim 1 \times 10^{-4}$ M se utilizaron cubetas de camino óptico $l = 0,1$ cm. Se evitó usar cubetas de camino óptico más estrecho ($l \leq 0,01$ cm) con el fin de minimizar las contribuciones dicroicas lineales en la medida de dicroísmo circular.

Las medidas de dicroísmo circular de soluciones $\sim 1 \times 10^{-4}$ M de H_3TPPS_3 recién obtenidas (Fig. II-63A) mostró una banda bisignada de quiralidad excitónica positiva centrada en la banda de máxima absorción de los J-agregados a ~ 490 nm. En algunos casos inicialmente aparecía una banda única o bien una banda bisignada poco definida, pero con el tiempo siempre se obtuvo una clara señal bisignada de quiralidad excitónica positiva (Fig. II-63B). Realizamos también los espectros de dicroísmo lineal de estas mismas soluciones (Fig. II-63) comprobando que no había contribuciones importantes de dicroísmo lineal que pudiesen interferir en la señal de dicroísmo circular detectada.

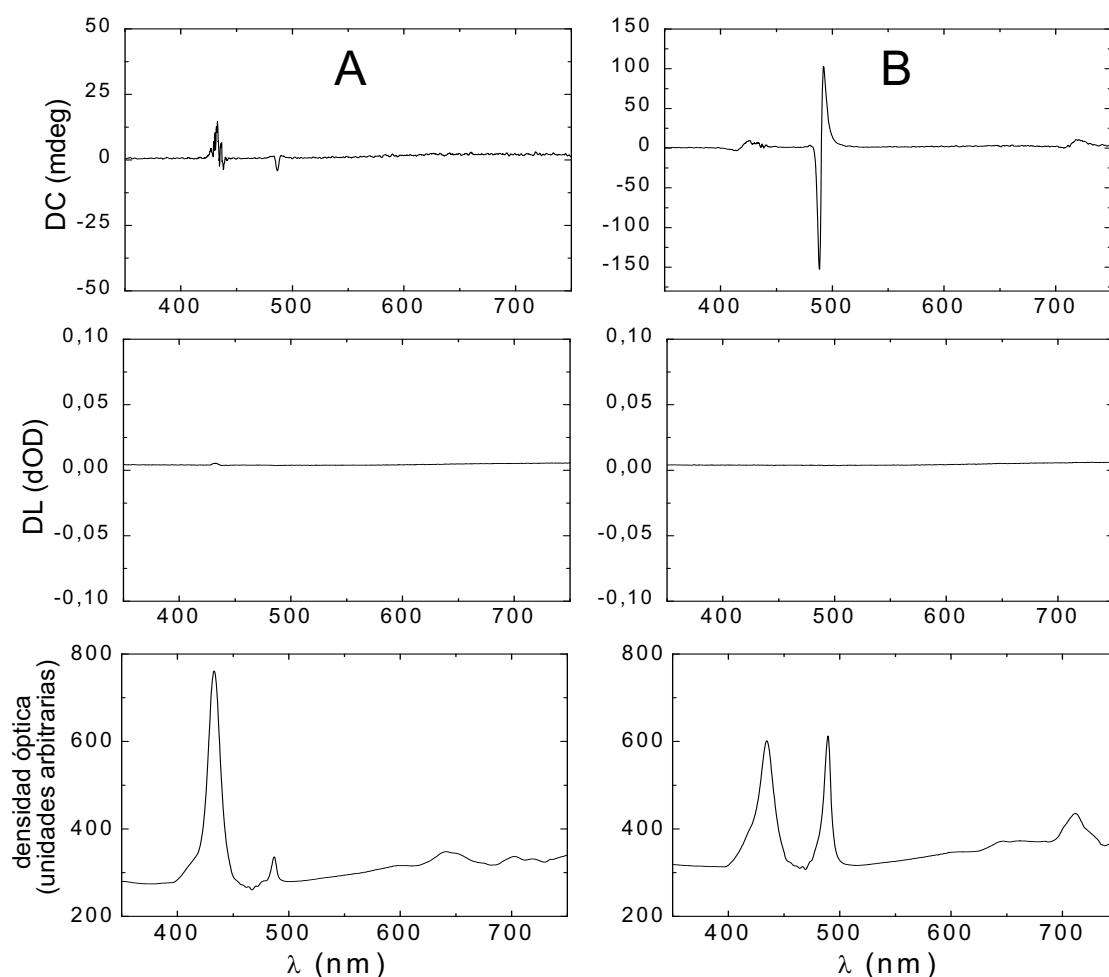


Fig. II-63 Espectros de DC, DL y densidad óptica de una solución 1×10^{-4} M de H_3TPPS_3 : A) recién preparada; y B) la misma solución 24 h después, en reposo (sin agitación).

Al agitar las soluciones $\sim 1 \times 10^{-4}$ M de H_3TPPS_3 a 1600 rpm, en ambos sentidos: horario (CW) y antihorario (ACW), se detectó un aumento de la agregación respecto al comportamiento de estas mismas soluciones en reposo (Fig. II-64).

El estudio por dicroísmo circular mostró una buena correlación entre el sentido de agitación utilizado (CW o ACW) y el signo de quiralidad excitónica de la señal obtenida para los J-agregados a ~ 490 nm. En la Fig. II-65 se muestran las medidas de densidad óptica, DC y DL de las tres soluciones de H_3TPPS_3 $1,1 \times 10^{-4}$ M preparadas según el procedimiento general de agitación descrito anteriormente. Las medidas de DL mostraron que no existían contribuciones lineales significativas y los espectros de densidad óptica mostraron que la agregación no evolucionó en la misma extensión en las tres soluciones. Pero el resultado más significativo es que los J-agregados de la solución agitada en sentido horario proporcionaron una señal bisignada de quiralidad excitónica positiva ($-/0/+$) y en cambio la misma solución agitada en sentido antihorario proporcionó una señal bisignada de quiralidad excitónica negativa ($+/0/-$).

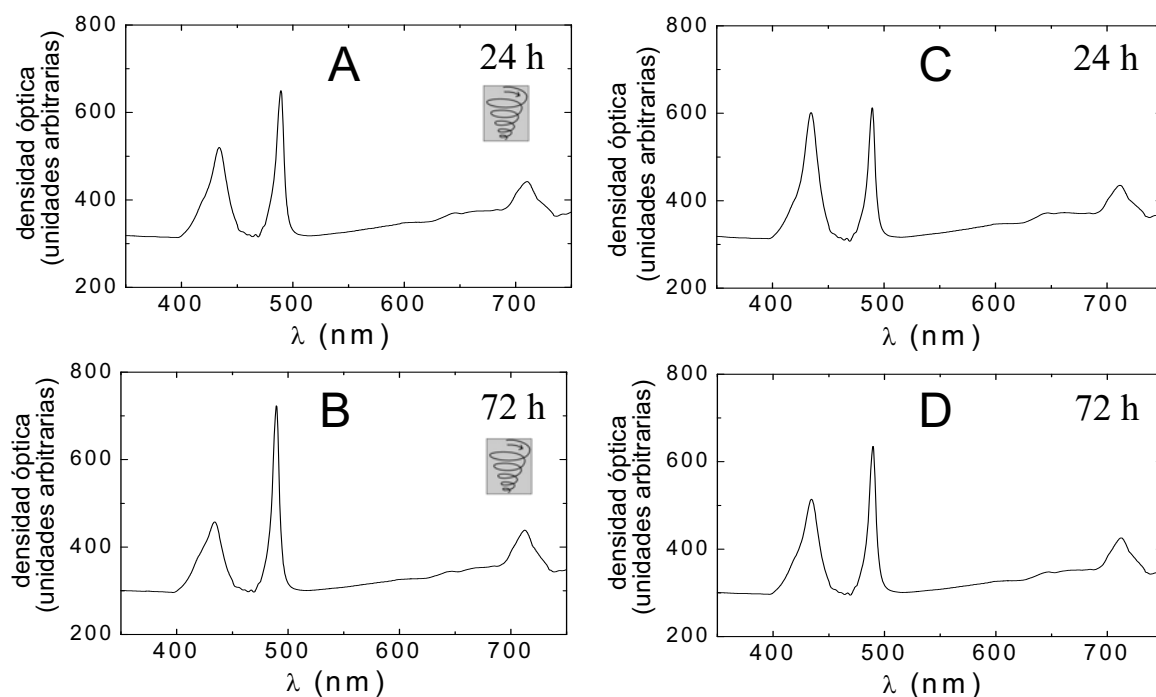


Fig. II-64 Evolución de los espectros de densidad óptica de partes alicuotas de una misma solución 1×10^{-4} M de H_3TPPS_3 : A,B) con agitación (CW, 1600 rpm); y C,D) en reposo (sin agitación).

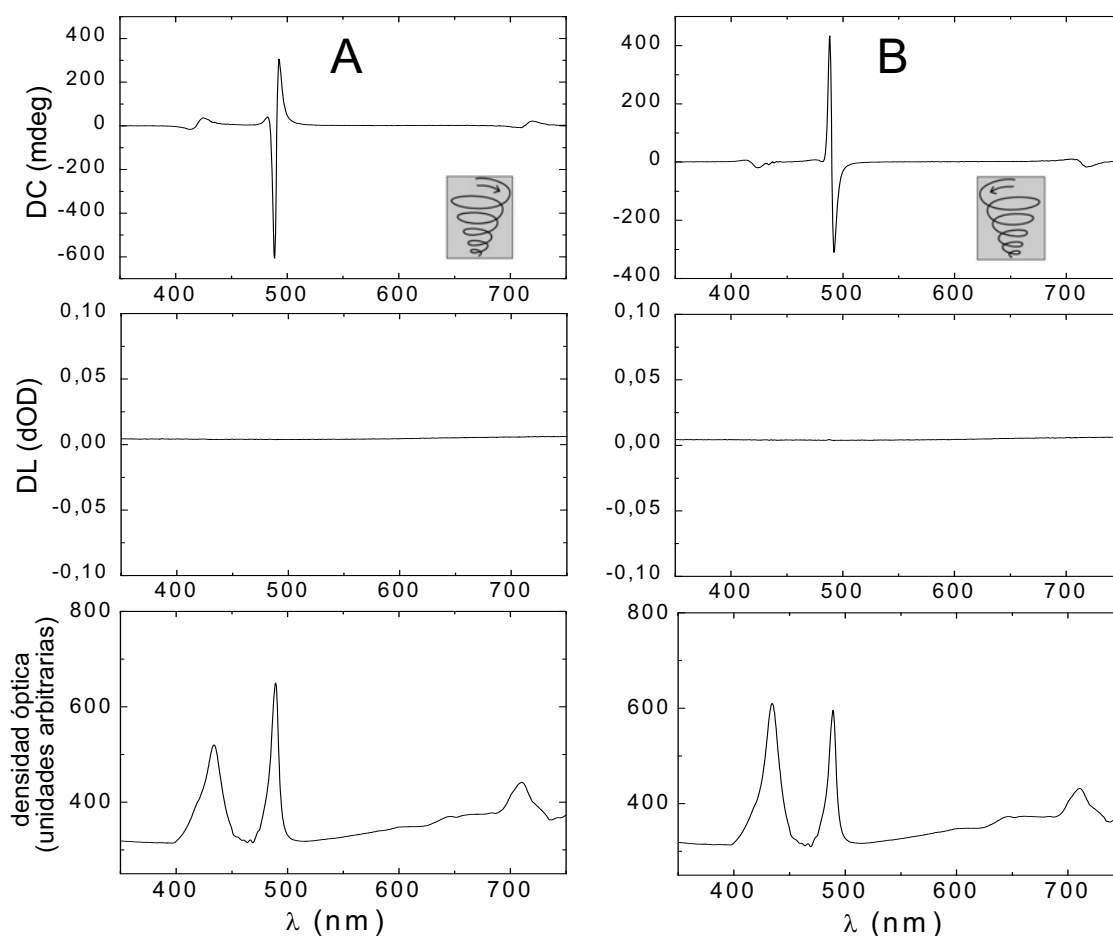


Fig. II-65 Espectros de DC, DL y densidad óptica de dos partes alícuotas de una solución $1,1 \times 10^{-4}$ M de H_3TPPS_3 agitadas a 1600 rpm durante 24 h: A) en sentido horario; y B) en sentido antihorario.

Las medidas de AFM de los depósitos obtenidos a partir de soluciones agitadas, en comparación con los depósitos de las mismas soluciones en reposo, mostraron que el plegamiento se aceleraba con la agitación. Por ejemplo, siguiendo el procedimiento experimental, después de 6 h se observaron cintas con plegamiento en los depósitos de las soluciones agitadas, mientras que para la misma solución en reposo aún no se detectaba el inicio del proceso de plegamiento espontáneo (Fig. II-66). A nivel de observación por AFM, donde no son posibles conteos estadísticos, se detectaron plegamientos de las cintas en ambos sentidos sin importar cuál era el sentido de agitación utilizado.

