



UNIVERSITAT DE BARCELONA



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

Parte Experimental

1. Disolventes y reactivos

El CH₂Cl₂ para síntesis (Scharlau) se secó previamente durante 12 horas sobre K₂CO₃ y posteriormente fue destilado sobre K₂CO₃ a oscuras. El CH₂Cl₂ para cromatografía líquida (LiChrosolv, Merck) se utilizó sin ningún tipo de tratamiento previo. El CHCl₃ para síntesis (SDS) se secó previamente sobre K₂CO₃ durante 1 hora, se filtró y se dejó durante 24 horas sobre CaCl₂ anhidro, antes de proceder a su destilación a oscuras en una columna de relleno (560 mm x 60 mm) a una velocidad de salida de cabeza de columna de 1-2 gotas por segundo (imprescindible para separar las parafinas). El CHCl₃ destilado se estabilizó añadiendo un 0,5% de EtOH. Para obtener CHCl₃ libre de EtOH se procedió a su filtración a través de una columna de alúmina (Al₂O₃) de actividad I (siempre desechamos la primera fracción eluida, por la posible presencia de H₂O). El AcOEt utilizado (99%, Panreac) se utilizó directamente, sin ningún tratamiento previo. El *n*-hexano para síntesis (Scharlau) fue previamente destilado en una columna de relleno (560 mm x 60 mm) a una velocidad de salida de cabeza de columna de 1-2 gotas por segundo. El resto de disolventes utilizados en la síntesis de porfirinas y en las reacciones de sulfonación fueron de calidad para análisis y se utilizaron sin ningún tratamiento previo. El agua desionizada se obtuvo de un aparato Millipore Super Q.

El H₂SO₄ (95-97%, Scharlau), el HCl (37%, Scharlau), el TFA (99%, Acros) y las sales inorgánicas utilizadas fueron de calidad analítica. Para la síntesis de TPP se utilizó 2,3,5,6-tetracloro-1,4-benzoquinona o *p*-cloranilo (99%, Fluka) como oxidante y para la síntesis de TTBP se utilizó 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona o DDQ (98%, Acros). El BF₃·Et₂O (Acros) se utilizó sin ningún tratamiento previo, el pirrol comercial (99%, Acros) y el benzaldehído (98%, Acros) y pivalaldehído (o trimetilacetaldehído, 97%, Aldrich) fueron destilados

previamente. En las reacciones de sulfonación de la DPP se han utilizado H₂SO₄ (30% SO₃, Sigma-Aldrich), Py·SO₃ (48,8-50,3% SO₃ activo; Acros) y SO₃ estabilizado (99%, Aldrich).

Los disolventes deuterados utilizados en RMN-¹H fueron CDCl₃, CD₃OD (ambos enriquecidos isotópicamente en un 99,80%, Acros), DMSO- *d*₆ (99,9%, Aldrich) y D₂O (99,97%, Euriso-top).

Para el estudio de la influencia del orden jerárquico de adición de NaCl en la formación de diferentes J-agregados, en el laboratorio de Catania se han utilizado HCl (37%, Carlo-Erba), NaOH (97%, Aldrich), NaCl (99,5%, Sigma), ácido cítrico (para análisis, Carlo-Erba), CH₃COONa (para análisis, Carlo-Erba) y sal tetrasódica de la *meso*-tetraquis(4-sulfonatofenil)porfirina (Na₄TPPS₄·12,5 H₂O, Mid-Century). En los mismos experimentos de comparación realizados en Barcelona se utilizaron HCl (37%, Scharlau), NaOH (Escuder), NaCl (99,99%, Merck), ácido cítrico (99%, Panreac) y la sal tetrasódica de la *meso*-tetraquis(4-sulfonatofenil)porfirina (Na₄TPPS₄) obtenida en nuestro laboratorio como se detalla más adelante.

El monoestearato de 1-glicerilo en su forma racémica (99%, Sigma) y su enantiómero, el 3-*sn*-monoestearato de glicerilo (> 99%, BioChemika) se utilizaron sin ningún tratamiento previo. Para los experimentos con estos compuestos se utilizó CHCl₃ (para análisis, J. T. Baker). Las fotografías para el estudio del ángulo de contacto de estos monoglicéridos fueron realizadas con una cámara Nikon D70 con objetivo macro (75 mm).

2. Síntesis, purificación y caracterización

2.1. Porfirinas insolubles en H₂O

2.1.1. Síntesis, purificación y caracterización de la 5,10,15,20-tetrafenilporfirina (TPP)

Este producto se ha sintetizado siguiendo el método descrito por Lindsey.²⁵⁻²⁷ En un matraz de dos litros y tres bocas equipado de refrigerante Dimroth, tubo de

cloruro cálcico (CaCl_2), entrada de N_2 y agitación magnética, que contiene 1 L de CH_2Cl_2 ; 1,04 mL de pirrol (15 mmol) y 1,53 mL de benzaldehído (15 mmol), se burbujeó nitrógeno durante 15 min y después se añadieron 0,4 mL de una disolución de $\text{BF}_3\cdot\text{Et}_2\text{O}$ (2,5 M) en CH_2Cl_2 . La mezcla resultante se agitó magnéticamente durante una hora a temperatura ambiente en atmósfera de nitrógeno. A continuación se añadieron 2,77 g (11 mmol) de 2,3,5,6-tetracloro-1,4-benzoquinona (o *p*-cloranilo) y se calentó a reflujo durante una hora. La mezcla resultante se rotaevaporó a sequedad y el crudo de reacción se limpió con MeOH y se pasó por una columna de Florisil de 20 cm x 3 cm (altura x radio) utilizando como eluyente CH_2Cl_2 , o bien $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{AcOEt}$, 95:5 para que la porfirina baje más rápidamente. En estas condiciones se recoge TPP y las impurezas quedan retenidas en cabeza de columna.

La porfirina resultante se purificó disolviéndola en la mínima cantidad de CHCl_3 caliente y se hizo precipitar añadiendo 3 veces el mismo volumen de MeOH. El precipitado, se lavó y centrifugó dos veces con MeOH y se secó sobre parafinas en el desecador. Se obtuvieron 0,74 g (1,2 mmol) de TPP (Rdto.= 32%) en forma de cristales de color violeta.

CCDA ($\text{SiO}_2/\text{CH}_2\text{Cl}_2$): $R_f = 0,86$; ($\text{SiO}_2/\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{C}_6\text{H}_{14}$ 1:1): $R_f = 0,53$.

UV-Vis [CHCl_3 , $\lambda_{\text{máx.}}$ (ϵ), 2×10^{-6} M]: 417 (488500), 514 (823200), 550 (9600), 589 (6950), 645 (4600) nm.

FT-IR (KBr, cm^{-1}): 1469, 1444, 971, 800, 700.

RMN- ^1H (200 MHz, CDCl_3/TMS , δ ppm, 25°C): 8,84 (s., 8H, β -pirrólicos); 8,21 (m., 8H; *o*-Ph); 7,75 (m., 12H, *p* y *m*-Ph); -2,21 (s., 2H, NH).

2.1.2. Síntesis, purificación y caracterización de la 5,10,15,20-tetraquis(*tert*-butil)porfirina (TTBP)

Esta porfirina se ha preparado mediante el método descrito por Smith³⁷ que es una modificación del método general de condensación de Lindsey.²⁵

En un matraz de dos litros y tres bocas equipado de refrigerante Dimroth, tubo de cloruro cálcico (CaCl_2), entrada de Ar y agitación magnética, que contiene 1 L de CH_2Cl_2 , se burbujeó argón durante 30 min. Luego añadimos 10,5 mL de pirrol (0,15 mol), 16,8 mL de pivalaldehído (0,15 mol) y 3,5 mL de una disolución de $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (28 mmol). La mezcla resultante se agitó magnéticamente durante 12 horas a temperatura ambiente en atmósfera de argón. A continuación se añadieron 26,06 g (0,11 mol) de 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona (o DDQ) y se calentó a reflujo durante una hora manteniendo la agitación. La mezcla resultante se concentró a aproximadamente 200 mL en el rotaevaporador y se pasó por una columna de alúmina básica (grado III) de 35 cm x 3 cm (altura x radio) utilizando como eluyente CH_2Cl_2 . En estas condiciones las impurezas polares quedaron retenidas en cabeza de columna y recogimos una fracción verde oscura con el crudo de porfirina. El crudo obtenido se pasó a través de una columna de alúmina básica (grado III) utilizando como eluyente una mezcla de CH_2Cl_2 :*n*-hexano (2:1, v/v). Fueron necesarias varias columnas como ésta antes de recrystalizar en una mezcla de CH_2Cl_2 :*n*-hexano el crudo obtenido. Se obtuvieron 3,0 g (5,61 mmol) de TTBP (Rdto.= 15%).

