

UNIVERSIDAD DE BURGOS

FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Química

Área de Química Orgánica



**NUEVAS SONDAS CROMO-FLUOROGÉNICAS
A PARTIR DE DERIVADOS ORGANOPALADIO
Y COMPUESTOS INDÉNICOS**

Tesis Doctoral

Daniel Moreno Mediavilla

Burgos, 2011



UNIVERSIDAD DE BURGOS
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

D. TOMÁS TORROBA PÉREZ, Catedrático del Área de Química Orgánica del Departamento de Química de la Universidad de Burgos,

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación contenido en la Memoria “**NUEVAS SONDAS CROMO-FLUOROGÉNICAS A PARTIR DE DERIVADOS ORGANO-PALADIO Y COMPUESTOS INDÉNICOS**” que presenta el Licenciado Daniel Moreno Mediavilla para aspirar al Grado de Doctor en Ciencias Químicas por la Universidad de Burgos, ha sido realizado bajo su dirección y autoriza su presentación para que sea calificada como Tesis Doctoral.

Burgos, 1 Diciembre 2010

Fdo: Tomás Torroba Pérez



*Esta Tesis Doctoral está dedicada a la memoria de mi
amigo Carlos Sáenz de Tejada García “Panucci”,
siempre con nosotros.*

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi agradecimiento, porque sin su contribución hubiese sido imposible llevar a cabo este trabajo, a las siguientes instituciones y personas:

A la Universidad de Burgos, por haberme permitido comenzar mi “carrera investigadora” dentro de sus instalaciones.

Al Centro de I + D + i de la Universidad de Burgos, por la contribución prestada para poder elucidar las estructuras de este Trabajo de Investigación.

A la Universidad de Florencia, Italia, por haberme permitido desarrollar allí una estancia predoctoral de tres meses.

A mi director: Tomás Torroba Pérez, por haberme dirigido en todo momento para poder sacar este trabajo adelante.

Al doctor Stefano Marcaccini, del Departamento de Química Orgánica Ugo Schiff, de la Universidad de Florencia, Italia, por haberme acogido y dirigido en su laboratorio durante mi estancia predoctoral en la Universidad de Florencia. Hay cosas que no se aprenden en los libros, gracias por enseñármelo.

Al grupo del profesor Gabriel García Herbosa y muy especialmente a la doctora Olga del Campo González, por su colaboración en la parte del trabajo dedicado a las sondas cromogénicas de catión mercurio(II).

Al licenciado Eduardo Ballesteros Hernández por su contribución al estudio de la sonda fluorogénica de catión cobre(II)

Al profesor José Vicente Cuevas Vicario por la realización de los cálculos mecanocuánticos de los complejos de una sonda fluorogénica y varios aminoácidos.

A la profesora Begoña García Ruiz y al profesor Saturnino Ibeas Cortés, por su contribución al estudio de una sonda fluorogénica por la metodología stopped-flow.

A los profesores de mi grupo de investigación, Teresa, María José y Roberto; María, gracias por tu apoyo durante el trabajo y fuera de él, en los buenos momentos y también en los difíciles.

A la gente perteneciente al Área de Química Orgánica en especial a los profesores que se han portado fantásticamente conmigo y a la gente de otras Áreas de la Facultad, porque siempre han estado ahí ante cualquier necesidad.

A todos mis compañeros, los que empezaron conmigo en el laboratorio, los que me metieron el gusanillo de la investigación y el trabajo del laboratorio, gracias Sara, Pedro, Teresa. A los que me acompañaron durante estos años, gracias Balles, sabes que esta tesis también es tuya y que los años de Perezó fueron muy grandes.

A los que comparten ahora las horas de trabajo y siempre están dispuestos a echar una mano, Borja, Beatriz, Nazaret, Olga, sin vosotros esta tesis no se hubiera terminado nunca.

A los chicos del laboratorio de al lado, y del I+D, son muchos años, y miles de momentos compartidos, hemos crecido juntos, he visto como se iban doctorando uno a uno, y volaban del nido, compañeros de charlas a la hora del café, de la Magia de la Química, del club del tuperguare, de grandes cenas y de importantes congresos, gracias, Pichulos y Pichulas!! Seguiremos compartiendo lo que el tío Jack mande, aunque sea en otros lugares y en otros tiempos.