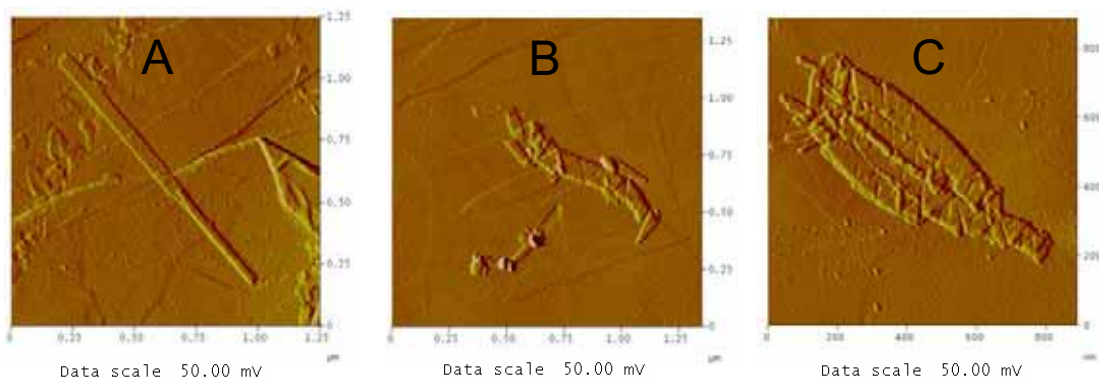


Fig. II-66 Imágenes de AFM en modo amplitud de los depósitos (durante 1 min) de partes alicuotas de una misma solución de H_3TPPS_3 $1,3 \times 10^{-4}$ M después de 6 h: A) en reposo ($1,25 \mu\text{m} \times 1,25 \mu\text{m}$); B) con agitación horaria a 1600 rpm ($1,25 \mu\text{m} \times 1,25 \mu\text{m}$); y C) con agitación antihoraria a 1600 rpm ($890 \text{ nm} \times 890 \text{ nm}$).

No obstante, el plegamiento espontáneo de las cintas en soluciones $\sim 1 \times 10^{-4}$ M de H_3TPPS_3 en reposo (sin agitar) difirió de manera significativa con respecto al de las soluciones agitadas. En estas últimas, en contraste con la solución en reposo, una gran proporción de cintas presentaba un orden de plegamiento regular extenso (cintas helicoidales), y raramente se detectaron plegamientos irregulares (Fig. II-67). El flujo de agitación minimizó el número de cúmulos observados fomentando la dispersión de las cintas como ya habíamos observado en el caso de los depósitos de soluciones $\sim 1 \times 10^{-3}$ M de H_3TPPS_3 (véase Fig. II-61; pág. 112).

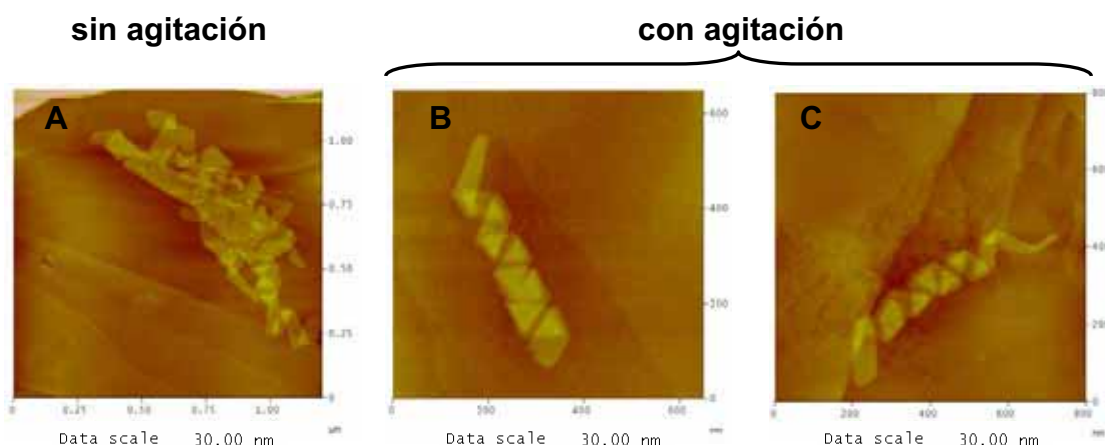


Fig. II-67 Imágenes de AFM características de una solución de H_3TPPS_3 $1,3 \times 10^{-4}$ M (depositada durante 1 min): A) en reposo ($1,2 \mu\text{m} \times 1,2 \mu\text{m}$) 24 h después de su preparación; B y C) con agitación a 1600 rpm (B: $650 \text{ nm} \times 650 \text{ nm}$ y C: $800 \text{ nm} \times 800 \text{ nm}$) 6 h después.

Estos resultados nos llevaron a realizar una serie de experimentos en estas mismas condiciones experimentales para comprobar si la correlación entre la señal de DC y el sentido de la agitación se cumplía de manera estadística. Cabe señalar que pruebas previas indicaron que este tipo de experimento es muy sensible respecto a las condiciones experimentales de agitación. Por ejemplo, con agitadores del mismo tipo pero con rotores no perfectamente planos (detectado por ruidos, vibración, etc) no se consigue la selección del signo de quiralidad de los J-agregados.

II.2.7.3.2.1. Serie de agitación a 1600 rpm

A partir de una solución $\sim 1 \times 10^{-4}$ M de H_3TPPS_3 según el procedimiento general de agitación se realizaron los experimentos recogidos en la Tabla II-5. Las medidas de dicroísmo circular de estas soluciones se realizaron después de períodos de agitación (o reposo) de 6 h a 24 h. Para descartar posibles interferencias, esta serie de experimentos se ha realizado en tubos de 2 mL de un solo uso utilizando diferentes soluciones de H_3TPPS_3 obtenidas a partir de diferentes columnas de intercambio catiónico. Además, las barras magnéticas agitadoras se han intercambiado y se ha estudiado el efecto de la presencia de la barra magnética en soluciones en reposo, descartando posibles diferencias de comportamiento.

Tabla II-5 Serie de experimentos de agitación a 1600 rpm.

Nº Experimento	Dirección de la agitación	Espectro dicroico	
		-/0/+ (mdeg)	+/0/- (mdeg)
1	HORARIA	-50/0/+40	
	ANTIHORARIA		+150/0/-160
	EN REPOSO	-25/0/+10	
2	HORARIA	-400/0/+250	
	ANTIHORARIA		+1100/0/-800
	EN REPOSO	-20/0/+15	
3	HORARIA	-50/0/+100	
	ANTIHORARIA		+50/0/-90
	EN REPOSO	-90/0/+40	
4	HORARIA		+450/0/-350
	ANTIHORARIA		+210/0/-250
	EN REPOSO	-60/0/+22	

5	HORARIA	-30/0/+75	
	ANTIHORARIA		+65/0-125
	EN REPOSO	-40/0/+18	
6	HORARIA	-65/0/+68	
	ANTIHORARIA		+40/0/-110
	EN REPOSO	-40/0/+18	
7	HORARIA	-40/0/+20	
	ANTIHORARIA		+40/0/-100
	EN REPOSO	-18/0/+12	
8	HORARIA	-175/0/+153	
	ANTIHORARIA		+150/0/-170
	EN REPOSO	-60/0/+22	
9	HORARIA	-190/0/+120	
	ANTIHORARIA		+20/0/-50
	EN REPOSO	-65/0/+45	
10	HORARIA*	-1400/0/+1100	
	ANTIHORARIA		+85/0/-65
	EN REPOSO	-60/0/+45	
11	HORARIA	-15/0/+40	
	ANTIHORARIA		+20/0/-40
	EN REPOSO	-90/0/+40	
12	HORARIA	-80/0/+65	
	ANTIHORARIA	-200/0/+310	
	EN REPOSO	-70/0/+65	
13	HORARIA	-550/0/+220	
	ANTIHORARIA		+400/0/-300
	EN REPOSO	-150/0/+100	
14	HORARIA	-95/0/+60	
	ANTIHORARIA		+450/0/-300
	EN REPOSO	-200/0/+130	
15	HORARIA	-180/0/+80	
	ANTIHORARIA	-130/0/+80	
	EN REPOSO	-15/0/+10	

El centro de la banda bisignada se situó en el máximo de absorción de la banda de los J-agregados: ~ 490 nm, y mostró una distancia máxima entre los picos de $4 \pm 0,5$ nm para todos los experimentos. Esto indica que el control de las condiciones experimentales de los J-agregados conduce al mismo tipo de partículas.

* En este caso se agitó durante 48 h

De los 15 experimentos, 12 de ellos dieron señales bisignadas de dicroísmo circular opuestas: (-/0/+) para las agitadas en sentido horario y (+/0/-) para las agitadas en sentido antihorario, estos resultados corresponden a una selección por agitación del 80% considerando pares CW-ACW (12/15).

Un aspecto remarcable es que las soluciones en reposo siempre mostraron el mismo signo de quiralidad para la señal bisignada en el espectro de DC (señal bisignada positiva) al igual que se observó para los J-agregados de H₄TPPS₄. Este hecho ha sido previamente reportado y discutido^{110,123,153} y se creía que se debía a contribuciones lineales originadas por una orientación dominante de las partículas con forma de cinta por movimiento Browniano en presencia de gravedad (rotación Browniana). Estudios recientes en nuestro grupo han mostrado la ausencia de contribuciones lineales y han demostrado que el efecto se debe a la interacción con las trazas de restos biológicos en el agua ultra-pura.

II.2.7.3.2.2. Serie de agitación a 800 rpm

Para evaluar el efecto de la velocidad de agitación en la selección del signo quiral de los J-agregados realizamos otra serie de 8 experimentos a menor velocidad (800 rpm) siguiendo el mismo procedimiento general de agitación a partir de una solución $\sim 1 \times 10^{-4}$ M de H₃TPPS₃. Después de un periodo de agitación de 6 h a 24 h se realizaron las medidas de dicroísmo circular de estas soluciones (Tabla II-6). Se tuvieron en cuenta las mismas precauciones detalladas en las serie de agitación a 1600 rpm.

Tabla II-6 Serie de experimentos de agitación a 800 rpm.

N° Experimento	Dirección de la agitación	Espectro dicroico	
		-/0/+ (mdeg)	+/0/- (mdeg)
1	HORARIA	-120/0/+80	
	ANTIHORARIA	-600/0/610	
	EN REPOSO	-100/0/+40	
2	HORARIA	-610/0/+480	
	ANTIHORARIA	-1200/0/350	
	EN REPOSO	-100/0/+40	

3	HORARIA	-30/0/+420	
	ANTIHORARIA	-850/0/600	
	EN REPOSO	-70/0/+30	
4	HORARIA	-500/0/+300	
	ANTIHORARIA	-150/0/+100	
	EN REPOSO	-70/0/+30	
5	HORARIA	-5/0/+10	
	ANTIHORARIA	-500/0/+450	
	EN REPOSO	-70/0/+25	
6	HORARIA	-110/0/+70	
	ANTIHORARIA	-130/0/+90	
	EN REPOSO	-70/0/+25	
7	HORARIA	-300/0/+200	
	ANTIHORARIA	-110/0/+100	
	EN REPOSO	-10/0/+5	
8	HORARIA	-600/0/+400	
	ANTIHORARIA	-500/0/+300	
	EN REPOSO	-8/0/+5	

De nuevo el centro de la banda bisignada se situó en el máximo de absorción de la banda de los J-agregados (~ 490 nm), y la distancia máxima entre los dos picos de la señal bisignada fue de $4 \pm 0,5$ nm para todos los experimentos. En este caso se obtuvo siempre una señal de quiralidad excitónica positiva para los agregados de las tres partes alícuotas sin importar la dirección de agitación, por tanto la fuerza generada por la frecuencia de agitación (rpm) es el factor crítico que origina la selección de la quiralidad de los agregados.

II.2.7.4. Efecto de la agitación en el rotaevaporador de soluciones de H_3TPPS_3

Mediante la rotaevaporación en sentido horario o antihorario (véase anexo), a partir de soluciones ácidas de la porfirina Na_3TPPS_3 en su forma monomérica diprotonada, se reportó la selección del signo de quiralidad de los homoasociados formados al concentrar la solución.¹⁵³ De igual manera intentamos realizar una serie de experimentos análogos con la H_3TPPS_3 .

A partir de una solución de $\text{H}_3\text{TPPS}_3 \sim 1 \times 10^{-3} \text{ M}$ recién obtenida de la columna de intercambio catiónico como se ha descrito previamente, se preparó una dilución 1/1000. Esta solución diluida de porfirina ($\sim 1 \times 10^{-6} \text{ M}$) mostraba por UV-Vis una proporción de las especies base libre:monómero diprotonado de $\sim 2:1$ y la ausencia de J-agregados. Se prepararon tres partes alícuotas de 250 mL de esta solución de $\text{H}_3\text{TPPS}_3 \sim 1 \times 10^{-6} \text{ M}$. Una se dejó en reposo y las otras dos se concentraron en el rotaevaporador con sentidos de agitación del matraz opuestos. Después de concentrar la solución en el rotaevaporador durante unas horas se obtuvo una solución concentrada de porfirina agregada ($1 \times 10^{-3} \text{ M} - 1 \times 10^{-4} \text{ M}$). A pesar de que los experimentos se realizaron utilizando vidrio silanizado como se detalla en la parte experimental, fue muy difícil evitar la neutralización de la solución de porfirina (p. ej., efecto de las impurezas presentes en los tubos de goma del rotaevaporador). Estos inconvenientes no permitieron realizar una serie de experimentos para determinar estadísticamente si se obtenía o no selección quiral según el sentido de agitación del matraz en el rotaevaporador. No obstante, los depósitos de AFM de algunas de las soluciones obtenidas (sin problemas de neutralización) mostraron abundancia de estructuras helicoidales regulares y otro tipo de estructuras de interés para comprender el fenómeno de plegamiento (Fig. II-68).