CCDA (Al_2O_3 / *n*-hexano: CH_2Cl_2 7:1): $R_f = 0,45$.

UV-Vis [CHCl_3 , $\lambda_{\text{máx.}}$ (ϵ), 5×10^{-6} M]: 446 (186209), 552 (7079), 596 (3981), 628 (3020), 691 (1995) nm.

RMN- ^1H (200 MHz, CDCl_3 /TMS, δ ppm, 25°C): 9,07 (s., 8H, β -pirrólicos); 2,01 (s., 36H, CH_3); 1,52 (s., b. a., 2H, NH).

2.1.3. Obtención de porfina

Seguimos el método propuesto por Neya,⁸ a partir de la de-*tert*-butilación de la *meso*-tetraquis(*tert*-butil)porfirina TTBP.

Se disolvieron 180 mg de TTBP en una mezcla de H_2SO_4 (8 mL):1-butanol (8 mL) que se calentó en un baño de aceite a 90°C durante 15 min con agitación. La mezcla cambió de un color verde oscuro a un color rojizo y luego se dejó

enfriar a temperatura ambiente y se añadieron 40 mL de MeOH y 200 mL de CHCl_3 . Se realizaron varios lavados con una solución de NaHCO_3 y luego con H_2O hasta la neutralidad y se llevó a sequedad la fase orgánica. Lavamos el crudo obtenido con pequeños volúmenes de MeOH en la centrífuga hasta que éste quedó incoloro y lo purificamos pasándolo a través de una columna de sílica-gel de 35 cm x 2 cm (altura x radio) con CHCl_3 . Recogimos la primera banda rojiza, la llevamos a sequedad y recristalizamos con $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ obteniendo una mezcla de porfina y mono-*meso-tert*-butilporfirina (MTBP). Este último producto de reacción no reportado por Neya presenta un espectro UV-Vis prácticamente igual al de la porfina pero es claramente diferenciado por RMN- ^1H . A partir del espectro de RMN- ^1H vimos que la proporción obtenida de porfina:MTBP era 1:7, por lo tanto este método constituye una síntesis eficiente del producto mono-*tert*-butilado pero no de porfina tal como han corroborado otros estudios⁵⁰ sobre esta reacción propuesta por Neya. Se ha probado una *de-tert*-butilación similar a la propuesta por Neya sustituyendo el H_2SO_4 conc. por ácido trifluoroacético (TFA) sin obtener resultados positivos.

CCDA ($\text{SiO}_2/\text{CHCl}_3$): $R_f = 0,48$.

UV-Vis [CHCl_2 , $\lambda_{\text{máx.}}$ (ϵ): 394 (272000), 489 (16400), 519 (3200), 560 (5400), 568 (4800), 613 (1100) nm.

RMN- ^1H (400 MHz, CDCl_3/TMS , δ ppm, 25°C): 10,35 (s., 4H, H_{meso}); 9,52 (s., 8H, β -pirrólicos); -3,98 (s., b. a., 2H, NH).

2.2. Sulfonación de porfirinas: obtención de porfirinas solubles en H_2O

2.2.1. Sulfonación de 5,10,15,20-tetrafenilporfirina (TPP)

2.2.1.1. Síntesis, purificación y caracterización de la sal tetrasódica de la 5,10,15,20-tetraquis(4-sulfonatofenil)porfirina (Na_4TPPS_4)

La síntesis se realizó a partir de la TPP en las condiciones previamente descritas en la literatura,^{46,198,199} las cuales fueron optimizadas en nuestro grupo.^{47,84,200,201}

Una disolución de 1 g (1,63 mmol) de 5,10,15,20-tetrafenilporfirina (TPP) en 25 mL de H₂SO₄ (96%) se calentó bajo agitación magnética a 100°C durante 6 horas en un matraz de 100 mL con un tubo de cloruro cálcico (CaCl₂). La mezcla de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente con agitación magnética durante 12 h más. Después se paró la reacción vertiendo la mezcla sobre 75 mL de agua fría. Una vez a temperatura ambiente se centrifugó el crudo obtenido.

Este crudo, de color verde, se neutralizó con una disolución saturada de NaHCO₃ hasta que se observó un viraje de color del verde de la porfirina ácida diprotonada al marrón-rojizo propio de la porfirina base libre. Esta solución se purificó según el procedimiento siguiente. La adición de MeOH a la disolución neutra hizo precipitar la mayor parte del Na₂SO₄ subproducto de la reacción. Éste se separó por filtración y se lavó también con MeOH. Después se evaporó a presión reducida a sequedad, se extrajo la posible TPP sin reaccionar con CH₂Cl₂ y se rotaevaporó a sequedad la disolución acuosa que contenía la porfirina sulfonada. El producto se pasó varias veces por una columna de fase reversa (Polygoprep 100-50, C-18) eluyendo con H₂O:MeOH 9:1 aumentando después el gradiente de MeOH hasta un 100% para bajar más rápido todo el producto y así separar un subproducto detectado por HPLC justo después de la Na₄TPPS₄ a unos niveles de concentración muy bajos. Del crudo obtenido se eliminaron las sales inorgánicas por cromatografía en una columna de MCI Gel CHP20P. La elución con agua eliminó gran cantidad de sales y finalmente la porfirina se eluyó con una mezcla MeOH:H₂O (1:1). La fracción obtenida se concentró y liofilizó. Se obtuvieron 1,26 g de Na₄TPPS₄ (1,2 mmol; Rdto.= 76%) en forma de polvo microcristalino de color violeta.

UV-Vis [H₂O, λ_{máx.} (ε), 2 x 10⁻⁶ M]: 414 (482300), 516 (16700), 553 (6800), 580 (6400), 636 (3800) nm.

FT-IR (KBr, cm⁻¹): 3445, 1650, 1477, 1130.

RMN-¹H (500 MHz, 9 x 10⁻³ M, D₂O, DSS, δ ppm, 25°C): 7,66 (d., 8H, *o*-SPh, J≈ 7Hz); 8,21 (d., 8H, *m*-SPh, J≈7 Hz); 8,80 (b. a., 8H, β-pirrólicos del monómero); 7,19 (b. a., 8H, β-pirrólicos del agregado).

EM [ES(-), MeOH/H₂O 1:1, m/z]: 488(10) [M-2Na⁺]²⁻, 477(4) [M-3Na⁺+H⁺]²⁻, 466(2) [M-4Na⁺+2H⁺]²⁻, 318(49) [M-3Na⁺]³⁻, 310(15) [M-4Na⁺+H⁺]³⁻, 288(19), 283(50) [M-4Na⁺-SO₃]³⁻, 279(6), 232(100) [M-4Na⁺]⁴⁻, 156(4) [PhSO₃]⁻.