Ahora, cuando uno mira hacia atrás, se da cuenta de lo rápido que pasa el tiempo y se acuerda de cómo han cambiado las cosas a medida que se caían las hojas del calendario, de todo lo que ha pasado y como muchas personas han compartido mi vida y para todos ellos este agradecimiento que no puede ser más sincero. Ana, muchas gracias por todo.

La familia siempre está ahí y creo que este es un buen momento para agradecerles todo lo que hacen por mí día a día y que nunca soy capaz de decírselo en persona, para todos esta dedicatoria especial seguro que a todos os hace ilusión este trabajo; gracias a mis padres por su paciencia y su cariño, gracias a mi hermano porque siempre está, gracias a mis abuelos, Presen gracias por todo lo que me cuidas , también a mis tíos (Tasio te echo mucho de menos), primos, y a todos los que lamentablemente ya no se lo puedo decir en persona.

A mis amigos casi no les tengo que decir nada, porque se lo repito constantemente, me han ayudado mucho más de lo que se pueden imaginar, gracias, gracias, gracias y un abraazo. Gracias Vanesa. Esta Tesis es de todos vosotros. Gracias Tito, Kiko, Javichu, Clau, Piraña, Rodri, Panu, Nacholas, PepeNacho, Hugo, Miriam, Cris, Vicky, Rober, Peralta, Moni os “ai lou yu”. Y como no gracias a ese pequeño milagro que llegó hace unos meses para cambiarnos la vida, Dani espero que te sientas orgulloso.

A todos aquellos de los que me olvido, a todos los que de una manera directa o casual han coincidido conmigo, chocaron o me ignoraron y aun sin saberlo han influido en mi vida. Gracias!!

“Hay que dejar el camino social-alquitrinado
porque en él se nos quedan pegadas las pezuñas
hay que volar libre al sol y al viento
repartiendo el amor que tengas dentro”

Ama, ama, ama y ensancha el alma

(R. Iniesta, M. Chinato)

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1. Química supramolecular y receptores moleculares.....	1
1.1. Diseño de unidades receptoras para los distintos tipos de sustratos...	12
1.1.1. Detección de cationes.....	12
1.1.2. Detección de aniones.....	23
1.2. Detección de moléculas neutras.....	33
1.2.1. Sensores de aminas, diaminas y aminoácidos.....	35
1.2.2. Detección de agentes de guerra organofosforados.....	40
1.2.3. Detección de formaldehído.....	42
1.2.4. Detección de peróxido de hidrógeno.....	44
1.2.5. Detección de óxido nítrico y anión nitrito.....	45
1.2.6. Detección de péptidos y proteínas a través de grupos tiol....	47
1.2.7. Detección de sacáridos.....	47
2. OBJETIVOS.....	53
3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	59
PARTE I. Desarrollo de una sonda cromogénica de mercurio(II).....	59
Resultados experimentales.....	70

Estudios cualitativos.....	74
Estudio espectroscópico mediante UV-vis.....	84
Elucidación estructural.....	88
Estudios de reversibilidad.....	91
Experimentos de detección de catión metilmercurio(II).....	95
PARTE II. Desarrollo de una sonda cromo-fluorogénica de cobre(II).....	103
Resultados experimentales.....	108
Estudio de las propiedades de 5 como sensor químico.....	109
Estudio cuantitativo mediante fluorescencia.....	115
Valoraciones en resonancia magnética nuclear de protón.....	117
PARTE III. Preparación de sondas fluorogénicas para la detección de aminoácidos y sus metabolitos.....	123
Introducción y diseño de sondas fluorogénicas.....	123
TAREA 1: Preparación de sondas fluorogénicas para la detección de aminoácidos.....	135
Resultados experimentales.....	136
Estudios de detección de aminoácidos.....	146
Estudios en presencia de ω -aminoácidos.....	150
Estudios con gabapentina, pregabalina y metabolitos.....	156