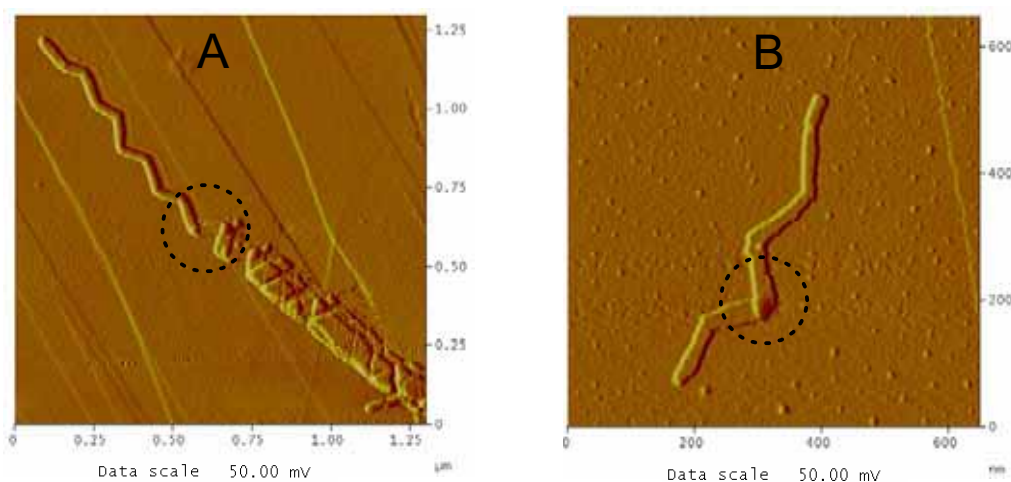


Fig. II-68 Imágenes de AFM en modo amplitud de los depósitos (durante 1 min) de una solución agregada de H_3TPPS_3 obtenida por rotaevaporación de una solución $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ de H_3TPPS_3 sin presencia de J-agregados: A) $1,3 \mu\text{m} \times 1,3 \mu\text{m}$; y B) $650 \text{ nm} \times 650 \text{ nm}$.

Se obtuvieron estructuras de las cintas en zigzag con ángulos entre 110° y 140° . Esto junto con muchas otras observaciones indica que el plegamiento únicamente se observa cuando la anchura de las cintas es superior a un valor crítico de aproximadamente 28 nm. Para anchuras menores no se ha observado nunca plegamiento. En el caso de soluciones rotaevaporadas de porfirina las regiones de las cintas más estrechas de 28 nm muestran las estructuras en zigzag descritas.

II.2.7.5. Discusión sobre el fenómeno de plegamiento de los agregados de H_3TPPS_3

La influencia de la agitación en el plegamiento de las cintas de H_3TPPS_3 es un ejemplo experimental poco frecuente de los modelos teóricos aceptados sobre la influencia de los efectos hidrodinámicos en la cinética de plegamiento de polímeros anfifílicos (p. ej. biopolímeros). En estos materiales el flujo de solvente (movimiento de convección, etc) juega un papel crucial en la selección y consecución de sus estructuras en equilibrio, permite que se alcancen ciertos estados de transición y por tanto modifica la cinética del proceso hacia la forma plegada más estable.^{157,158} El papel del agua en el plegamiento de proteínas es el paradigma de estos modelos.

Un reciente modelo teórico¹⁵⁹ trata la transición de estructuras tubulares rectas a hélices en solución como un proceso controlado entrópicamente. En este modelo el tubo recto que interacciona con pequeñas partículas esféricas de la solución, se pliega para disminuir el volumen disponible para esta interacción (Fig. II-69). El plegamiento provoca un aumento de la energía libre, debido a la entropía positiva generada por el retorno de partículas esféricas al seno de la solución. Este aumento de entropía depende del número de partículas esféricas que dejan de interactuar con el tubo, y por ello del tamaño y dimensiones de éste, y de la curvatura del plegamiento.

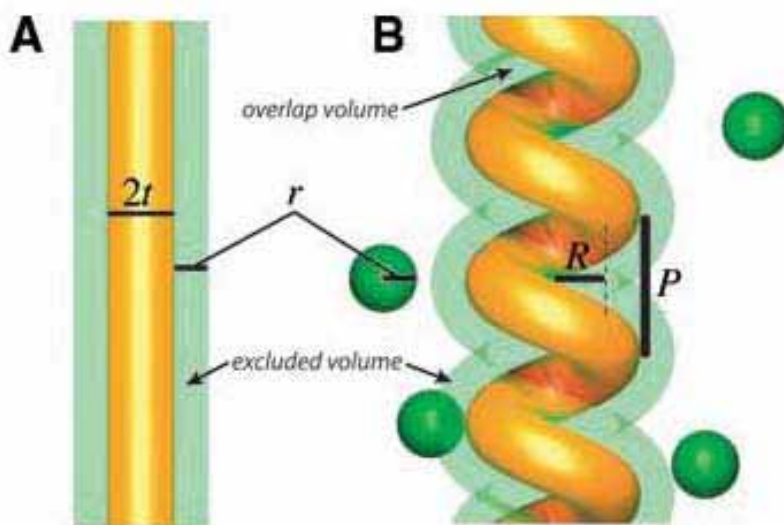


Fig. II-69 Modelo del plegamiento entrópico propuesto por Snir y Kamien.¹⁵⁹ A) volumen de interacción (verde azulado) para un tubo recto (naranja) con partículas esféricas de radio r . B) Cuando el tubo toma la conformación helicoidal, las regiones de interacción se solapan sobre sí mismas, reduciendo el volumen total de interacción.

En nuestro caso, estimaciones de este modelo y el hecho de que el plegamiento de las cintas de H_3TPPS_3 únicamente tenga lugar para valores de anchura superiores a 28 nm (véase Fig. II-68; pág. 122), implican que la interacción tiene lugar entre la cinta y partículas relativamente grandes y excluye que el origen del plegamiento sea debido a efectos puramente hidrofóbicos. Estas partículas que interactúan con la cinta deberían ser oligómeros; *i.e.* pequeños J-agregados o la porfirina monomérica, la cual también presenta un tamaño relativamente grande (volumen aproximado $\sim 2,5 \text{ nm}^3$). Ésta es una hipótesis razonable si tenemos en cuenta que tanto las cintas de J-agregado como las partículas que interaccionarían con éstas son especies cargadas eléctricamente y que el tipo de interacción sería el esperado en sistemas coloidales.

Anteriormente hemos propuesto para los agregados de H_3TPPS_3 un modelo de bicapa con interacciones hidrofóbicas entre capas (véase Fig. II-48B; pág. 98). En el caso de los agregados de H_4TPPS_4 , el modelo que hemos propuesto es también el de una bicapa, pero con interacciones iónicas entre capas (véase

Fig. II-48A; pág. 98). Para los agregados de H_4TPPS_4 sólo hay una posible ordenación de tipo iónico entre las dos capas que conforman las cintas observadas y por tanto el efecto de las fuerzas hidrodinámicas únicamente puede provocar la ruptura de las cintas. No obstante, en el caso de los agregados de H_3TPPS_3 , las bicapas formadas por interacciones hidrofóbicas tienen la posibilidad de presentar diversas estructuras que difieren poco en sus valores energía. En soluciones en reposo de porfirina agregada, el flujo hidrodinámico de origen Browniano o convectivo actúa como baño térmico, proporcionando la energía de activación necesaria para pasar de un intermedio conformacional a otro hasta llegar a la forma plegada que representa el mesoformo más estable del sistema. En el caso de las soluciones agitadas debe distinguirse entre las regiones del recipiente que presentan un flujo turbulento y las que presentan flujo laminar. La interacción con el flujo turbulento debería tener un efecto similar al de la dinámica Browniana de las soluciones en reposo. La estimación del número de Reynolds (Re) de nuestro montaje experimental indicó que el sistema no estaba agitando en régimen laminar (valores de Re pequeños) sino que implicaba un vórtice turbulento. No obstante, existe siempre un flujo laminar que no se puede suprimir en las paredes del recipiente. Este flujo es una corriente quiral laminar con gradiente de velocidad (fuerza de cizalla) entre la pared y el movimiento helicoidal del flujo ascendente.

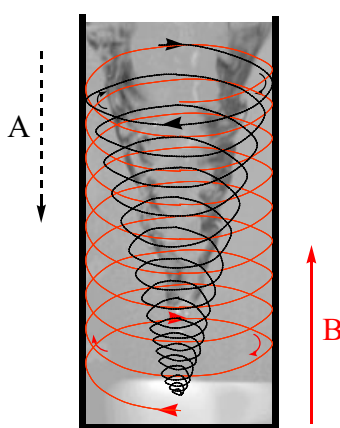


Fig. II-70 Vórtice obtenido en un sistema con agitación mediante una barra magnética. En el flujo de arriba hacia abajo (A) y de abajo hacia arriba (B) se mantiene el sentido de rotación circular, pero al cambiar la dirección de progresión se invierte el sentido del vórtice. El vórtice del fluido que desciende es en este caso dextrógiro (P) y el de ascenso levógiro (M).

En la Fig, II-70 se muestra un esquema del sistema de agitación que muestra el vórtice formado y el flujo de retorno por las paredes (flujo laminar). Este gradiente hidrodinámico quiral debería ser el responsable de la obtención de estructuras plegadas regulares (cintas plegadas helicoidalmente) y de la existencia de un exceso enantiomérico de plegamientos en uno de los dos sentidos posibles. Este exceso enantiomérico sería el detectado por DC. El flujo del vórtice va de arriba abajo del recipiente y el flujo de retorno por las paredes de abajo a arriba. El signo helicoidal creado por la barra agitadora de arriba hacia abajo (p. ej., P), cambia su signo (p. ej., M) en el fluido de retorno a la superficie: tenemos el mismo sentido de rotación circular pero diferente dirección de propagación. De hecho, los resultados publicados previamente sobre la selección del signo de quiralidad en los agregados de Na_3TPPS_3 mediante la concentración en el rotaevaporador^{110,153} son opuestos a los obtenidos en este trabajo. Por ejemplo mientras para la rotación horaria de soluciones agregadas de H_3TPPS_3 hemos obtenido una señal de quiralidad excitónica positiva, con el rotaevaporador se obtuvo una señal de quiralidad excitónica negativa. Esta aparente contradicción queda resuelta si consideramos que el flujo que induce la selección de la quiralidad es el flujo de retorno laminar de las paredes del recipiente. En cambio en el caso del rotaevaporador el flujo más importante que origina un gradiente de cizalla es el del progreso del fluido en las paredes del rotaevaporador.

Desde un punto de vista estructural podemos considerar que objetos enantiomórficos en un flujo circular exhiben trayectorias enantiotrópicas, como se ha mostrado experimental¹⁶⁰ y teóricamente.¹⁶¹ En nuestro caso, las trayectorias resultantes para hélices enantiomórficas deben ser diastereotrópicas, porque el flujo de agitación es quiral de por sí. Todo ello sugiere que en la evolución de la agregación en el sistema agitado existe una selección de uno de los dos sentidos de las hélices. Las partículas con uno de los signos helicoidales podrían seguir la trayectoria del régimen laminar, mientras que las otras serían expulsadas hacia las regiones de flujo caótico o turbulento. En estas regiones el “reciclaje” a monómeros a través de pequeñas especies oligoméricas sería mayor, permitiendo la

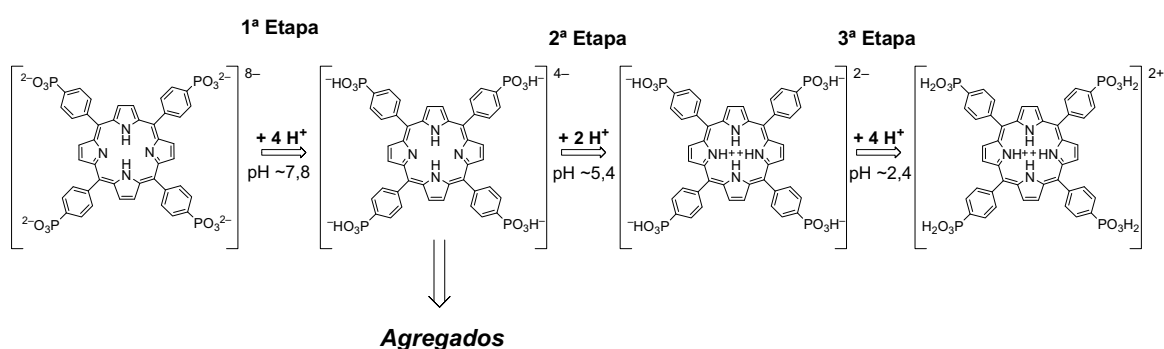
selección de las partículas con el otro signo helicoidal. En este sentido consideramos que esta selección es sólo posible en el caso de objetos quirales, que puedan clasificarse en dos clases homoquirales (*e. g.*, hélices).^{162,163} De otro modo no existiría correlación entre la selección evolutiva de uno de los enantiomorfos y el signo de sus espectros de DC.