2.2.1.2. Síntesis, purificación y caracterización de la sal trisódica de la 5-fenil-10,15,20-tris(4-sulfonatofenil)porfirina (Na₃TPPS₃)

Las condiciones para la obtención y purificación de la Na₃TPPS₃ fueron optimizadas previamente en nuestro grupo.^{47,124,202,203}

Una mezcla de 575 mg de TPP (0,94 mmol) y 15 mL de H₂SO₄conc. (96%) se dejó bajo agitación magnética durante 1 hora a temperatura ambiente y después se dejó reaccionando a 4°C durante 27 horas. Seguidamente, la mezcla se añadió lentamente sobre 250 mL de agua fría. Una vez a temperatura ambiente se centrifugó el crudo obtenido. El exceso de ácido se neutralizó con Na₂CO₃ y NaHCO₃. El punto final de la neutralización vino indicado por el cambio de color, de verde (porfirina protonada) a marrón (porfirina neutra). A fin de eliminar la TPP no sulfonada se extrajo ésta con CH₂Cl₂ hasta que la fase orgánica no presentó color. La fase acuosa, que contenía las sales y la mezcla de porfirinas sulfonadas, se rotaevaporó a sequedad y se calentó a reflujo con 50 mL de MeOH. Se filtró en caliente y el MeOH que contenía la mezcla de porfirinas sulfonadas se rotaevaporó a sequedad. Para la separación de estas porfirinas sulfonadas se siguió básicamente el procedimiento descrito en la literatura⁸² y optimizado en nuestro grupo.⁴⁷ Se cromatografió en una columna de media presión de 5 cm de diámetro y de 690 mL de volumen de sílica C-18 (Polygoprep 100-50). La columna se estabilizó previamente con MeOH:tampón fosfato 0,01 M (pH= 6,8) 1:1. El residuo seco del reflujo con MeOH se disolvió en la mínima cantidad de la misma mezcla de eluyentes con la cual se estabilizó la columna cromatográfica y se llevó a cabeza de columna. Con un 50% de MeOH se recogió una fracción con Na₃TPPS₃, la cual en algunas ocasiones apareció también en las fracciones siguientes. Cuando se aumentó la proporción de MeOH hasta un 100% directamente, sin realizar ningún tipo de gradiente se eluyó una fracción

mayoritaria que contenía el resto de porfirinas (disulfonadas: Na₂TPPS_{2ady}, Na₂TPPS_{2op} y monosulfonada: NaTPPS₁). Durante esta operación se produjo una pérdida de la sílica de la columna. Finalmente se eluyó con CH₂Cl₂ para limpiar la columna y la posible porfirina sin sulfonar. Siempre se obtiene más cantidad de disulfonada adyacente que de opuesta, y aproximadamente en relación 2:1, lo cual indica que la reacción de sulfonación sigue términos estadísticos. Generalmente es necesario pasar estas porfirinas más de una vez por la columna de C-18. Una vez pura, la porfirina (Na₃TPPS₃) se pasó por una columna de MCI Gel CHP20P para separarla de las sales. Primero se eluyeron las sales con agua y después la porfirina con una mezcla MeOH:H₂O 1:1. Se obtuvieron 70 mg de Na₃TPPS₃ (0,08 mmol; Rdto.= 8%).

UV-Vis [H₂O, λ_{máx.} (ε), 1 x 10⁻³ M]: 409 (230000), 520 (7000), 560 (5000), 588 (3000), 648 (300); [EtOH, λ_{máx.} (ε), 1 x 10⁻³ M]: 415 (260000), 511 (18600), 554 (13000), 590 (12000), 646 (10800) nm.

FT-IR (KBr, cm⁻¹): 3434, 1596, 1396, 1188, 1126.

RMN-¹H (500 MHz, 6 x 10⁻³ M, D₂O, DSS, δ ppm, 67°C): 7,28 (d., 4H, *o*-SPh_{ady}, J≈ 7 Hz); 7,50 (d., 2H, *o*-Ph); 7,55 (t., 2H, *m*-Ph); 7,76 (t., 1H, *p*-Ph); 7,79 (d., 2H, *o*-SPh_{op}); 7,83 (d., 4H, *m*-SPh_{ady}, J≈ 7 Hz); 8,11 (d., 2H, *m*-SPh_{op}, J≈8 Hz); 8,31 (b. a., 8H, β-pirrólicos).

2.2.2. Sulfonación de DPP

2.2.2.1. Síntesis, purificación y caracterización de la sal tetrasódica de la 5,15-disulfonato-10,20-bis(4-sulfonatofenil)porfirina (Na₄DPPS₄)

Las condiciones de sulfonación para la obtención de Na₄DPPS₄ son las estudiadas previamente en nuestro grupo.⁴⁹

En un matraz de 100 mL equipado con agitador magnético, refrigerante y una trampa de cloruro cálcico anhidro (CaCl₂), se disolvieron 500 mg (1,08 mmol) de 5,15-difenilporfirina (DPP), sintetizada previamente en nuestro grupo, en 50 mL de una mezcla de sulfonación de H₂SO₄ (SO₃ 30%) / MeOH, 9:1. Se dejó reaccionar el sistema a temperatura ambiente y con agitación durante 20 min.

Transcurrido este tiempo se paró la reacción diluyéndola en agua fría (~ 250 mL) y se neutralizó con una disolución saturada de NaHCO₃ sin previa centrifugación. A continuación se extrajo con CH₂Cl₂ la DPP que no había reaccionado. Se rotaevaporó la fase acuosa a sequedad y se agregó MeOH para disolver las porfirinas sulfonadas y separar así parte de las sales (Na₂SO₄). La purificación del crudo se realizó mediante cromatografía en columna de fase reversa (Polygoprep 100-50, C-18) eluyendo con tampón fosfato 0,01 M (pH= 6,8) / MeOH 9:1 y fueron necesarias varias columnaciones para purificar el crudo obtenido. El producto final se purificó de sales inorgánicas en una columna de MCI Gel CHP20P usando un gradiente de elución H₂O:MeOH (de 1:0 a 0:1). No obstante, el análisis por HPLC del producto obtenido verificó que no teníamos Na₄DPPS₄ pura. En principio mediante el método de análisis descrito previamente en nuestro grupo⁴⁹ obteníamos un cromatograma con un solo pico obteniendo un rendimiento de Na₄DPPS₄ del 30%, pero al aplicar otro método de análisis con un gradiente más progresivo conseguimos un aumento de resolución y aparecieron varios picos (todo lo relativo al análisis por HPLC y los diferentes gradientes utilizados se explica más adelante en el apartado 3 de esta parte experimental). Pese a estos inconvenientes, con este método experimental se han obtenido fracciones puras de Na₄DPPS₄ que han permitido su caracterización. Debido a los problemas de regioselectividad de la reacción hemos realizado varias pruebas de cara a obtener esta porfirina con mayor rendimiento y reproducibilidad.

UV-Vis [H₂O, $\lambda_{\text{máx.}}$ (ϵ), 4 x 10⁻⁶ M]: 414 (120000), 518 (5500), 559 (3300), 584 (2900), 640 (1500) nm.

UV-Vis [MeOH, $\lambda_{\text{máx.}}$ (ϵ), 2 x 10⁻⁶ M]: 414 (191000), 514 (11000), 551 (5600), 593 (4400), 648 (2500) nm.

FT-IR (KBr, cm⁻¹): 1190, 1124, 1040, 1013.

RMN-¹H (500 MHz, 6 x 10⁻⁵ M, CD₃OD, δ ppm, 25°C): 10,52 (d., 4H, H_{C2,C8,C12,C18}, J= 5,2 Hz); 8,78 (d., 4H, H_{C3,C7,C13,C17}, J= 5,2 Hz); 8,36 (m., 8H, *o,m*-SPh).

NOESY-¹H (500 MHz, CD₃OD, 25°C): H_{2,8,12,18} ↔ H_{3,7,13,17} ↔ H_{*o,m*-SPh}.

2.2.2.2. Pruebas de sulfonación de 5,15-difenilporfirina (DPP)

2.2.2.2.1. Reacción con una mezcla de H_2SO_4 (30% SO_3): MeOH (1:1)

En un matraz de 100 mL equipado con agitador magnético y una trampa de cloruro cálcico anhidro ($CaCl_2$), se disolvieron 460 mg (0,99 mmol) de 5,15-difenilporfirina (DPP), sintetizada previamente en nuestro grupo, en 50 mL de una mezcla de sulfonación de H_2SO_4 (SO_3 30% / MeOH, 1:1 a $0^\circ C$ en un baño de hielo. Durante los 5 primeros minutos tras la adición de la mezcla de sulfonación se mantuvo el sistema a $0^\circ C$ y luego se dejó reaccionar el sistema a temperatura ambiente y con agitación durante 25 min. Transcurrido este tiempo se paró la reacción diluyéndola en agua fría (~ 250 mL) y se observó un sólido en suspensión que resultó ser el producto de partida DPP. Se neutralizó con una disolución saturada de $NaHCO_3$ sin previa centrifugación. A continuación se extrajo con CH_2Cl_2 toda la DPP, lo que confirmó que no se había producido sulfonación alguna y recuperamos toda la porfirina de partida.