Estudio mediante valoración por RMN- ¹ H.....	161
Cálculos mecanocuánticos.....	162
TAREA 2: Preparación de sondas fluorogénicas para la detección de aminas biogénicas.....	167
Resultados experimentales.....	167
Estudio mediante valoración por RMN- ¹ H del compuesto 9.....	171
Estudios de detección de aminoácidos.....	174
Estudio del comportamiento de 14 frente a aminas.....	175
Valoraciones fluorimétricas.....	178
Estudios de detección de anfetaminas.....	188
Stopped-flow: cinéticas de reacciones rápidas.....	194
Análisis multicomponente.....	196
TAREA 3: Preparación de una sonda fluorogénica para la detección de aminoácidos y péptidos.....	201
Resultados experimentales.....	201
Estudios frente a aminoácidos y sus metabolitos.....	203
4. CONCLUSIONES.....	217
5. APÉNDICE EXPERIMENTAL.....	219
6. CHARACTERIZATION OF COMPOUNDS.....	241

7. RESUMEN

8. SUMMARY

9. CONCLUSIONS

ANEXO I: ABREVIATURAS

ANEXO II: MOLÉCULAS

1. INTRODUCCIÓN

1. Química supramolecular y receptores moleculares

Después de muchos años en que los químicos centraron su atención casi de forma exclusiva en el estudio de las interacciones entre átomos, con la idea de obtener nuevas moléculas, hace algún tiempo comenzó a adquirir interés el estudio de las interacciones moleculares y con ello un nuevo campo denominado *Química Supramolecular*. Se puede datar su origen en los trabajos pioneros de Jean-Marie Lehn, quien hacia el año 1969 inició sus investigaciones en compuestos de inclusión y criptandos, sobre la base de la idea del “reconocimiento molecular” que le condujeron a obtener el Premio Nobel en Química en el año 1987 junto con Donald J. Cram y Charles J. Pedersen. Lehn definió la *Química Supramolecular* como “la química de los enlaces intermoleculares”, o también como “química de las moléculas”,¹ y abrió un nuevo campo en el que confluyen los

¹ J. M. Lehn, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, 27, 89-112.

intereses de muchas disciplinas de la Química como Inorgánica, Orgánica, Química-Física, etc., y de otras ramas de la ciencia como Ciencia e Ingeniería de Materiales, Bioquímica, Nanotecnología, etc., debido a múltiples aplicaciones encontradas y postuladas para este tipo de compuestos.² Para lograr preparar tales especies se necesita disponer de dos tipos de “bloques de construcción”, (a) **sustratos**: iones metálicos o compuestos de coordinación con posiciones lábiles y geométricas bien definidas y (b) **receptores**: ligandos diseñados con geometría y número de posiciones de enlace adecuados, capaces de coordinar al sustrato.

El primer paso en el diseño de un receptor molecular es definir el sustrato para el cual se va a utilizar. En el caso de que sea un metal catiónico, hay que tener en cuenta su tamaño, densidad de carga y dureza. En cambio, en la complejación de aniones es necesario tener en cuenta más factores debido a que su geometría en muchos de los casos no es esférica. Así, influyen factores como la forma, la carga y la presencia de átomos de hidrógeno que puedan formar enlaces por puentes de hidrógeno. En el caso de cationes y aniones orgánicos, se requieren receptores con regiones hidrófilas e hidrófobas, mientras que en el caso de moléculas neutras debe carecer de determinados grupos, como grupos polares, que puedan interactuar fuertemente con el sustrato.

El siguiente paso es el diseño de los puntos de unión del receptor, los cuales deben complementarse con los del sustrato. Todos ellos se agrupan en una estructura orgánica de tamaño adecuado al sustrato. Su distribución debe ser tal que estén unos puntos lo suficientemente alejados de otros para minimizar repulsiones, pero a la vez deben estar lo suficientemente juntos para interactuar simultáneamente con el sustrato. Los complejos más estables se obtienen cuando el receptor posee una estructura preorganizada para recibir al sustrato. En este caso la unión es irreversible. Este tipo de complejación es ideal, por ejemplo, en la eliminación de sustancias tóxicas de aguas contaminadas. Cuando la unión sustrato-receptor es menos firme, sus aplicaciones son importantes en el campo del transporte de moléculas o como sensores químicos.

² J. W. Steed, J. L. Atwood, *Supramolecular Chemistry*, John Wiley & Sons: Chichester, UK, **2000**. pg: 19-30.