Los resultados obtenidos son un ejemplo experimental de cómo el flujo de agitación^{157,158} puede seleccionar entre diferentes rutas en un proceso de autoensamblaje, y por tanto entre diferentes polimorfos supramoleculares. Esto es de interés no sólo en el campo de biopolímeros, sino también y de manera más general en química supramolecular, por ejemplo en la mimesis de sistemas naturales mediante el autoensamblaje de porfirinoides.¹⁶⁴ De hecho, resultados experimentales previos sobre la influencia de la gravedad en la estructura de las mesofases obtenidas por autoensamblaje¹⁶⁵ también tienen su origen en los efectos hidrodinámicos.

II.2.8. Estudio del control de la agregación de Na_4TPPS_4 en solución ácida ($\text{H}_4\text{TPPS}_4^{2-}$)

Uno de las metas actuales en química supramolecular es el control de los métodos de síntesis no-covalente en el control de la estructura de sistemas supramoleculares, como es el caso de la homoasociación de las porfirinas estudiadas en este trabajo. Hasta ahora han sido publicados pocos trabajos sobre el control en la formación (por interacciones no covalentes) de estructuras supramoleculares de porfirinas.¹⁶⁶⁻¹⁷¹ Algunos de estos trabajos se basan en la dependencia jerárquica intrínseca propia de los procesos de autoensamblaje: la secuencia de los componentes moleculares monoméricos en el producto final deriva de la secuencia temporal de los “sucesos” químicos (por ejemplo la adición de las especies moleculares monoméricas). Pero esta dependencia jerárquica no

radica únicamente en la secuencia temporal de sucesos sino que también puede ser modulada por el tiempo. Purrello¹⁷² ha descrito como en el caso de la *meso*-tetraquis(4-fosfonatofenil)porfirina (TPPP) al realizar dos valoraciones de pH en las mismas condiciones experimentales, exceptuando el tiempo de espera entre adiciones sucesivas de la solución valorante, se obtenían especies finales diferentes. Esta porfirina, TPPP, presenta tres etapas de protonación y únicamente muestra agregación la especie con los grupos fosfonato monoprotonados y los N pirrolenínicos sin protonar (Esquema II-5).



Esquema II-5 Etapas de protonación y posible agregación para TPPP.¹⁵⁷

Una valoración rápida (de pH 10 a 2,5) conduce a la especie monomérica completamente protonada mientras que una valoración más lenta genera el autoensamblaje de la porfirina protonada parcialmente. Esta diferencia ha sido atribuida a la necesidad de un mayor tiempo para conseguir una concentración crítica de semillas de agregado, necesarias para “catalizar” el crecimiento de los homoasociados más grandes. Si se evita la primera etapa de protonación (al disolver directamente la porfirina a pH= 5) o se pasa rápidamente a través de ésta, se obtiene la formación de las especies monoméricas diprotonadas.¹⁷²

Este comportamiento es bastante diferente del mostrado por otras porfirinas para las cuales el proceso de homoasociación por autoensamblaje únicamente es posible a partir de las especies completamente protonadas, es decir después de la última etapa de protonación.⁷⁷ En el caso de la TPPP, el sistema llega a una bifurcación de control cinético y termodinámico en la segunda etapa de

protonación (de las tres que hay) y el tiempo es el factor discriminante entre el control termodinámico (protonación) y cinético (agregación). En cambio para la Na_4TPPS_4 , la agregación sólo tiene lugar tras la última etapa de protonación (control termodinámico).^{109,172}

Hemos estudiado la homoasociación de Na_4TPPS_4 para descubrir otros parámetros que puedan modular la agregación de aquellos casos en los que aparentemente es difícil de dirigir el proceso de autoensamblaje. La Na_4TPPS_4 únicamente forma mesofases agregadas de estructura definida en su forma monomérica ácida diprotonada. Como hemos explicado anteriormente probablemente se generan J-agregados monodimensionales ($\lambda_{\text{máx.}} = 490 \text{ nm}$) que se empaquetan en H-agregados ($\lambda_{\text{máx.}} = 420 \text{ nm}$) formando la estructura tridimensional del homoasociado. Algunos de los factores que pueden influir en el control de estas segundas etapas de la agregación son: la concentración de porfirina, el pH, la naturaleza de los cationes presentes (que apantallan la repulsión entre los 4 sustituyentes aniónicos) y el orden jerárquico en la adición de los componentes. En cuanto a este último factor, algunos autores ya han indicado su importancia en relación con el comportamiento de agregación, pero no han dado pautas que permitan su control.¹⁷³

Hemos realizado estudios de espectroscopia UV-Vis, Dicroísmo Circular (DC) y RLS¹⁷⁴ (*Resonance Light Scattering*) sobre la agregación de soluciones de Na_4TPPS_4 en NaCl 0,3 M, en un intervalo de pH de 1,3 a 3,9; variando la concentración de la solución madre de porfirina, la concentración de porfirina en la solución final (entre 1 μM y 4 μM) y el orden de adición de las soluciones madre de porfirina y NaCl .

II.2.8.1. Preparación de las soluciones de $\text{H}_4\text{TPPS}_4^{2-}$

Las soluciones madre de porfirina (Na_4TPPS_4), de concentraciones entre $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ y $1 \times 10^{-3} \text{ M}$, fueron preparadas siempre un día antes de su utilización

disolviendo la Na_4TPPS_4 en agua y se mantuvieron en un baño termostatzado a 25°C . Su concentración se determinó por espectroscopia UV-Vis el mismo día de su utilización (para asegurar su total disolución). También se prepararon soluciones de ácido cítrico 0,1 M; NaCl 3 M; HCl 1 M; y NaOH 6,8 M. A partir de estas soluciones se prepararon dos series de disoluciones en viales de vidrio de 4 mL a diferentes pH (véase Tabla II-7):

Serie A (NaCl antes): se adicionó el volumen de agua requerido, 150 μL de la solución de ácido cítrico 0,1 M; el volumen de HCl o NaOH necesario para obtener el pH deseado, un volumen de NaCl 3 M para obtener una fuerza iónica de la solución final de 0,3.

Serie B (NaCl después): se prepararon exactamente igual que las anteriores excepto que en estas no se añadió NaCl.

Los medios de dilución de ambas series (en ausencia de porfirina en la serie A, y en ausencia de NaCl y porfirina en la serie B) se prepararon siempre al mismo tiempo, en paralelo, un día antes de añadir la porfirina y tras la adición de cada componente se aseguró una mezcla rápida mediante agitación manual vigorosa. Controlamos su pH (sólo de la serie A) justo después de su preparación y se mantuvieron en la nevera para su mejor conservación.

Tabla II-7 Volúmenes añadidos y concentraciones finales para cada componente de las soluciones de las series A y B. La concentración de porfirina varió según el tipo de experimento (véase texto).

pH_{exp}	H ₂ O	ácido cítrico 0,1 M		HCl 1M		NaOH 6,8 M		NaCl 3 M	
	$V (\mu\text{L})$	$V (\mu\text{L})$	$c_F (\text{mM})$	$V (\mu\text{L})$	$c_F (\text{mM})$	$V (\mu\text{L})$	$c_F (\text{mM})$	$V (\mu\text{L})$	$c_F (\text{mM})$
1,3	2470	150	5	120	40	---	---	260	260
1,9	2520	150	5	28,5	9,5	---	---	300	300
2,3	2540	150	5	8	2,7	---	---	300	300
2,9	2550	150	5	---	---	1	2,3	300	300
3,4	2550	150	5	---	---	2,2	5	300	300
3,9	2550	150	5	---	---	3	6,8	300	300

Un días después de la preparación de los medios de dilución (series A y B) y la solución madre de porfirina (entre 1×10^{-4} M y 1×10^{-3} M), se realizó la adición ésta última en ambas series de disoluciones. En la serie B (preparadas sin NaCl) tras la adición de la porfirina inmediatamente se añadió el volumen de NaCl 3 M necesario para conseguir una fuerza iónica de 0,3. Trabajamos con concentraciones de porfirina (Na_4TPPS_4) entre 2 μM y 4 μM y el volumen final de todas las soluciones fue de ~ 3 mL, despreciando el volumen de solución madre añadido que varió de 5 μL a 150 μL según el experimento. Las soluciones fueron estudiadas mediante diferentes técnicas espectroscópicas (UV-Vis, DC y DL, y RLS). Uno de los factores críticos resultó ser la concentración final de porfirina, obteniendo comportamientos de agregación diferentes por encima y por debajo de una concentración crítica de ~ 3 μM .

II.2.8.2. Concentración final de $\text{Na}_4\text{TPPS}_4 < 3$ μM

Se estudió la evolución de la agregación en el tiempo de soluciones de porfirina de la serie A y B; y se observó que el añadir la sal antes o después repercutía de manera importante en la modulación de la agregación.

En la Fig. II-71 se muestra el seguimiento temporal por UV-Vis y RLS de soluciones de Na_4TPPS_4 de concentración final 2,7 μM y 3 μM , preparadas como las de la serie A (NaCl antes) y B (NaCl después) a pH 2,3 (ver Tabla II-7) a partir de una solución $7,2 \times 10^{-4}$ M Na_4TPPS_4 .

A partir de los espectros UV-Vis y de RLS, comprobamos que inicialmente para las soluciones de la serie B (NaCl después) no se detectó agregación y en cambio para las soluciones de la serie A (NaCl antes) sí. Después de 7 h prácticamente se mantiene la situación inicial y en las soluciones de la serie B (NaCl después) sólo se detecta la aparición de agregado (por RLS) a una concentración 3,0 μM de Na_4TPPS_4 .

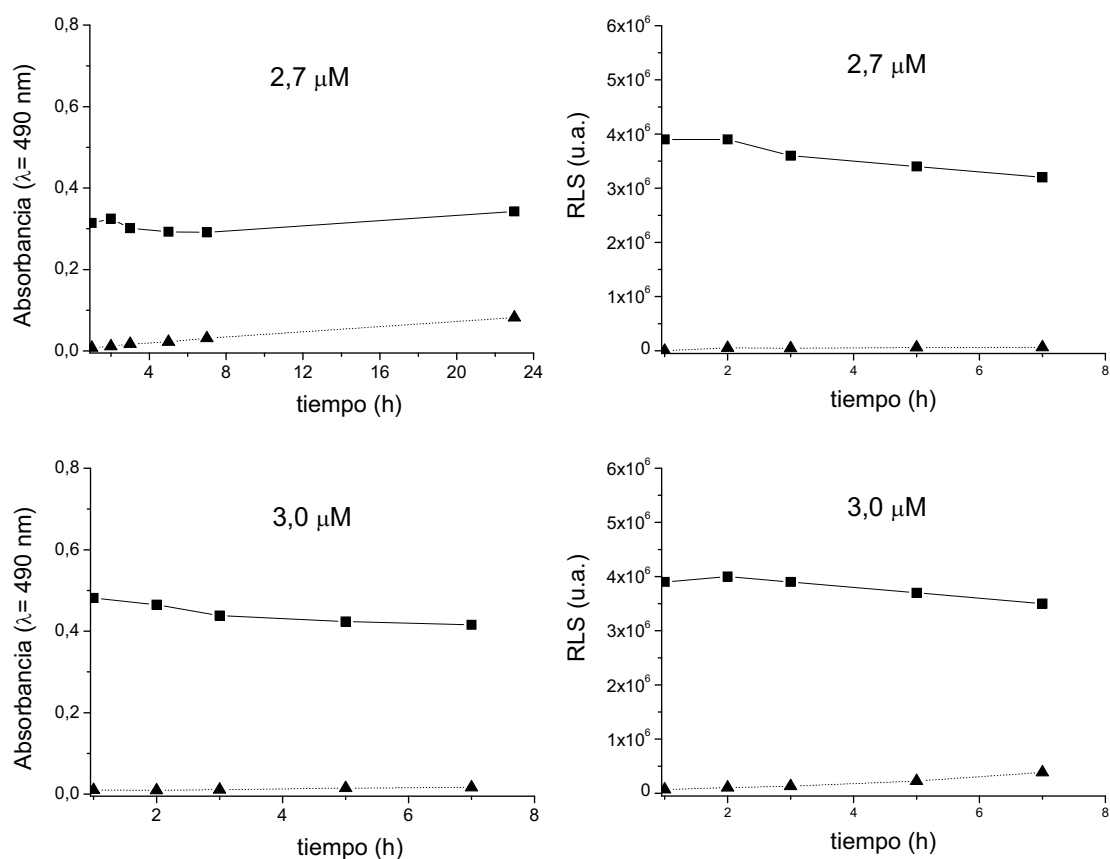


Fig. II-71 Seguimiento en el tiempo por UV-Vis y RLS de soluciones 2,7 μM y 3,0 μM de Na₄TPPS₄ a pH= 2,3 preparadas exactamente igual excepto en el orden de adición de NaCl y porfirina: (—, ■) NaCl antes; y (····, ▲) NaCl después.