2.2.2.2.2. Reacción con el complejo $Py \cdot SO_3$ en Py y en CH_2Cl_2

Con piridina (Py) como solvente: en un matraz de fondo cónico se disolvieron 5,3 mg de DPP (11 μ mol) en 2 mL de Py, obteniendo una solución de color violeta oscuro. Se añadió una suspensión de 11,1 mg (70 μ mol) del complejo de $Py \cdot SO_3$ (48,8 – 50,3% SO_3 activo) en 3 mL de Py.

Con CH_2Cl_2 como solvente: se disolvieron 5,1 mg (11 μ mol) de DPP en 1 mL de CH_2Cl_2 (solución de color violeta oscuro) y se adicionó una suspensión de 14,2 mg (89 μ mol) del complejo de $Py \cdot SO_3$ (48,8 – 50,3% SO_3 activo) en 2 mL de CH_2Cl_2 .

En ambos casos seguimos la reacción a temperatura ambiente durante varias horas extrayendo alícuotas del sistema que neutralizamos con una solución de $NaHCO_3$. Tras realizar una extracción con CH_2Cl_2 se analizó la fase acuosa por

HPLC sin detectar la presencia de porfirinas sulfonadas solubles en H₂O. Se probó de añadir más proporción de Py·SO₃ y realizar la reacción a reflujo sin detectar ninguna porfirina sulfonada en ninguno de los dos solventes. También se probó de adicionar en los dos casos unas gotas de H₂SO₄ conc. para activar la reacción sin resultado positivo. Sólo conseguimos acidificar la porfirina obteniendo una solución de tonalidad verde característica de su forma ácida H₄DPP²⁺ y en el caso de utilizar Py como solvente se forma sulfato de piridinio.

2.2.2.2.3. Reacción con una mezcla de H₂SO₄ (30% SO₃): MeOH (8:2)

En un matraz de 5 mL con refrigerante Dimroth, agitador magnético y una trampa de cloruro cálcico anhidro (CaCl₂), se disolvieron 5 mg (10,8 mmol) de 5,15-difenilporfirina (DPP), sintetizada previamente en nuestro grupo, en 1 mL de una mezcla de sulfonación de H₂SO₄ (SO₃ 30%) / MeOH, 8:2. Se dejó reaccionar el sistema a temperatura ambiente y con agitación durante 1h 40 min. Cada 20 min fuimos extrayendo alícuotas del sistema, las neutralizamos con una solución de NaHCO₃ y tras una extracción con CH₂Cl₂ analizamos la fase acuosa por HPLC. No se mejoró la regioselectividad respecto a la reacción con mezcla H₂SO₄ (SO₃ 30%)/MeOH, 8:1, seguimos obteniendo un amplio abanico de especies sulfonadas muy difíciles de separar por cromatografía en columna. Además por HPLC detectamos menos del 10% de Na₄DPPS₄ y en cambio en la zona de las porfirinas trisulfonadas detectamos varios picos en mayor proporción.

2.2.2.2.4. Reacción con SO₃

Se han realizado varias pruebas disolviendo pedazos de SO₃ sólido en H₂SO₄ conc. en un baño de hielo, e incluso se han probado reacciones en un sistema cerrado a temperatura ambiente con la DPP y el SO₃ en estado sólido, creando una atmósfera de SO₃ debido a su relativamente elevada presión de vapor [P_v(SO₃ forma β, 25°C)= 344 mm Hg]. Debido a la difícil manipulación del SO₃ sólido resulta imposible reproducir las mismas condiciones experimentales y

optamos por trabajar con el SO_3 en forma líquida. El SO_3 sólido utilizado (forma alotrópica β) se presenta en forma de agujas con una $T_f = 32,5^\circ\text{C}$, en líquido en cambio se encuentra en su forma alotrópica γ . Tras varias pruebas se decidió utilizar una mezcla de sulfonación de $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{SO}_3$ 19:1 licuando el SO_3 a su forma γ para su preparación. Realizamos varias pruebas a pequeña escala variando la proporción $\text{DPP}:\text{SO}_3$ y la temperatura inicial (-20°C ; 0°C ; y 10°C). Las mejores condiciones de cara a la obtención de Na_4DPPS_4 se obtuvieron con una relación $\sim 1:40$ de $\text{DPP}:\text{SO}_3$ realizando la reacción durante 1 h y la adición de la mezcla de sulfonación a 0°C con un rendimiento del 60%. Los resultados, no obstante, mostraron muy poca reproducibilidad como se observó previamente para las reacciones de sulfonación de DPP con H_2SO_4 conc. en nuestro grupo.⁴⁹

Realizamos la reacción a mayor escala. Se disolvieron 50,2 mg (109 μmol) de DPP en un matraz con 20 mL de CH_2Cl_2 conectado a un embudo de presión compensada. Obtuvimos una solución de color violeta intenso que se llevó a 0°C en un baño de hielo. Se añadieron lentamente y con agitación 3,5 mL de la mezcla $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{SO}_3$ 19:1 (4,31 mmol SO_3) manteniendo una relación $\text{DPP}:\text{SO}_3 \sim 1:40$. Se mantuvo el sistema en el baño de hielo durante los primeros 20 min y luego se dejó a temperatura ambiente durante 40 min. Se paró la reacción neutralizando el sistema con una solución acuosa de NaHCO_3 a 0°C y se realizaron extracciones con CH_2Cl_2 para aislar la DPP que no había reaccionado. Se rotaevaporó la fase acuosa a sequedad y se agregó MeOH para disolver las porfirinas sulfonadas y separar así parte de las sales. La purificación del crudo se realizó mediante cromatografía en columna de fase reversa (Polygoprep 100-50, C-18) eluyendo con tampón fosfato (pH= 6,8) y fueron necesarias varias columnaciones para purificar el crudo obtenido. El producto final se purificó de sales inorgánicas en una columna de MCI Gel CHP20P usando un gradiente de elución $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ (de 1:0 a 0:1). Se obtuvieron 20 mg (22 μmol) de Na_4DPPS_4 (Rdto.= 21%) cuya caracterización ya se ha detallado anteriormente (véase apdo. 2.2.2.1.).

2.2.3. Prueba de sulfonación de porfina

Disolvimos 10 mg de porfina (32 μmol) en 2 mL de CH_2Cl_2 en un matraz con atmósfera de Ar que se introdujo en un baño de hielo a 0°C . Fuimos añadiendo lentamente y con agitación 1152 μL de una mezcla $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{SO}_3$ 19:1 (1,29 mmol SO_3) manteniendo una relación $\sim 1:40$ de porfina: SO_3 . Tras realizar la adición se llevó el sistema a una temperatura de -27°C durante 1h. Luego la reacción se llevó de nuevo a 0°C y se paró con una solución de NaHCO_3 . A continuación se realizaron extracciones con CH_2Cl_2 observando que prácticamente no quedaba porfina sin reaccionar mientras la fase acuosa presentaba un color violeta oscuro típico de las porfirinas sulfonadas. Al analizar la fase acuosa se detectaron varios productos de sulfonación poniendo de nuevo en relieve el difícil control de las reacciones con SO_3 . Estas porfirinas sulfonadas aún no han sido identificadas pero parecen confirmar la sulfonación en *meso*.

2.3. Obtención y caracterización de la 5,10,15,20-tetraquis(4-sulfofenil)porfirina (H_4TPPS_4) y la 5-fenil-10,15,20-tris(4-sulfofenil)porfirina (H_3TPPS_3)

Se disolvieron 10 mg de Na_nTPPS_n ($n= 3, 4$) en aproximadamente 3 mL de H_2O y se pasaron a través de una columna de intercambio catiónico Dowex 50WX4: 200/400 *mesh* (forma ácida: 11 mL; 12,1 meq) utilizando H_2O como eluyente.

La elución de H_4TPPS_4 requiere 5 mL H_2O y se obtiene una solución opaca de color verde oscuro con una concentración entre 1 mM y 1,5 mM. En el caso de la H_3TPPS_3 se necesitan 20 mL de agua, pero se recogieron sólo los primeros 5 mL eluidos de columna para las soluciones de trabajo (conc. aprox: 1 mM – 1,5 mM). Estas soluciones pueden ser usadas directamente para estudios en solución o bien pueden ser liofilizadas o rotaevaporadas a muestras sólidas.