Desde hace varios años se han utilizado procedimientos sintéticos de arquitectura molecular, obteniéndose reactivos muy innovadores que forman complejos selectivos receptor-analito (*host-guest*), cuando las especies implicadas se complementan en forma, dimensiones (geometría) y grupos enlazantes (energía). Desde entonces se ha sintetizado un gran número de moléculas receptoras de cationes (iones metálicos, amonio, bipyridinio, ...) y en menor número de aniones (iones haluro, sulfato, fosfato, sulfuro, carboxilatos, ...) o de moléculas neutras (dióxido de carbono o de azufre, halometanos e hidrocarburos aromáticos,...). Este es el campo de moléculas receptoras con topologías especiales, con cavidades hifrofílicas bidimensionales (como los poliéteres macrocíclicos) o tridimensionales (ligandos macrobíclicos como los criptandos o los esferandos) o con cavidades lipofílicas (como los cicloalcanos, los calixarenos, los cavitandos, los criptofanos o las ciclodextrinas). El gran esfuerzo que representa la obtención de estas moléculas ha sido aplicado, en parte, en la construcción de sensores químicos.

Por otra parte, la química supramolecular se ha desarrollado en los últimos cuarenta años como la química más allá de la molécula. A partir de la investigación sobre las bases del reconocimiento molecular, ha explorado la utilización de la información molecular en la programación de los sistemas químicos hacia los procesos de auto-organización que suceden sobre la base del diseño o mediante la selección de sus componentes. El área ha experimentado un desarrollo extraordinario en el punto de conexión triple entre la química, la biología y la física y ha dado lugar a una cantidad extraordinaria de artículos de revisión, números especiales de revistas y libros.³ La química molecular ha desarrollado en los últimos doscientos años una gran cantidad de procedimientos para la creación de moléculas cada vez más sofisticadas y materiales a partir de átomos unidos mediante enlaces covalentes. Más allá de la química molecular, la química supramolecular busca la construcción de sistemas químicos funcionales muy complejos a partir de componentes mantenidos juntos mediante fuerzas intermoleculares. Se han desarrollado numerosos receptores moleculares capaces de unirse selectivamente a sustratos específicos a través de interacciones no covalentes. Estos receptores realizan

³ (a) J. M. Lehn, *Chem. Soc. Rev.*, **2007**, 36, 151–160. (b) C. M. Drain, I. Goldberg, I. Sylvain, A. Falber, *Top. Curr. Chem.* **2005**, 245, 55–88.

reconocimiento molecular que se basa en la información molecular que llevan las especies que interaccionan. Por ejemplo, receptores funcionalizados apropiados pueden efectuar catálisis supramolecular y procesos de transporte selectivos. El control que dan los procesos de reconocimiento permite el desarrollo de dispositivos funcionales tanto moleculares como supramoleculares, definidos como sistemas integrados, funcionalmente ensamblados a partir de componentes diseñados apropiadamente, que realizan una acción concreta (fotoactivos, electroactivos, ionoactivos, etc.). Así, la contribución de la química supramolecular a las ciencias químicas ha sido la implementación del concepto de información molecular y de los sistemas químicos programados para obtener el control de la organización de la materia, tanto de forma estructural como dinámica, dando lugar a que la química sea una ciencia de la información molecular a través de procesos de reconocimiento molecular que operan mediante patrones de interacción (conjuntos de enlaces de hidrógeno, secuencias de grupos donadores y aceptores de electrones, centros de coordinación de iones metálicos, etc.). La obtención del reconocimiento molecular óptimo se basa en que los pares de receptor y substrato presenten complementariedad en la geometría y en las interacciones, por lo que deben ser diseñados de forma apropiada, utilizando los diseños de auto-organización desarrollados por la química supramolecular. La auto-organización es el proceso fundamental que ha dado lugar a la generación de materiales complejos, y puede ser controlado mediante el diseño de los componentes y de las interacciones a que dan lugar. Así, la información molecular guardada en el esqueleto covalente puede ser leída a nivel supramolecular a través de patrones específicos de reconocimiento que dan lugar a sistemas químicos programados, de gran interés en ciencia e ingeniería supramolecular. Éstos a su vez permiten la obtención de materiales funcionales supramoleculares avanzados, como sistemas poliméricos supramoleculares, vesículas lipídicas, ensamblajes supramoleculares en estado sólido y cristales líquidos (Figura 1).⁴

⁴ (a) J. Barberá, O. A. Rakitin, M. B. Ros, T. Torroba, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37* 296-299. (b) S. Basurto, S. García, A. G. Neo, T. Torroba, C. F. Marcos, D. Miguel, J. Barberá, M. B. Ros, M. R. de la Fuente, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 5362 – 5376.