La ausencia o presencia de agregación según el orden de adición de NaCl y porfirina se reprodujo cuando utilizamos soluciones madre de Na₄TPPS₄ de diferente concentración (entre 1×10^{-4} y 1×10^{-3} M) y trabajamos a diferentes pH (entre 1,9 y 3,9). A pH 1,3 también se observó agregación en las soluciones de la serie B (NaCl después), probablemente por la fuerza iónica debida a la adición de ácido (HCl).

En la Fig. II-72 se muestran los espectros de UV-Vis, DC y RLS de dos soluciones (de la serie A, NaCl antes y de la serie B, NaCl después) de Na₄TPPS₄ 2,7μM a pH 2,9 realizados 1 h 30 min después de la adición de porfirina.

El espectro UV-Vis de la solución de la serie A (NaCl antes) mostró una absorción intensa característica de J-agregados a 490 nm mientras que el espectro de la solución de la serie B (NaCl después) no mostró absorción alguna en esa región del espectro. Los experimentos de *Resonance Light Scattering* (RLS) de estas soluciones corroboraron los resultados obtenidos por espectroscopia UV-Vis. En la solución A (NaCl antes) se obtuvo una señal muy intensa a 490 nm indicando la presencia de J-agregados, mientras que la solución B (NaCl después) mostró un espectro completamente plano. En cuanto a los experimentos de DC para la solución A (NaCl antes) tenemos una señal monosignada muy poco intensa y para la solución B (NaCl después) no observamos ninguna señal.

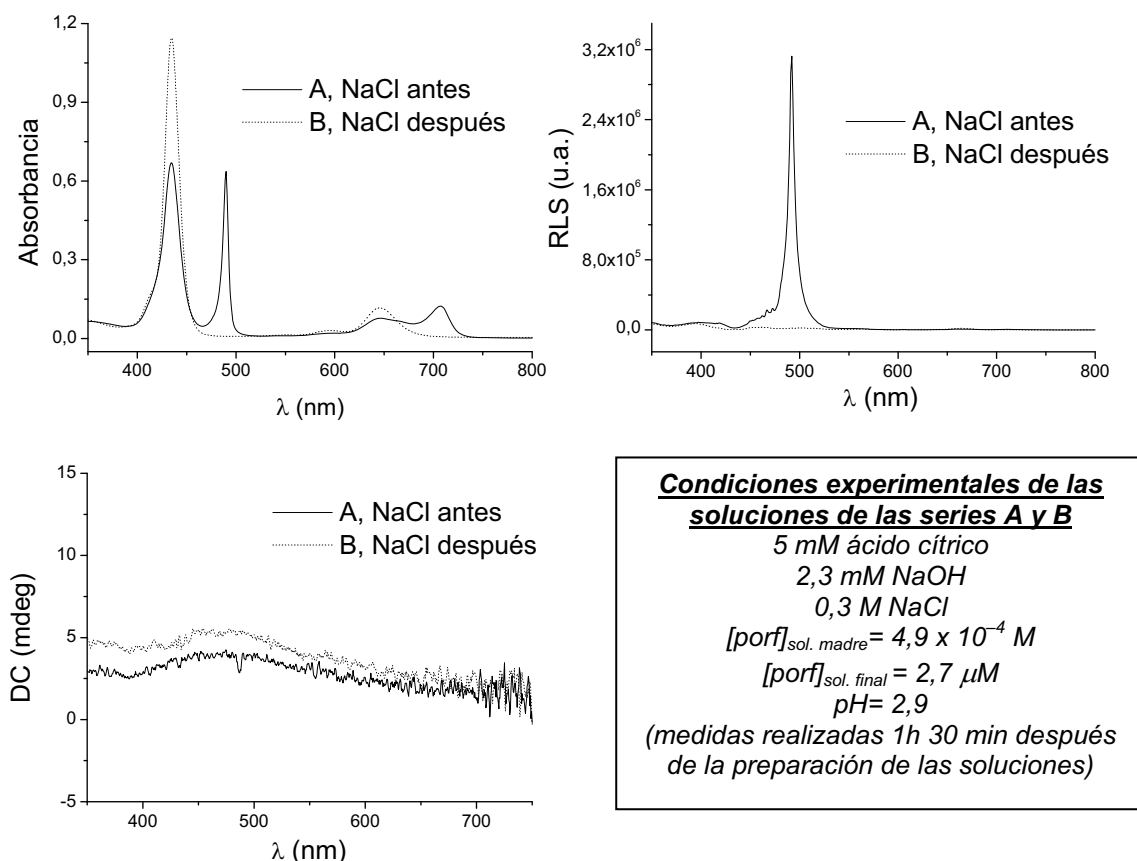


Fig. II-72 Espectros de UV-Vis RLS y dicroísmo circular; y condiciones experimentales de dos soluciones preparadas exactamente igual excepto en el orden de adición de NaCl y porfirina.

La agregación por tanto depende en gran medida del orden de dilución, permitiendo escoger en las mismas condiciones experimentales entre la forma monomérica diprotonada de la porfirina y especies autoensambladas. Una posible explicación sería la existencia en la solución madre de porfirina de pequeños agregados. Una vez disuelta la alícuota de la solución madre en el medio de dilución, la porfirina que forma estos agregados se protonaría rápidamente formando semillas de J-agregados. Estos J-agregados podrían seguir dos caminos diferentes según la presencia o no de NaCl:

a) *en presencia de sal (serie A, NaCl antes)*, estos agregados se mantendrían ya que la presencia de centros positivos (Na^+) favorecería la presencia de micro-regiones concentradas en porfirina.

b) *en ausencia de sal (serie B, NaCl después)*, estos agregados se disociarían rápidamente debido a la repulsión entre las cargas positivas del núcleo porfirínico y las cargas negativas de la periferia del anillo.

Este remarcable control en el autoensamblaje de Na_4TPPS_4 en medios ácidos puede ser explotado de cara a sintetizar nuevas especies con una actividad específica. Actualmente en la universidad de Catania se está trabajando en este sentido. Por ejemplo la interacción de Na_4TPPS_4 con un calixareno catiónico transformaría en medio ácido la porfirina zwitteriónica (con cationes en el anillo central y aniones en la periferia) en una especie policationica sensible a aniones. El exceso de cargas positivas en el heteroasociado calixareno-porfirina (4:1) proporcionaría el potencial electrostático para atraer aniones y las dos cargas positivas del centro porfirínico actuarían como transductores para evidenciar el enlace con el anión debido a la variación de propiedades espectrales que tendría lugar. Ya se ha confirmado la formación del heteroasociado Na_4TPPS_4 -calixareno catiónico, únicamente cuando la porfirina está en su forma ácida diprotonada, por tanto el efecto jerárquico de la adición de los componentes en este caso sería muy importante. Actualmente se están realizando estudios utilizando estos heteroasociados como sensores de especies aniónicas, por ejemplo el anión cromato (CrO_4^{2-}) ha sido detectado a partir de 20 ppb.

En resumen, al trabajar a concentraciones finales de porfirina por debajo de 3 μM , se puede elegir para unas mismas condiciones experimentales la obtención de diferentes especies: la especie ácida diprotonada completamente monomérica o bien esta misma especie parcialmente agregada. Al adicionar el NaCl antes que la porfirina se obtiene una cierta proporción de especies de J-agregado mientras que al añadir el NaCl después se obtuvo la especie monomérica ácida en ausencia de homoasociado y no se detectaron indicios de éste durante las primeras horas después de su preparación. Después de una semana la situación de ambas soluciones fue prácticamente idéntica, por tanto es un control claramente cinético, que afecta a los primeros estadios de la agregación.

II.2.8.3. Concentración final de $\text{Na}_4\text{TPPS}_4 > 3 \mu\text{M}$

El comportamiento jerárquico de este sistema no fue tan claro cuando se estudiaron soluciones con concentraciones de $\text{Na}_4\text{TPPS}_4 > 3 \mu\text{M}$. En este caso el autoensamblaje dependió de varios parámetros: la concentración de la solución madre de porfirina neutra, el orden de adición de los componentes y el pH. El estudio de estos sistemas es muy difícil debido a la posible interdependencia entre los factores descritos, por ejemplo la dependencia de la concentración de sal podría ser diferente a distintos valores de pH. Por tanto en este caso se debería realizar un trabajo exhaustivo para estimar los parámetros experimentales que conducirían al control de los procesos de autoensamblaje.

Hemos realizado un estudio por UV-Vis, DC y RLS de soluciones de Na_4TPPS_4 4 μM , preparando los medios de dilución tal como se ha descrito previamente (ver Tabla II-7) para trabajar en un intervalo de pH entre 1,3 y 3,9; y variando la concentración de la solución madre de porfirina neutra entre 1×10^{-4} y 1×10^{-3} M.

II.2.8.3.1. Estudio por Espectroscopia UV-Vis y RLS

En la Fig. II-73 se muestra el seguimiento temporal por UV-Vis y RLS de soluciones de Na_4TPPS_4 de concentración final $3,5 \mu\text{M}$ y $4 \mu\text{M}$, preparadas como las de la serie A (NaCl antes) y B (NaCl después) a pH 2,3 (ver Tabla II-7) y utilizando una solución madre de Na_4TPPS_4 $7 \times 10^{-4} \text{ M}$.

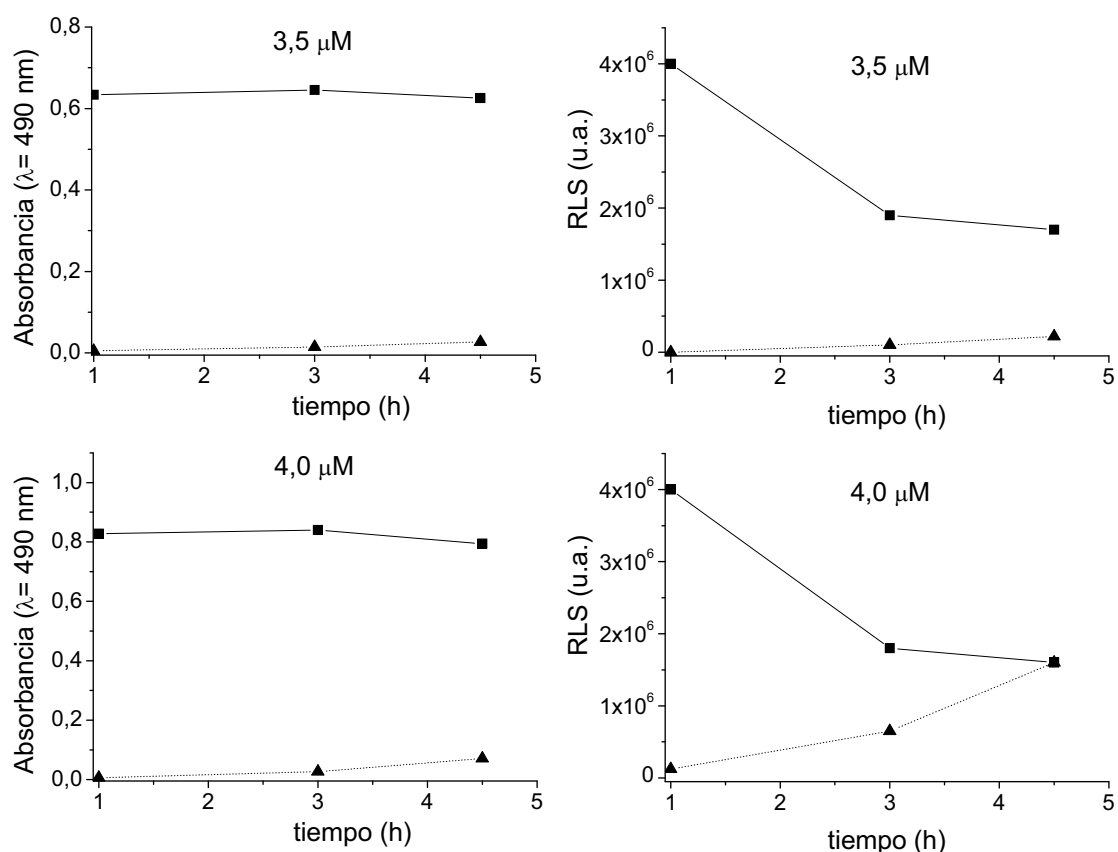


Fig. II-73 Seguimiento en el tiempo por UV-Vis y RLS de soluciones $3,5 \mu\text{M}$ y $4,0 \mu\text{M}$ de Na_4TPPS_4 a pH= 2,3 preparadas exactamente igual a partir de la misma solución madre (Na_4TPPS_4 $7 \times 10^{-4} \text{ M}$) excepto en el orden de adición de NaCl y porfirina: (—, ■) NaCl antes; y (....., ▲) NaCl después.