Tabla 1 Datos de UV-Vis y pK_a de las especies de 4-sulfofenilporfirina.^a

| Compuesto | Solvente | Especies | Banda B, nm ^b | Bandas Q, nm | $pK_{a(1/2)}$ ^c |
|----------------------------------|-------------------------------|---|--------------------------|-----------------------|----------------------------|
| H ₄ TPPS ₄ | H ₂ O | H ₂ TPPS ₄ | 414 | 516, 552, 583, 637 | 5,0 |
| | | zwH ₄ TPPS ₄ | 434 | 595, 645 | |
| | | J-agregado | 491 | 635, 707 e | |
| | Pastillas KBr ^d | H ₂ TPPS ₄ | 424 | e | |
| | | zwH ₄ TPPS ₄ ^f | 455 | 602, 676 | |
| | sólido ^g | zwH ₄ TPPS ₄ ^f | 465 | 607, 681 | |
| H ₃ TPPS ₃ | H ₂ O | H ₂ TPPS ₃ | 414 | 515, 553, 581, 636 | 5,0 |
| | | zwH ₄ TPPS ₃ ^f | 434 | 597, 646 | |
| | | J-agregado | 489 | 635, 709 | |
| | Pastillas KBr ^d | H ₂ TPPS ₃ | 424 | e | |
| | | zwH ₄ TPPS ₃ ^f | 454 | 602, 673 | |
| | sólido ^g | zwH ₄ TPPS ₃ ^f | 464 ^h | f | |

^a Las especies aparecen en diferentes relaciones dependiendo de la concentración total de porfirina (véase apdo. II.2.2.1).

^b Los valores de ϵ son similares para las especies monoméricas ($\approx 480000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y no se pueden estimar para los J-agregados de elevado peso molecular.

^c Determinado como el valor de pH en el rango de concentraciones $[\text{zwH}_4\text{TPPS}_n]/[\text{H}_2\text{TPPS}_n] = 1$. La $[\text{H}_3\text{O}^+]$ se calculó a partir de la estequiometría de ionización de H₂TPPS_n and zwH₄TPPS_n (n= 3, 4).

^d Las especies H₂TPPS_n (n= 3, 4) sólo pueden ser observadas en pastillas de KBr diluidas.

^e No determinado a causa de la interferencia con las bandas de otras especies.

^f Probablemente un dímero.

^g Sólido fino obtenido por liofilización entre placas de metacrilato.

^h Presente junto con las especies J-agregadas.

H₄TPPS₄

UV-Vis: λ , nm (ver Tabla 1 más arriba).

RMN-¹H (500 MHz; 3,5 mM; DMSO-*d*₆; TMS; δ ppm, 60°C): 8,83 (s., 8 H, β -pirrólicos); 8,36 y 8,19 (2 b. a., 16H, H fenílicos); correspondientes (UV-Vis) a una mezcla a 25°C de un 30% de H₂TPPS₄ y 70% de zwH₄TPPS₄.

FT-IR (KBr, cm⁻¹): 1229, 1188, 1168 y 1030 (SO₃⁻ aromático).

Análisis elemental calcd. (%) para C₄₄H₃₀N₄O₁₂S₄·11H₂O (1133,2): C 46,64%; H 4,63%; N 4,94%; S 11,32%; determ. exp.: C 47,54%; H 4,71%; N 4,93%; S 11,07%.

H₃TPPS₃

UV-Vis: λ , nm (ver Tabla 1 previa).

RMN-¹H (500 MHz; 5,6 mM; DMSO-*d*₆; TMS; δ ppm; 60°C): 8,83 (s., 4 H; β -pirrólicos, 2 anillos); 8,82 (centro de un sistema AB, 4 H; β -pirrólicos, 2 anillos); 8,3; 8,26; 8,12; y 7,89 (banda muy ancha, 17H, H fenílicos), correspondientes (UV-Vis) a una mezcla a 25°C de aprox. 50% de H₂TPPS₃, un 25% de zWH₄TPPS₃ y un 25% de J-agregados.

FT-IR (KBr, cm⁻¹): 1229, 1188, 1168 y 1030 (SO₃⁻ aromático).

Análisis elemental calcd. (%) para C₄₄H₃₀N₄O₉S₃·7H₂O (981,0): C 53,87%; H 4,52%; N 5,71%; S 9,81%; determ. exp.: C 52,90%; H 4,41%; N 5,45%; S 9,60%.

3. Técnicas cromatográficas

Para la cromatografía en capa delgada analítica (CCDA) se han utilizado cromatofolios de aluminio de gel de sílice (60-17 μ m) de 0,2 mm de espesor con indicador de fluorescencia (F₂₅₄, SDS) y cromatofolios de aluminio con Al₂O₃ neutro (tipo E, 60 μ m) de 0,2 mm de espesor con indicador de fluorescencia (F₂₅₄, Merck).

Como soportes para las cromatografías en columna se han utilizado: Florisil (60-100 *mesh*, SDS), SiO₂ (60 A CC, 40-60 μ m, 230-240 *mesh*, SDS), Al₂O₃ activado básico 50 Å (Alfa-Aesar) y Al₂O₃ 90 activado básico (0,063-0,200 mm) actividad I (Merck) (estos soportes cromatográficos de óxido de aluminio fueron desactivados cuando fue necesario mediante adición del %H₂O necesaria para la obtención de un grado Brockmann III), sílica gel Polygoprep 100-50 C-18 (50-100 μ m, Macherey-Nagel), y para la separación de sales MCI Gel CHP20P (DIONA, 75-150 μ m, Supelco). El soporte utilizado para la columna de intercambio catiónico fue una resina Dowex 50WX4 (200-400 *mesh*, Fluka).

Además para la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se utilizó una columna analítica de fase reversa C-18 de 250 mm x 4 mm (Nucleosil 120-5, Scharlab) equipada con una precolumna analítica (Resolve C18, Waters) en un equipo Shimadzu equipado con un detector UV-Vis (SPD-6AV), 2 bombas LC-10 AS y un programador Shimadzu Class VP.

Los eluyentes que se utilizaron fueron MeOH y una disolución tampón de pH= 6,8; que se preparó a partir de 7 mL de una disolución acuosa al 40% en peso ($d= 0,99$ g/mL) de hidróxido de tetrabutilamonio, 0,2 mL de una disolución de ácido fosfórico (85%) ($d= 1,68$ g/mL) y 3,72 g de la sal disódica del ácido etilendiamintetraacético ($\text{EDTANa}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Las disoluciones de elución se filtraron y se desgasificaron inmediatamente antes de usarlas. Los productos utilizados en la preparación de los tampones para la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y la cromatografía líquida preparativa de media presión (MPLC) fueron de calidad analítica: *HPLC*; $(\text{Bu})_4\text{NOH}$ (40%, Acros), H_3PO_4 (85%, Acros), $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (99%, Panreac), y *MPLC*; Na_2HPO_4 y NaH_2PO_4 (ambos 99%, Sigma).

3.1. Análisis por HPLC

3.1.1. Porfirinas sustituidas en las posiciones *meso* por grupos fenilo y 4-sulfonatofenilo (Na_4TPPS_4 , Na_3TPPS_3 , $\text{Na}_2\text{TPPS}_{2\text{ady}}$, $\text{Na}_2\text{TPPS}_{2\text{op}}$ y NaTPPS_1)

Se eluyó con un flujo de $0,6 \text{ mL min}^{-1}$ inyectando volúmenes de $10 \mu\text{L}$ y se aplicó un gradiente de MeOH del 50% al 100% en 30 min. Esta concentración se mantuvo durante 15 min más. Después de cada análisis la columna se llevó, en 5 min, a la proporción inicial de 50% de MeOH y se equilibró antes de cada inyección por lo menos durante 10 min con la proporción inicial (50% MeOH).

En estas condiciones experimentales la Na_4TPPS_4 se eluye a un tiempo de retención de 16 min (Fig. 1) seguida por la Na_3TPPS_3 a 21 min, la $\text{Na}_2\text{TPPS}_{2\text{op}}$ a 25 min, la $\text{Na}_2\text{TPPS}_{2\text{ady}}$ a 28 min, la NaTPPS_1 a 34 min y finalmente la TPP a 52 min (Fig. 2).