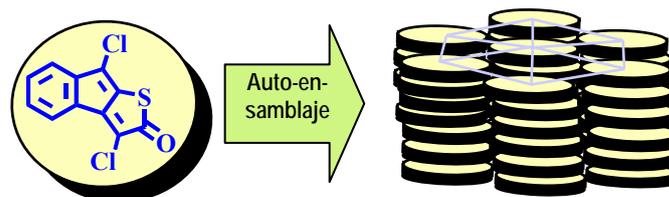


Figura 1: Autoensamblaje de moléculas en un cristal líquido discótico

El diseño de sistemas autoorganizados programados proporciona una aproximación original a la nanociencia y la nanotecnología. En particular, la generación de arquitecturas supramoleculares bien definidas de tamaño nanométrico a través de autoorganización representa un medio de llevar a cabo ingeniería y procesamiento de nanomateriales y constituye una alternativa a los procesos de nanofabricación y nanomanipulación. En este caso se utiliza la generación espontánea pero controlada de las superestructuras y dispositivos deseados a partir de unidades de construcción diseñadas específicamente para una función. De entre estos sistemas programados de base supramolecular, el grupo de trabajo en que se realiza esta Tesis Doctoral está interesado en el desarrollo de lo que se denominan sondas fluorogénicas para su utilización en sensores químicos, donde el proceso de reconocimiento está acoplado a un proceso de señalización.⁵ Un *sensor químico* está formado por dos partes: un elemento de reconocimiento molecular que interactúa selectivamente con un determinado componente de la muestra y un elemento instrumental formado básicamente por un “transductor” de la señal producida cuando se reconoce la molécula (Figura 2). Ambas partes pueden encontrarse físicamente separadas o integradas en el transductor. Este, según el caso, convierte señales primarias de reconocimiento (eléctricas, ópticas, etc.) en señales secundarias, normalmente de campo eléctrico. Esta configuración tan simple de reconocimiento y transducción es la que ha permitido el diseño de una instrumentación con características prácticas e innovadoras en el campo del análisis químico.

⁵ (a) J. S. Wilson: "*Sensor Technology Handbook*", 2005, Elsevier Inc., Oxford. (b) P. Gründler: "*Chemical Sensors: An Introduction for Scientists and Engineers*". 2007, Springer, Berlin-Heidelberg.

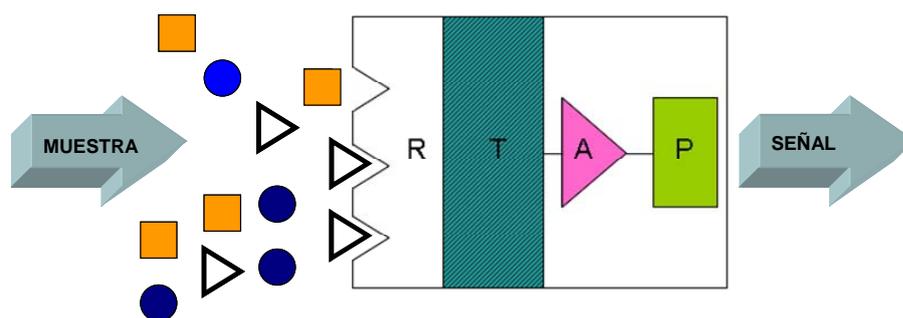


Figura 2: Diagrama esquemático del funcionamiento de un sensor químico. El sistema de reconocimiento o receptor (R) sólo reconoce un componente de la muestra. La señal proveniente del proceso de reconocimiento se convierte en una señal eléctrica mediante el transductor (T); esta señal es amplificada y condicionada en (A) y posteriormente procesada y presentada en forma digital (P). El receptor puede interactuar con el analito mediante mecanismos físicos, químicos o biológicos.