En las medidas de UV-Vis realizadas 4 h 30 min después de la adición de porfirina se mantuvo la situación inicial y las soluciones de la serie A (NaCl antes) presentaban una mayor absorbancia, para los J-agregados a 490 nm, respecto a las soluciones de la serie B (NaCl después). Los espectros UV-Vis de las soluciones

de la serie B mostraron un ligero incremento de la agregación con el tiempo y los de la serie A no sufrieron variaciones significativas. En cambio por RLS observamos un aumento de la intensidad de la señal a 490 nm con el tiempo para la solución de la serie B (NaCl después) y una disminución para la solución de la serie A (NaCl antes). A una concentración final de porfirina de $4,0 \mu\text{M}$ se observó como las señales de RLS de ambas soluciones presentaban intensidades muy similares a pesar de la diferencia observada por UV-Vis en sus respectivos valores de absorbancia a 490 nm.

Procedimos a estudiar la influencia del pH y de la concentración de la solución madre utilizada trabajando a una concentración final de porfirina (Na_4TPPS_4) de $4 \mu\text{M}$. Se prepararon soluciones de las series A (NaCl antes) y B (NaCl después) (ver Preparación de la muestra) añadiendo el volumen necesario de solución madre de Na_4TPPS_4 para obtener una concentración final de porfirina $4 \mu\text{M}$. Una hora y media después de haber añadido la porfirina se realizaron las medidas de UV-Vis y RLS.

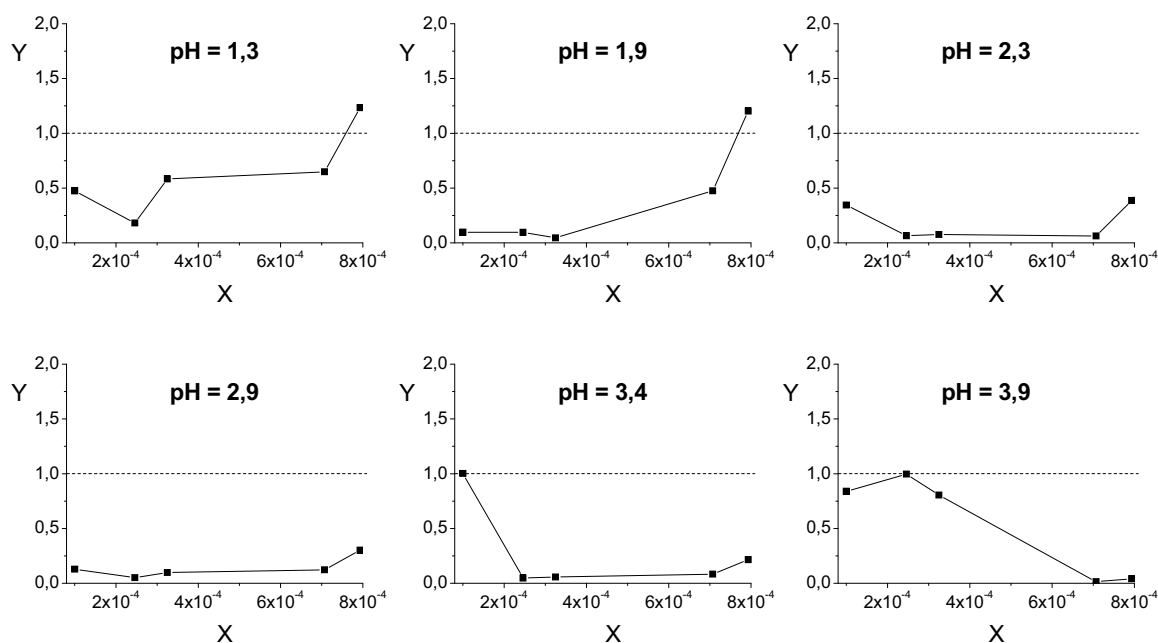


Fig. II-74 Representaciones gráficas a diferentes pH, donde X es la concentración de la solución madre utilizada en unidades de molaridad e Y es la relación de absorbancias a 490 nm (banda de máxima absorción del J-agregado) de soluciones de la serie B (NaCl después) respecto a soluciones de la serie A (NaCl antes). Todas las medidas fueron realizadas 1h 30 min después de la adición de porfirina.

En los espectros UV-Vis realizados 1 h 30 min después de añadir la porfirina en las soluciones de las series A y B, se obtuvo siempre la detección de una banda de absorción de J-agregado a 490 nm excepto en algunos casos a pH 3,9. Se determinó la relación del valor de absorción de esta banda a 490 nm en las soluciones de las series A (NaCl antes) y B (NaCl después) preparadas en las mismas condiciones experimentales excepto en el orden de adición NaCl/porfirina. En la Fig. II-74 se muestran las representaciones a diferentes pH de la relación de valores de absorbancia a 490 nm de las soluciones de la serie B respecto a las soluciones de la serie A ($A_{\text{NaCl después}} / A_{\text{NaCl antes}}$) en función de la concentración de la solución madre utilizada.

En estas representaciones se observa que el valor de absorbancia a 490 nm de las soluciones de la serie A (NaCl antes) fue mayor que el de las soluciones de la serie B (NaCl después) exceptuando los casos de pH más ácido (pH 1,3 y 1,9). Cuando la solución madre utilizada fue más concentrada (Na_4TPPS_4 8×10^{-4} M) se invirtió la tendencia general, probablemente debido a que en el momento de añadir la porfirina en la solución en ausencia de NaCl (serie B), ya existe una fuerza iónica suficiente debido a la concentración de HCl. En las gráficas a pH 3,4 y 3,9 también se observan relaciones cercanas a 1 en un par de puntos. Al repetir los experimentos de UV-Vis se observó cierta falta de reproducibilidad en los valores de absorbancia obtenidos, pero se mantuvo la tendencia general de que el valor de la absorbancia al añadir el NaCl antes que la porfirina es mayor.

Los espectros RLS de estas mismas soluciones con una concentración final de porfirina 4 μM fueron realizados 1 h 30 min después de la adición de porfirina. También mostraron una señal a 490 nm, característica de los J-agregados de $\text{H}_4\text{TPPS}_4^{2-}$, en ambos casos (serie A: NaCl antes; y serie B: NaCl después) incluso a pH 3,9 lo cual corrobora la mayor sensibilidad de esta técnica para la detección de agregados en comparación con la espectroscopia UV-Vis. Se determinó la relación de intensidades de las señales de RLS a 490 nm obtenidas en ambas situaciones y se realizó la representación de esta relación de intensidades ($i_{\text{NaCl después}} / i_{\text{NaCl antes}}$) respecto la concentración de solución madre de Na_4TPPS_4 utilizada (Fig. II-75).

En estas gráficas se observa que en los pH extremos (1,3 y 3,9) se obtenían situaciones inversas. Mientras a pH 1,3 la señal de RLS para las soluciones de la serie B (NaCl después) es mayor para todo el intervalo de concentración de la solución madre utilizada, en cambio a pH 3,9 es mayor la señal de RLS de las soluciones de la serie A (NaCl antes). A valores de pH intermedios se detecta una tendencia común: en las soluciones madre de menor concentración la intensidad de la señal de RLS a 490 nm para las soluciones de la serie A es mayor, pero a partir de un valor de concentración de la solución madre (alrededor de 4×10^{-4} M) la señal es más intensa para las soluciones de la serie B. Un hecho remarcable es que a pesar del mayor valor de absorbancia de la banda a 490 nm correspondiente al J-agregado para las soluciones de la serie A (NaCl antes) respecto a las soluciones de la serie B (NaCl después); en los experimentos de RLS se detecta una señal a 490 nm, *que en relación al valor de absorbancia*, es mayor para las soluciones de la serie B.

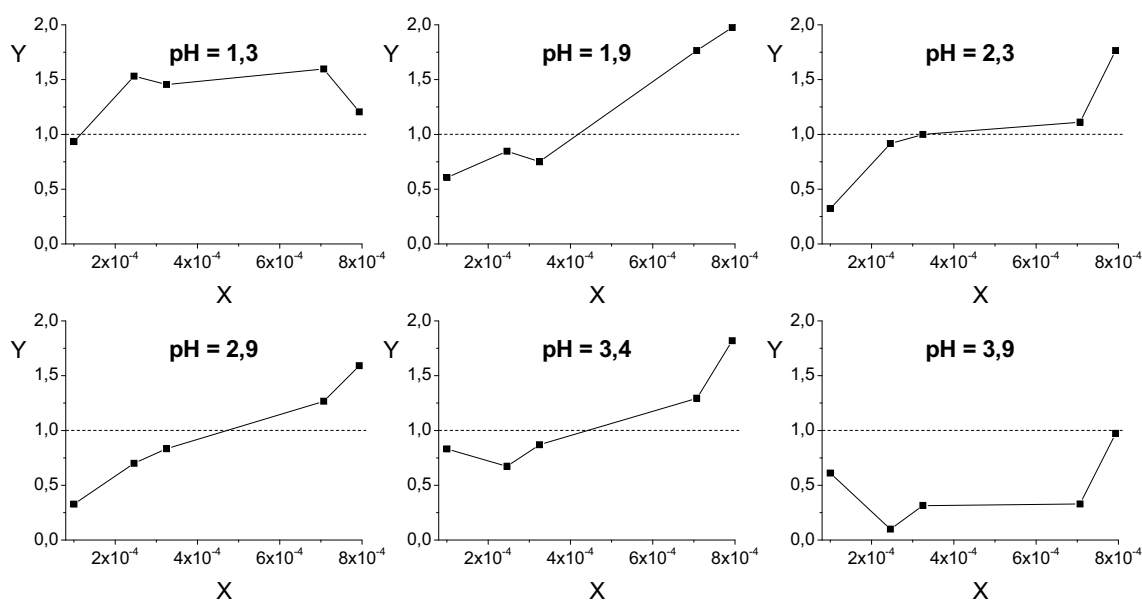


Fig. II-75 Representaciones gráficas a diferentes pH, donde X es la concentración de la solución madre utilizada e Y es la relación de intensidades de las señales de RLS a 490 nm de soluciones de la serie B (NaCl después) respecto a soluciones de la serie A (NaCl antes).

En algunos casos como se observa en la Fig. II-75, algunas de las soluciones de la serie B muestran una mayor intensidad de RLS a 490 nm que las de la serie A a pesar de presentar un valor de absorbancia menor (Fig. II-76).

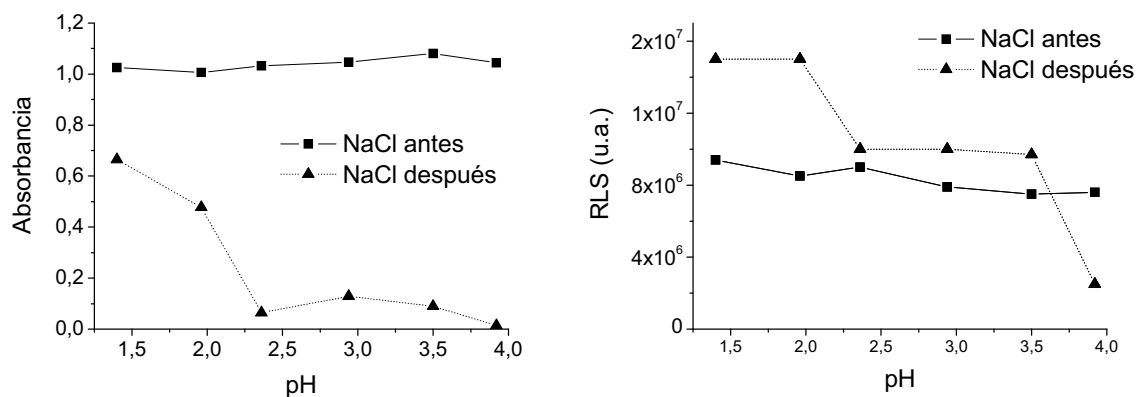


Fig. II-76 Representaciones del valor de absorbancia a 490 nm y de la intensidad de la señal de RLS (a esta misma longitud de onda) a diferentes pH para soluciones de la serie A (NaCl antes) y B (NaCl después) con una concentración final de porfirina 4 μM y de la solución madre utilizada de 7×10^{-4} M.

II.2.8.3.2. Estudio por Dicroísmo Circular (DC)

La porfirina Na_4TPPS_4 en su forma ácida diprotonada (que forma el J-agregado por autoensamblaje) es aquiral, pero sus agregados pueden ser quirales. Estos agregados quirales generalmente presentan una señal de DC bisignada de quiralidad excitónica positiva o negativa (véase anexo). En toda la serie de experimentos realizados en los que se obtenía una señal bisignada observamos que esta señal era siempre positiva. La señal bisignada de quiralidad excitónica negativa se obtuvo sólo en muy pocos casos al utilizar la solución madre recién preparada, sin esperar un día para su utilización. Estos resultados corroboran los descritos previamente para esta porfirina (Na_4TPPS_4).¹²²

Realizamos los espectros de dicroísmo circular (DC) de las mismas soluciones estudiadas por UV-Vis y RLS en el apartado anterior, con una concentración final de porfirina 4 μM . En este caso no se obtuvo siempre una

señal dicroica atribuible al J-agregado (banda centrada a 490 nm). Cuando se observó, esta señal generalmente fue bisignada positiva excepto en algunos casos (normalmente cuando la señal era de poca intensidad, poco definida) en los que fue monosignada.