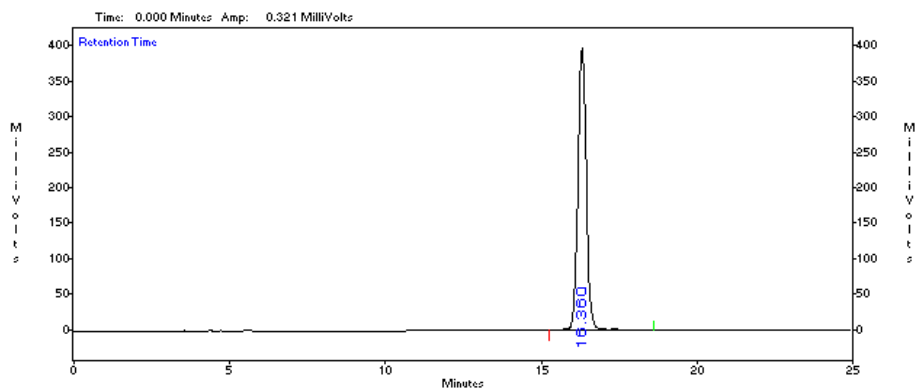


Fig. 1 Cromatograma de una muestra de Na_4TPPS_4 según las condiciones experimentales del texto.

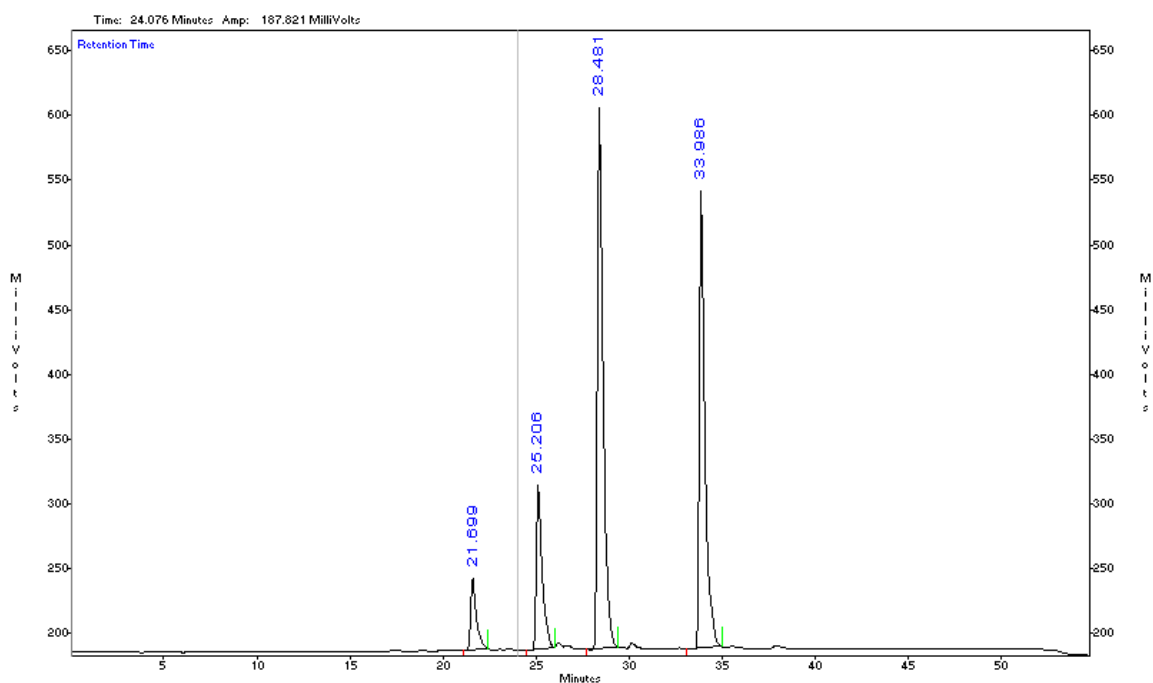


Fig. 2 Cromatograma de una mezcla de Na_3TPPS_3 , Na_2TPPS_{2op} , Na_2TPPS_{2ady} y $NaTPPS_1$ (de menor a mayor tiempo de retención) según las condiciones experimentales del texto.

3.1.2. Sal tetrasódica de la 5-15-disulfonato-10,20-bis(4-sulfonatofenil)-porfirina (Na_4DPSP_4)

Se eluyó con un flujo de $0,6 \text{ mL min}^{-1}$ inyectando volúmenes de $10 \mu\text{L}$. En un principio se aplicó un gradiente de MeOH del 70% al 90% en 4 min. Durante

los siguientes 4 min se volvió a las condiciones iniciales (70% MeOH) y después se equilibró el sistema antes de cada inyección como mínimo durante 7 min manteniendo las proporciones iniciales. En estas condiciones experimentales la Na_4DPPS_4 se eluye a un tiempo de retención de 2,8 min.

Pero al aplicar un método de análisis por HPLC diferente (Fig. 3B), con un gradiente más progresivo, el cromatograma obtenido era bastante diferente al obtenido utilizando las condiciones de análisis anteriormente descritas.

Con este nuevo método se aplicó un gradiente de MeOH del 50% al 60% en 10 min. Durante los 10 min siguientes se elevó progresivamente la proporción de MeOH hasta un 80% y a los 30 min se alcanzó un 90% de MeOH. Se mantuvo esta proporción durante 3 min y de nuevo se llevó la columna a un 50% de MeOH. Después se equilibró antes de cada inyección por lo menos durante 5 min con la proporción de eluyentes inicial (50% MeOH).

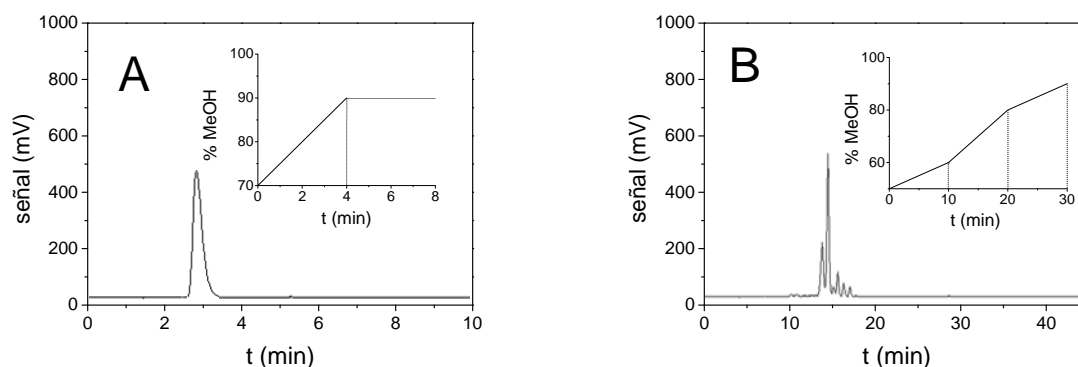


Fig. 3 Cromatogramas obtenidos por cromatografía HPLC del producto de síntesis de la Na_4DPPS_4 analizado siguiendo diferentes métodos.

4. Instrumentación

4.1. pH-metro

Las medidas de pH fueron realizadas en un pH-metro CRISON Micro pH 2000 (electrodo de vidrio (Crisol nº 52-04) a temperatura ambiente). El pH-metro fue calibrado antes de cada medida con soluciones tampón de pH= 4 y pH= 7 (Metrohm).

4.2. Espectrometría de Masas (EM)

Los espectros de masas de las porfirinas sulfonadas se realizaron en un espectrómetro Waters ZQ (Waters) con la técnica electrospray y en iones negativos: MeOH/H₂O 1:1, gas nebulizador N₂ a 63 L·h⁻¹, gas de secado N₂ a 312 L·h⁻¹, temperatura de la fuente 150°C, voltaje capilar 2,5 KV y voltaje focal 30 V.

Los espectros de impacto electrónico (EM-IE) se realizaron en un espectrómetro de masas ThermoFinnigan TRACE DSQ con introducción directa de la muestra (1 µL o 3 µL) en sonda por deposición (DEP), una temperatura de la fuente de 250°C y una energía de los electrones de 70 eV.