Algunas medidas de DC confirmaron el fenómeno observado por RLS: las soluciones de la serie B (NaCl después) mostraban señales de mayor intensidad, *en relación al valor de absorbancia a 490 nm observado por UV-Vis*, en comparación con las soluciones de la serie A (NaCl antes). También se observó que en algunos experimentos la intensidad de la señal dicroica para el J-agregado era mayor (en valor absoluto) en el caso de las soluciones de la serie B en comparación con las soluciones de la serie A, a pesar del mayor valor de absorbancia a 490 nm que mostraban estas últimas (Fig. II-77).

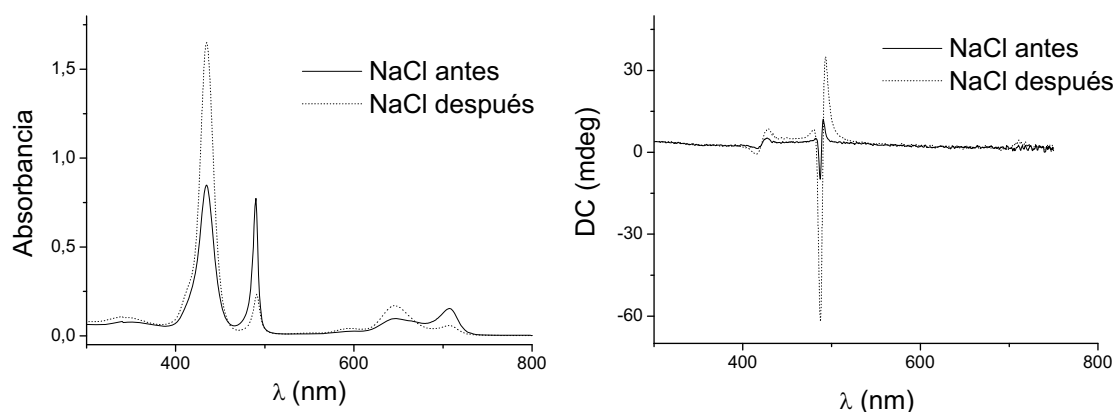


Fig. II-77 Espectros UV-Vis y de DC (Dicroísmo Circular) para soluciones de la serie A (NaCl antes) y B (NaCl después) a pH 2,9, con una concentración final de porfirina $4 \mu\text{M}$ y utilizando una solución madre de Na_4TPPS_4 $8 \times 10^{-4} \text{ M}$.

Se realizaron también experimentos de Dicroísmo Lineal (DL) de estas mismas soluciones (Fig. II-78) observando que no presentaban señal.

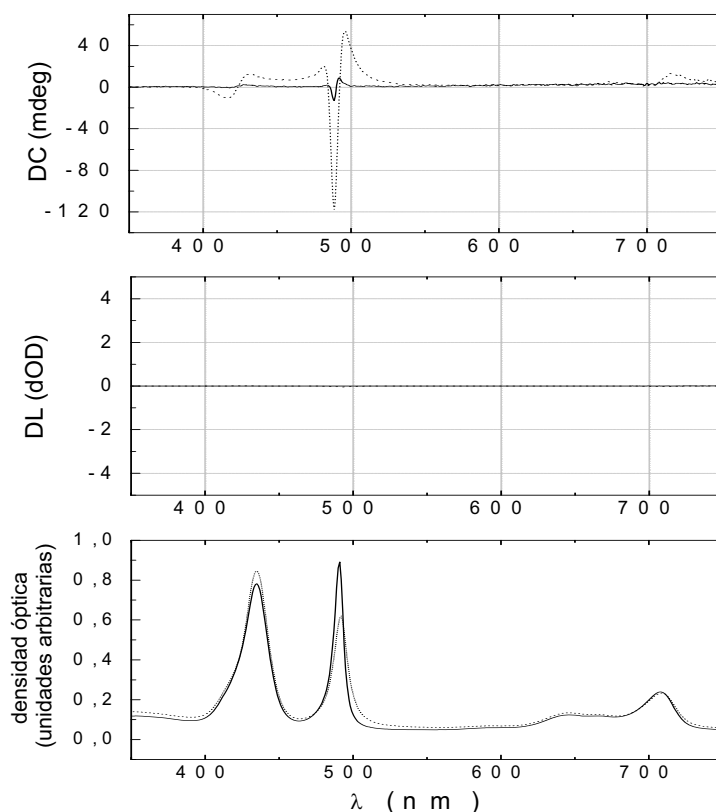


Fig. II-78 Espectros de DC (Dicroísmo Circular), DL (Dicroísmo Lineal) y de UV-Vis de dos soluciones: (—) de la serie A (NaCl antes); y (.....) de la serie B (NaCl después) a pH 1,9, con una concentración final de porfirina $4 \mu\text{M}$ y utilizando una solución madre de Na_4TPPS_4 $8 \times 10^{-4} \text{ M}$.

En todos los experimentos de DC realizados para estas soluciones, las señales bisignadas observadas presentan siempre el mismo signo de quiralidad excitónica (positiva). Esto se observó trabajando con cualquier concentración final de porfirina (por encima o por debajo de $3 \mu\text{M}$). Este hecho sugirió una nueva hipótesis para explicar las diferencias observadas en la agregación de Na_4TPPS_4 según el orden de adición NaCl/porfirina utilizado: la posible interacción con un tercer componente. Este tercer componente sería la contaminación biológica, que actuaría como plantilla en el proceso de autoensamblaje y explicaría el por qué siempre se obtiene, en las condiciones experimentales utilizadas, el mismo signo de quiralidad excitónica para las bandas bisignadas observadas por DC. Los diferentes medios de dilución así como la solución madre de Na_4TPPS_4 se prepararon un día antes de realizar las diferentes medidas espectroscópicas, por

tanto se favorecería la presencia de contaminación de origen biológico (las imágenes de AFM mostradas más adelante para el H₂O recién obtenida y después de un día lo corroboran). En cambio cuando realizamos experimentos en condiciones diferentes, por ejemplo sin preparar estas soluciones un día antes de realizar las medidas, las señales bisignadas observadas presentaban ambos signos de quiralidad excitónica aleatoriamente. La presencia de contaminación biológica sería mejor detectada en las soluciones de la serie B (NaCl después). Por ello los agregados formados en las soluciones de esta serie (NaCl después) presentarían mayores señales de RLS y DC, debido a la mayor presencia de contaminantes biológicos actuando como plantilla en el proceso de autoensamblaje. De confirmarse esta hipótesis, la porfirina anfifílica Na₄TPPS₄ se convertiría en sensor potencial de contaminación biológica. La importancia de este último supuesto nos ha llevado a seguir trabajando en esta dirección y actualmente se están realizando estudios en nuestro grupo sobre la posibilidad de utilizar esta porfirina anfifílica como sensor de quiralidad.

II.2.8.3.3. Microscopia de Fuerzas Atómicas (AFM)

Los resultados obtenidos mediante las diversas técnicas espectroscópicas utilizadas (UV-Vis, RLS, DC y DL) nos llevaron a realizar también experimentos de AFM de estas soluciones (con una concentración de Na₄TPPS₄ superior a 3 μM) para observar de manera directa la estructura de los homoasociados generados en ambos casos (serie A: NaCl antes; y serie B: NaCl después). Una diferencia sustancial en las mesofases obtenidas podría explicar el diferente comportamiento observado por espectroscopia según el orden jerárquico de adición de NaCl y Na₄TPPS₄.

Siguiendo el procedimiento experimental descrito anteriormente (véase apdo. II.2.8.1.) preparamos dos soluciones en las mismas condiciones experimentales a pH 1,9 a partir de una misma solución madre de Na₄TPPS₄ 8 x 10⁻⁴ M y con una concentración final de porfirina de 4 μM. La única diferencia en estas

dos soluciones fue el orden de adición NaCl / Na₄TPPS₄. Realizamos la deposición de 50 µL de estas soluciones sobre grafito (HOPG) durante 1 min y obtuvimos las imágenes de la Fig. II-79. En estas imágenes de AFM de los depósitos de las soluciones de las series A y B no se detectaron homoasociados en forma de cintas, y únicamente se observaron partículas irregulares con diferencias significativas en tamaño en diferentes zonas de una misma muestra. El hecho de no observar cintas justifica la ausencia de señal de DL para estas soluciones (véase Fig. II-78; pág. 142).

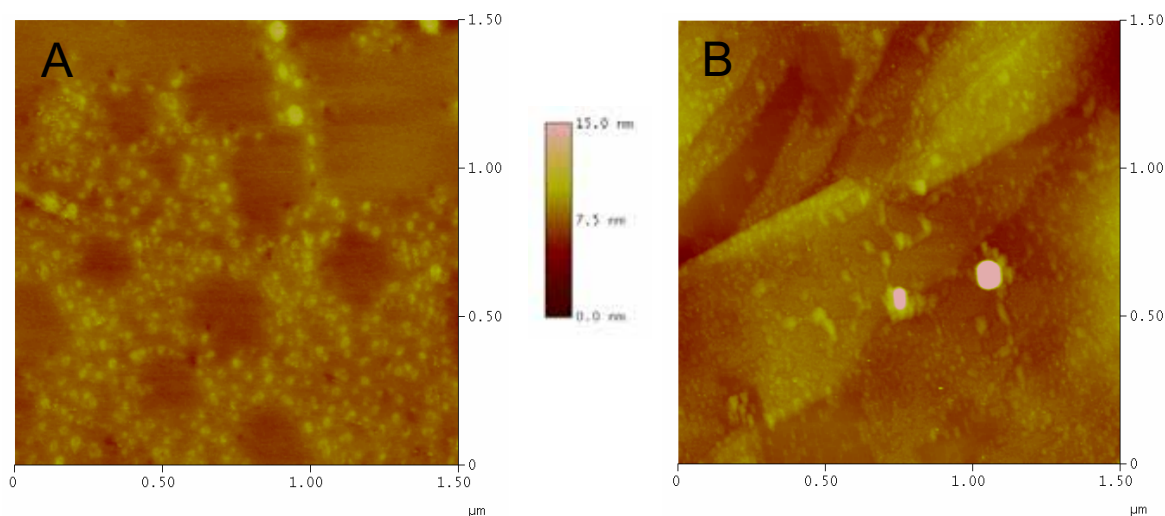


Fig. II-79 Imágenes de AFM ($1,5 \mu\text{m} \times 1,5 \mu\text{m}$) del depósito durante 1 min de dos soluciones $4,0 \mu\text{M}$ de Na₄TPPS₄ preparadas en las mismas condiciones experimentales (pH 1,9, solución madre de Na₄TPPS₄ $8 \times 10^{-4} \text{ M}$) excepto el orden de adición NaCl/porfirina: A) NaCl antes; y B) NaCl después.

También realizamos un estudio por AFM del H₂O utilizada para estos experimentos y de dos soluciones de la serie A (NaCl antes) y B (NaCl después), preparadas exactamente igual las soluciones que acabamos de estudiar por AFM pero sin añadir porfirina (Fig. II-80). Mientras para la solución blanco de la serie A se añadió el NaCl cuando se preparó (un día antes de la medida), para la solución blanco de la serie B se añadió un día después de su preparación, justo antes de la medida por AFM. En cuanto al H₂O se estudió recién obtenida del aparato Millipore y después de un día.