4.3. Resonancia Magnética Nuclear de ¹H (RMN-¹H)

Los espectros de RMN-¹H se registraron en los equipos Varian Unity Plus de 300 MHz, Varian Gemini 200 MHz, Varian Mercury 400 MHz y Bruker DMX-500 (500 MHz).

4.4. Agitadores magnéticos

Los agitadores magnéticos (SBS) utilizados en los experimentos de inducción quiral del agregado de la H₃TTPS₃ presentan la posibilidad de agitar en ambos sentidos: horario y antihorario. Hemos utilizado tubos de microcentrífuga de plástico de 2 mL (Sorenson, BioScience) de 3,5 cm de altura; 0,9 cm de diámetro interno y de base cónica plana (0,2 cm) y núcleos magnéticos cilíndricos de PTFE con una longitud de 5 mm y un diámetro de 2 mm.

4.5. Rotaevaporadores

Los rotaevaporadores utilizados en los experimentos relacionados con la inducción quiral por agitación del homoasociado de H_3TPPS_3 fueron Büchi Rotavapor R-200, ambos equipados con un regulador de la velocidad de giro, un baño termostatzado a $25^\circ C$ y un dispositivo para posibilitar su rotación en ambos sentidos (CW y ACW).

4.6. Medidas espectroscópicas

4.6.1. Espectroscopia UV-Vis

Los espectros UV-Vis han sido realizados en un espectrofotómetro Cary-Varian 5E de doble haz, controlado por el programa Scan Varian versión 01.00(6). Las cubetas utilizadas fueron de cuarzo Suprasil (Hellma) tipo *QS* y *QX*. Se han utilizado cubetas con diferentes pasos de luz y por: 0,001 cm ($2,6 \mu L$); 0,01 cm ($26 \mu L$); 0,1 cm ($350 \mu L$); 0,5 cm ($1750 \mu L$); 1 cm ($3500 \mu L$ y $1400 \mu L$). De las cubetas de ventanas separables y pasos de luz de 0,001 cm y 0,01 cm disponíamos de dos tipos, con y sin tubos de entrada y salida (Fig. 4; Hellma).



Fig. 4 Esquema de los dos modelos de cubetas utilizados de camino óptico $l = 0,01$ cm.

Todos los espectros fueron registrados a temperatura ambiente a excepción de los del estudio espectroscópico de la influencia de la temperatura sobre las porfirinas zwitteriónicas para el cual se utilizó un bloque multicelda termostatzado.

En los espectros UV-Vis realizados en Catania se utilizó un espectrofotómetro JASCO V-530 de un mono-haz, controlado por el programa Jasco versión 1.59.0 (protocolo versión 2).

4.6.1.1. Determinaciones espectrofotométricas de pK_a

Para la Na_4DPPS_4 se prepararon soluciones de una misma concentración $5,5 \times 10^{-6}$ M a partir de una misma solución madre. En la serie de espectros se realizó el espectro de la porfirina base libre, el de su diácido conjugado en estado puro y los de soluciones de pH intermedios cercanos al valor del pK_a . Para ello se han utilizado las soluciones tampón indicadas en la Tabla 2. Los valores de pH de las soluciones tampón se determinaron con un pH-metro recién calibrado.

Tabla 2 Soluciones tampón preparadas.

| <i>n° solución</i> | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|----------------------------------|---------------------------------------|------|------|------|-------------------------|------|------|------|------|------|
| <i>pH_{experimental}</i> | 7,09 | 6,84 | 6,51 | 6,10 | 6,12 | 5,83 | 5,59 | 5,37 | 5,11 | 4,91 |
| <i>disolución tampón</i> | KH ₂ PO ₄ 0,1 M | | | | bifalato potásico 0,1 M | | | | | |
| | NaOH 0,1 M | | | | | | | | | |

| <i>n° solución</i> | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 |
|----------------------------------|-------------------------|------|------|------|-----------|------|-----------|------|------|
| <i>pH_{experimental}</i> | 4,69 | 4,50 | 4,28 | 4,06 | 3,97 | 3,19 | 2,77 | 2,34 | 1,62 |
| <i>disolución tampón</i> | bifalato potásico 0,1 M | | | | | | KCl 0,2 M | | |
| | NaOH 0,1 M | | | | HCl 0,1 M | | | | |

Para el estudio de los equilibrios ácido/base de los correspondientes ácidos sulfónicos (H_nTPPS_n ; $n= 3, 4$) en ausencia de iones distintos a los generados por la propia ionización de estas sustancias se trabajó a concentraciones que proporcionan soluciones libres de J-agregados. Esto requirió rangos de concentración distintos para cada una de las dos porfirinas. Las concentraciones se determinaron exactamente por espectroscopia UV-Vis y los valores de pH se calcularon a partir de las concentraciones de porfirina base libre y diprotonada. Para la H_4TPPS_4 hemos considerado 2 moles de H_3O^+ por mol de la especie

diprotonada ($\text{zWH}_4\text{TPPS}_4$) y 4 moles de H_3O^+ por mol de la especie base libre (H_2TPPS_4) y para la H_3TPPS_3 , 1 mol de H_3O^+ por mol de monómero ácido ($\text{zWH}_4\text{TPPS}_3$) y 3 moles de H_3O^+ por mol de base libre (H_2TPPS_3).

Los valores aparentes de pK_a [correspondientes a $(\text{pK}_{a3} + \text{pK}_{a4})/2$] se han determinado por representación gráfica del pH respecto al logaritmo decimal de la relación de concentraciones de la especie base libre y la especie ácida diprotonada conjugada ($[\text{H}_2\text{P}]/[\text{H}_4\text{P}^{2+}]$) de acuerdo con:

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log \frac{[\text{H}_2\text{P}]}{[\text{H}_4\text{P}^{2+}]}$$

Usamos valores de concentraciones en lugar de actividades. El cociente de concentraciones se determinó a partir de las diferencias de absorbancia (A) a una longitud de onda determinada, que se elige para que se produzca la mayor diferencia entre las absorbancias de las especies base libre y diácida.

$$\frac{[\text{H}_2\text{P}]}{[\text{H}_4\text{P}^{2+}]} = \frac{A - A_{\text{H}_4\text{P}^{2+}}}{A_{\text{H}_2\text{P}} - A}$$

4.6.2. Dicroísmo Circular y Lineal

Los espectros de dicroísmo circular (DC) y lineal (DL) se han registrado en un dicrógrafo JASCO J-810 equipado con una lámpara de Xe de 150 W (*air cooled*) y controlado con el programa Windows Spectra Analysis V.1.53.04.

Los espectros se registraron a temperatura ambiente y en las condiciones siguientes; velocidad de registro de 50 nm/min, ancho de banda (*band width*) de 1 nm, respuesta del instrumento de 2 s, sensibilidad de 1000 mdeg y resolución de 0,5 nm.

En los experimentos de dicroísmo circular realizados en Catania también se utilizó un dicrógrafo JASCO J-810 similar al utilizado en Barcelona. Los espectros se registraron a temperatura ambiente y en las condiciones siguientes: velocidad de

registro 200 nm/min; ancho de banda (*band width*) de 2 nm; respuesta del instrumento de 0,5 s; sensibilidad de 1000 mdeg; y resolución de 0,5 nm.

4.6.3. Espectroscopia FT-IR

Los espectros de infrarrojo de las diferentes porfirinas se han registrado en un espectrofotómetro Nicolet 510 FT-IR controlado a través de un ordenador equipado con un programa Nicolet Mac.

4.6.4. Espectroscopia de *Resonance Light Scattering* (RLS)

En cuanto a los experimentos de RLS realizados en Catania hemos utilizado tres instrumentos diferentes: a) un espectrofluorímetro Jobin Yvon Horiba FL3-11 de geometría en forma de L, controlado a través de un ordenador equipado con el programa SpectrAcq V.4.13d.; b) otro espectrofluorímetro idéntico a éste pero modificado para permitir el trabajo en modo de *backscattering*, (permitiendo detectar la luz de *scattering* en la misma dirección del haz incidente y sentido opuesto); y c) un espectrofluorímetro JASCO FP-777.

4.7. Espectrometría Fotelectrónica de Rayos X (XPS)

Los espectros de XPS fueron obtenidos en un equipo Physical Electronics (PHI 5500 Multitechnique System) utilizando el software MultipaK v.6.0A, de Physical Electronics. Se ha trabajado en una cámara a ultra alto vacío (UHV) $< 1 \times 10^{-9}$ Torr con una radiación AlK_{α} como fuente de excitación monocromática de rayos X a una potencia de 350 W (12,4 kV; 25 mA). El equipo fue calibrado usando la línea Ag $3d_{5/2}$ con una anchura máxima a media altura del pico (FWHM) de 0,5 eV. El analizador de electrones opera en modo de energía de paso constante (a menor energía de paso se consigue una mayor resolución energética), lo que

permite una resolución energética constante a lo largo de todo el intervalo de energías medido (entre 0 y 1100 eV). Para el espectro de mayor resolución la energía de paso fue de 23,5 eV (0,1 eV/paso) y para el espectro general, de menor resolución, fue de 187,8 eV (0,8 eV/paso). El área de análisis fue de unos 0,5 mm² y no se observaron efectos de carga electrostática significativos en la medida. En la cuantificación de las intensidades se utilizaron los correspondientes factores de sensibilidad.¹³³ Los espectros fueron referenciados energéticamente asumiendo que el pico del C 1s debido a la contaminación de hidrocarburos tiene una energía de enlace de 284,8 eV.

4.8. Microscopia Confocal

Se ha utilizado el microscopio confocal Leica SP2, que presenta un microscopio DM IRBE de fluorescencia donde se colocó la muestra. Ésta se observó con el objetivo de 100 aumentos (HCX PL APO 100x/1.4-0.7 OIL CS). Se excitó con un láser de Ar a $\lambda_{exc}= 458$ nm recogiendo la emisión de fluorescencia en los rangos 472-552 nm y 600-720 nm y también a $\lambda_{exc}= 488$ nm con unas lecturas de emisión de fluorescencia en los intervalos de 500-600 nm y 600-720 nm.

4.9. Microscopias de Campo Cercano (*Scanning Probe Microscopy, SPM*)

Hemos trabajado con 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.

4.9.1. Microscopia de Fuerzas Atómicas (*Atomic Force Microscopy, AFM*)

Las imágenes de AFM fueron obtenidas con un microscopio Multimode controlado por una electrónica Nanoscope IIIa (Digital Instruments, USA) operando en modo *tapping* al aire y a temperatura ambiente. La amplitud de oscilación y la velocidad de scan fueron 2-3 nm y 1,5-2 Hz respectivamente. Mediante un microscopio óptico de 450 aumentos con una microcámara digital se controló la posición de la sonda sobre la muestra. Para el control del microscopio y el tratamiento de los datos se utilizó el programa Nanoscope III v. 5.12r5.

El modo de contacto intermitente (*tapping*) se llevó a cabo utilizando sondas de Si de forma piramidal integradas sobre una micropalanca o microfleje (*cantilever*) del mismo material de una constante de fuerza (K) de 35 N/m y una frecuencia de resonancia media (f) de 300 kHz (Nanosensors, Alemania). Estas sondas de Si presentan un radio de curvatura nominal de 10 nm y un ángulo de cono de 35°. Los escáners utilizados fueron de tipo J con un rango de barrido máximo de 120 μm y de tipo E con un rango máximo de 15 μm (Digital Instruments, USA). Ocasionalmente se han utilizado otros tipos de sonda con micropalancas de menor K (NT-MDT, Rusia).

4.9.1.1. Sustratos

Los principales soportes utilizados para este tipo de técnicas han sido placas de grafito HOPG (Highly Ordered Pyrolytic Graphite) de diferentes casas comerciales: GE Advanced Ceramics, de diferentes calidades: ZYA ($0,4^\circ \pm 0,1^\circ$) y ZYB ($0,8^\circ \pm 0,2^\circ$) y MicroMasch, de grados ZYA y ZYB. Los diferentes grados de orientación del grafito están relacionados con la inclinación del corte respecto al plano basal del cristal. Un mejor grado de orientación supondrá un menor ángulo de corte que nos proporcionará terrazas atómicamente planas más amplias. Las dimensiones de las placas de HOPG empleadas son 12 mm x 12 mm

(largo x ancho) y 2 mm de grosor. También para algunos experimentos hemos utilizado como sustrato cuarzo Suprasil (QS) y silicio monocristalino (1 1 1) (Siltronix, USA).

4.9.1.2. Preparación de la muestra

El método de deposición fue el mismo para todos los soportes, con diferencias en el tratamiento del sustrato previo a la deposición. El grafito se utilizó recién clivado. El Si se trató con una solución al 40% de HF durante 20 min, se lavó con H₂O y se secó con N₂ inmediatamente. El cuarzo se lavó con H₂O y se secó con N₂. La mica fue funcionalizada con 3-aminopropil-trietoxisiloxano, primero se disolvieron 100 µL del reactivo funcionalizante (el cual había sido filtrado previamente) en 20 mL de una mezcla de EtOH/H₂O 10:1. En menos de 10 s después de la preparación de esta solución (< 10 s), se introdujo durante 1 min la superficie de mica recién clivada en la mezcla funcionalizante. Posteriormente se extrajo la superficie del baño y se lavó con una mezcla Et/H₂O 10:1 y luego se secó con flujo de N₂. Después de este tratamiento se observó en la superficie de mica un monocapa prácticamente continua en forma de islotes formada por moléculas de 3-aminopropil-trietoxisilano. Además se comprobó que la superficie estuviera libre de otras partículas.

El procedimiento de deposición fue el siguiente: una gota de solución (~ 50 µL) se puso en contacto con el sustrato pre-tratado durante tiempos que fueron de unos pocos segundos a varios minutos según se indica en cada experimento. La gota se eliminó por absorción rápida con una punta de papel de filtro y se secó inmediatamente después con un flujo de N₂.

4.9.2. Microscopia de Efecto Túnel (*Scanning Tunneling Microscopy, STM*)

Las medidas fueron realizadas en un microscopio de efecto túnel PicoSPM (Molecular Imaging, USA) controlado mediante una electrónica Nanoscope IIIa (Digital Instruments, USA). La cabeza de STM fue situada en una plataforma

suspendida para aislarla mecánicamente. Se utilizaron sondas de Pt/Ir (GoodFellow, UK) cortadas mecánicamente y escáner para alta resolución con rango máximo de 1 μm (Molecular Imaging, USA).

La preparación de la muestra para STM fue la misma que para AFM pero sólo se utilizaron sustratos de grafito (HOPG).

5. Materiales para el almacenamiento y trasvase de sulfoporfirinas

Observamos un efecto de neutralización de las sulfoporfirinas (H_3TPPS_3 y H_4TPPS_4) en contacto con material de vidrio, tal como se explica en el capítulo II. Esto nos forzó a la utilización de material plástico para la manipulación y almacenaje de estas porfirinas. Para las porfirinas en forma de sal sódica no observamos este efecto y por lo tanto en su caso trabajamos con recipientes de vidrio Pyrex y utilizamos pipetas Pasteur Ar-Glas (clase hidrolítica 3).

Hemos utilizado como material contenedor tubos cónicos con faldón de 50 mL (29 mm x 118 mm), tubos cónicos de 15 mL esterilizados, tubos cónicos de 15 mL sin esterilizar (17 mm x 122 mm), todos ellos de polipropileno transparente y tapón de polietileno (Deltalab). También hemos utilizado tubos de microcentrífuga de polipropileno de 2 mL (Sorenson, BioScience). Para la manipulación de estas soluciones, se han utilizado micropipetas (Brand y Labsystems) con puntas de polipropileno (Brand).

En algunos experimentos con estas sulfoporfirinas hemos utilizado material de vidrio Pyrex silanizado según el procedimiento que se explica a continuación. Dejamos el material a silanizar en contacto con una disolución de NaOH 20% durante unos 30 min. Lavamos el material inmediatamente con EtOH, secamos al aire y volvimos a llenar el matraz con una mezcla de $(\text{CH}_3)_3\text{SiCl}:\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 1:4 durante otros 30 min. Finalmente se lavó el matraz con EtOH y se secó de nuevo al aire.