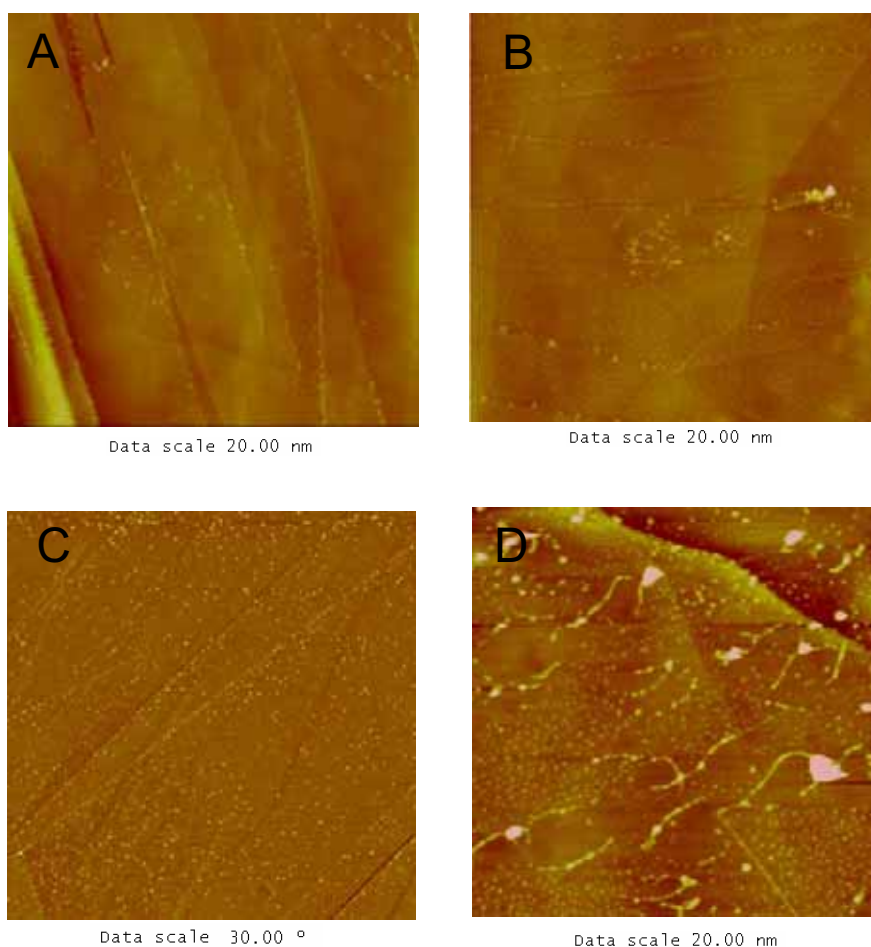


Fig. II-80 Imágenes de AFM ($5 \mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$) del depósito durante 1 min de: A) H_2O recién obtenida; B) H_2O después de un día; C) solución blanco de la serie A (NaCl antes); y D) solución blanco de la serie B (NaCl después). La imagen C es de fase y el resto son de altura.

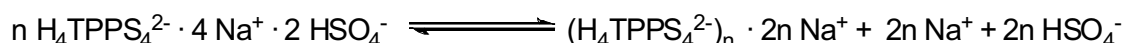
Se observó un cierto número de partículas en la deposición del H_2O fresca (Fig. II-80A) que aumentó tras un día (Fig. II-80B). Para las deposiciones de las soluciones blanco de las series A (NaCl antes) y B (NaCl después) se obtuvieron imágenes diferentes. Al añadir el NaCl más tarde se obtuvieron un mayor número de partículas y éstas eran de mayor tamaño. La comparación de las Fig. II-80C y II-80D sugiere un efecto debido a la diferente osmolaridad de las soluciones, puesto que al adicionar el NaCl 3 M durante un cierto tiempo existen concentraciones locales de sal de concentración muy superior a la de osmolaridad.

II.3. SUMARIO DEL CAPÍTULO II

Hemos determinado el pK_a para la Na_4DPPS_4 , a partir de medidas espectroscópicas de UV-Vis, obteniendo los valores aproximados $pK_{a3} = 5,6 \pm 0,2$ (monoácido) y $pK_{a4} = 4,1 \pm 0,2$ (diácido) para $\lambda_{anal.} = 414$ nm y $pK_{a(1/2)} = 3,7 \pm 0,2$ [$pK_{a(1/2)} = (pK_{a3} + pK_{a4})/2$] para $\lambda_{anal.} = 433$ nm. Estos resultados confirman que el monocatión (H_3P^+) y el monómero base-libre (H_2P) absorben en la misma región del espectro. Además la detección de dos pK_a diferenciados en dos unidades de pH contrasta con los valores de pK_a de porfirinas sustituidas en *meso* por grupos arilo⁸⁴, en donde sólo es posible la detección de una única transición promedio debido a la poca diferencia entre los valores de pK_{a3} y pK_{a4} . La presencia de los grupos sulfonato unidos directamente en las posiciones *meso* convierte en más básico el anillo de porfirina para la primera protonación, lo cual sugiere que el efecto de disminución de la basicidad para la segunda protonación es consecuencia de factores de tipo estérico (conformación de anillo de la porfirina triprotonada). También hemos realizado una estimación del $pK_{a(1/2)}$ para las porfirinas H_nTPPS_n ; $n = 3, 4$ obteniendo un valor de $5,0 \pm 0,2$ para la H_4TPPS_4 y $4,9 \pm 0,2$ para la H_3TPPS_3 , valores similares o en todo caso mayores a los reportados previamente para la Na_4TPPS_4 . Esto implica que los pasos de mono- y diprotonación son simultáneos, una tendencia común en porfirinas *meso*-tetrasustituidas.^{127,128} Hemos estudiado también la dependencia con la temperatura del $pK_{a(1/2)}$ de H_4TPPS_4 y $NaTPPS_4$ (acidificada con H_2SO_4) sin observar diferencias significativas entre ellas. Ambas mostraron una dependencia remarcable del $pK_{a(1/2)}$ con la temperatura, con una variación de hasta una unidad de pH en margen pequeño de temperaturas (25-85°C).

Se ha estudiado el comportamiento en solución acuosa de las porfirinas en forma de ácido sulfónico H_4TPPS_4 y H_3TPPS_3 por espectroscopia UV-Vis para determinar la influencia de la naturaleza de los iones presentes a través de la comparación con sus respectivas sales sódicas (Na_4TPPS_4 y Na_3TPPS_3). La

presencia de J-agregados se observó a partir de concentraciones 0,1 mM para H_4TPPS_4 y 0,02 mM para H_3TPPS_3 , a un orden de magnitud mayor respecto sus sales sódicas (0,01 mM para Na_4TPPS_4 y 0,002 mM para Na_3TPPS_3). Aparte de efectos debido a la fuerza iónica de las soluciones, en el caso de las porfirinas en forma de sal sódica, el sistema presenta una contribución entrópica favorable a la agregación como consecuencia de la liberación de iones hacia el seno de la disolución.



En cambio para las porfirinas en forma de ácido sulfónico (H_nTPPS_n ; $n= 3, 4$), no hay segregación de pares iónicos hacia la solución en el proceso de autoensamblaje, y por tanto la homoasociación no está tan favorecida y tiene lugar a concentraciones mayores en comparación con sus respectivas sales sódicas (Na_nTPPS_n ; $n= 3, 4$).

El estudio de las porfirinas anfifílicas (H_nTPPS_n ; $n= 3, 4$) en estado sólido mostró la importancia de los efectos hidrofóbicos en la estabilidad de los J-agregados y su carácter de cristal líquido liotrópico puesto que su estabilidad depende de la presencia del solvente. Cuando hay presente una cantidad de H_2O menor que la requerida para estabilizar los J-agregados, las especies zwitteriónicas (H_nTPPS_n ; $n= 3, 4$) también se estabilizan intermolecularmente lado-a-lado, pero formando agregados de menor extensión. Los cálculos aproximados para estimar la interacción de acoplamiento excitónico para H_nTPPS_n ; ($n= 3, 4$) sugieren que la banda obtenida a 455 nm se puede atribuir a un dímero formado por dos porfirinas en su forma ácida zwitteriónica. El comportamiento por UV-Vis de pastillas de KBr de H_nTPPS_n ($n= 3, 4$) muestra que posiblemente la banda obtenida a 426 nm es atribuible a un dímero formado por dos porfirinas en forma base-libre.

Al trabajar con cubetas de cuarzo para espectroscopia UV-Vis de paso estrecho (0,01 cm y 0,001 cm) hemos comprobado que se observa una mayor proporción de agregado al disminuir el espesor de la cubeta. Este fenómeno se podría explicar por una selección por capilaridad de tamaño de las partículas en el proceso de llenado de las cubetas. Sin embargo, evidencias de estudios actuales atribuyen la causa del fenómeno observado a la posible interacción entre la capa eléctrica de la superficie de cuarzo y las moléculas de porfirina, esta interacción provocaría una floculación local en la superficie.

También se ha observado una interacción de los ácidos sulfónicos H_4TPPS_4 y H_3TPPS_3 con las paredes de los recipientes de vidrio. El almacenamiento durante varias semanas de soluciones diluidas de H_4TPPS_4 en viales de vidrio topacio resultó en la formación de una metaloporfirina de Si. Además se ha detectado la adsorción de una monocapa de porfirina en su forma monomérica neutra sobre superficies de cuarzo. Esta monocapa, fuertemente adsorbida (no se elimina con H_2O , sino únicamente con soluciones ácidas o salinas), sirve como sustento para la adsorción de más capas de porfirina neutra y también sirve de punto de anclaje para la adsorción de J-agregados (las capas adicionales de porfirina neutra y de agregado se eliminan bien con lavados con H_2O pura).

La evolución en solución acuosa de la homoasociación de H_4TPPS_4 y H_3TPPS_3 fue mucho más lenta en comparación con Na_4TPPS_4 y Na_3TPPS_3 y el estado estable final no se alcanzó ni tras varias semanas (esta lenta evolución no ha sido observada con las porfirinas en forma de sal sódica). Esto ha permitido estudiar la evolución de las mesofases con el tiempo y hemos confirmado la presencia de diferentes etapas jerárquicas de la agregación. Los últimos estadios de agregación muestran una evolución más lenta que los primeros pasos y que el rápido equilibrio ácido/base inicial.

El estudio realizado mediante AFM de esta evolución de las diferentes mesoestructuras obtenidas en depósitos de soluciones acuosas indica que las principales mesofases obtenidas para H_4TPPS_4 fueron cintas que con el tiempo sólo aumentaron su longitud pero mantuvieron una altura y ancho constantes. En

cambio para la H_3TPPS_3 en un primer estadio se observan cintas rectas que evolucionan con el tiempo plegándose. Se ha propuesto un modelo de bicapa para los agregados de ambas especies (H_nTPPS_n ; $n= 3, 4$) que difiere en la naturaleza de su interficie, iónica para los homasociados de H_4TPPS_4 e hidrofóbica para los de H_3TPPS_3 . Las imágenes de AFM también mostraron la formación con ambas porfirinas de una monocapa a partir del monómero ácido zwitteriónico sobre la superficie de HOPG. El estudio por STM de estas capas resultó infructuoso probablemente por la naturaleza dieléctrica de estas porfirinas anfifílicas.

Hemos estudiado el efecto de la agitación en soluciones agregadas de H_nTPPS_n ($n= 3, 4$). En ambos casos la agitación favoreció la homoasociación y la dispersión de partículas. Los agregados de H_4TPPS_4 no muestran plegamiento espontáneo ni inducido por la agitación. El único efecto observado de la agitación es la obtención de una distribución de longitudes de partícula más pequeña ($\leq 2 \mu\text{m}$) debido a la ruptura mecánica de los agregados. Los agregados de H_3TPPS_3 muestran plegamiento espontáneo con el tiempo. La agitación de soluciones agregadas de esta porfirina acelera el proceso de plegamiento y fomenta la formación de estructuras plegadas regulares en comparación con las estructuras plegadas irregulares generadas en las soluciones en reposo. Experimentos de agitación en el rotaevaporador evidenciaron la existencia de una anchura crítica de las cintas de H_3TPPS_3 (aprox. 28 nm) para que se produzca el plegamiento. Por debajo, en cambio, se forman estructuras en zigzag sin plegamiento. Esto sugiere que la transición a formas plegadas viene determinada por factores entrópicos. Al agitar soluciones concentradas de H_3TPPS_3 se consiguió una selección estadística del signo de quiralidad de las bandas de DC según el sentido de agitación utilizado. Esta selección resultó ser opuesta a la obtenida en los resultados previos para las rotaevaporaciones de Na_3TPPS_3 .¹⁵³ Esto sugiere que el efecto tiene lugar en el flujo laminar ascendente de las paredes del recipiente.

Los resultados obtenidos son un ejemplo experimental de cómo el flujo de agitación^{157,158} puede seleccionar entre diferentes rutas en un proceso de autoensamblaje, y por tanto entre diferentes polimorfos supramoleculares.

Por último en el estudio del proceso de autoensamblaje de Na_4TPPS_4 hemos detectado una influencia jerárquica del orden de adición NaCl /porfirina en el comportamiento de agregación. Por debajo de una concentración final de porfirina de $3 \mu\text{M}$ se puede llegar a escoger la especie resultante dependiendo del orden de adición. En este rango de concentraciones ($< 3 \mu\text{M}$) la adición del NaCl antes que la porfirina muestra la aparición de J-agregados mientras que al adicionar primero la porfirina estos no se detectan. Por encima de esta concentración final crítica ($> 3 \mu\text{M}$) también se han observado diferencias en el comportamiento de homoasociación. Hemos propuesto una hipótesis basada en la presencia de semillas de pequeños agregados en la solución madre neutra de Na_4TPPS_4 . Estos pequeños agregados se acidificarían al disolverlos en el medio acuoso tamponado y el efecto de apantallamiento que ejercerían los iones del NaCl en la disociación de estos pequeños agregados sería la causa del diferente comportamiento al adicionar el NaCl antes o después. Otra de las hipótesis presentadas sugiere la importancia de la interacción con un contaminante desconocido de origen biológico presente en trazas en el agua ultra pura. Este contaminante actuaría por efecto plantilla favoreciendo la agregación. La presencia de NaCl evitaría la proliferación de esta contaminación debido a efectos de tipo hipotónico.