El aspecto fundamental de este diseño es la generación de una señal suficientemente intensa entre el sustrato (analito) y un receptor selectivo de éste (elemento de reconocimiento molecular). Cuanto más sencillo y confiable sea el proceso de reconocimiento, más lo será el dispositivo resultante. Los demás aspectos asociados al proceso y al sensor como la conversión (transducción) de las señales primarias en otras señales más idóneas para su procesamiento, transmisión o almacenaje, son igualmente importantes, pero ya poseen un tratamiento mucho más desarrollado y efectivo gracias a los continuos avances de la micro- y optoelectrónica. Los sensores químicos se utilizan para la detección monitorizada de especies químicas, y son necesarios en muchas disciplinas, no solo en la química sino también en la biología, en la medicina clínica o en las ciencias medioambientales.⁶ Un ejemplo característico es el estudio de la química celular, donde se necesita conocer los mecanismos que hacen trabajar a las células. Así, los sensores de biomoléculas como neurotransmisores, glutamato y acetilcolina, glicina, aspartato y dopamina, NO y ATP, son muy útiles. En el mismo sentido, es necesario desarrollar sensores para iones metálicos (Na^+ , K^+ , Ca^{2+}) que están relacionados con procesos biológicos como la transmisión nerviosa, la contracción del músculo o la regulación de la actividad celular. En el campo de las ciencias medioambientales, se sabe que los derivados de mercurio (muy especialmente MeHg^+), plomo y cadmio son tóxicos

⁶ L. Basabé-Desmots, D. N. Reinhoudt, M. Crego-Calama, *Chem Soc. Rev.* **2007**, *36*, 993-1017.

para los organismos vivos y su detección en el medio ambiente es muy conveniente. Por otra parte, los sensores de explosivos y armas químicas están siendo investigados para la detección de minas y agentes de guerra química.⁷ Con la guerra al terrorismo, la necesidad de sensores químicos y biológicos precisos y fiables, que trabajen en tiempo real, ha aumentado enormemente. Finalmente, la detección química permite el estudio y control de los procesos químicos desde el laboratorio a la escala industrial, y juega un papel importante en la industria alimentaria para el control de la calidad y seguridad de los alimentos. Existen muchos tipos de moléculas orgánicas de gran importancia para las que no existen sensores químicos que las detecten, por lo que es importante expandir el campo de los analitos que pueden ser detectados y cuantificados. En el caso de biomoléculas, la naturaleza proporciona un gran número de interacciones específicas que pueden ser usadas para la creación de biosensores, sin embargo hay un gran número de moléculas que no son fácilmente detectables, por lo que se deben diseñar nuevas sondas fluorogénicas específicas. La fluorescencia es uno de los mecanismos de transducción más potentes para informar de un proceso de reconocimiento químico.⁸ La fluorescencia es un tipo de emisión radiativa que presentan compuestos con características especiales. La luz de ciertas longitudes de onda puede ser selectivamente absorbida por una sustancia de acuerdo a su estructura molecular. La absorción de la energía de la luz ocurre cuando un fotón incidente promueve la transición de un electrón de un estado de menor a mayor energía. Las moléculas con electrones en compuestos aromáticos usualmente absorben luz cerca del UV (150–400 nm) o en la zona del visible (400–750 nm). Posteriormente los electrones excitados pierden esta energía absorbida. Esta desactivación puede ocurrir por distintos mecanismos: relajación vibracional, conversión interna, conversión externa, cruce entre sistemas, fosforescencia y fluorescencia (Figura 3).

⁷ (a) S. L. Hoenig: "*Compendium of Chemical Warfare Agents*", 2007 Springer Science, New York. (b) R. L. Woodfin: "*Trace Chemical Sensing of Explosives*". 2007, Wiley, New York.

⁸ (a) J. R. Lakowicz, "*Principles of Fluorescence Spectroscopy*", 3^a Edition, Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2006. (b) D. A. Skoog, F. J. Holler, T. A. Nieman, "*Principios de Análisis Instrumental*", Ed: McGraw-Hill, 5^a Ed. (c) B. Valeur "*Molecular Fluorescence*", Ed: Wiley-VCH, 2002. (d) A. Sharma, S. G. Schulman "*Introduction to fluorescence spectroscopy*" New York, Ed: John Wiley, 1999. (e) George G. Guibault, Ed., "*Practical Fluorescence*", New York, Marcel Dekker, 2nd ed, 1990.

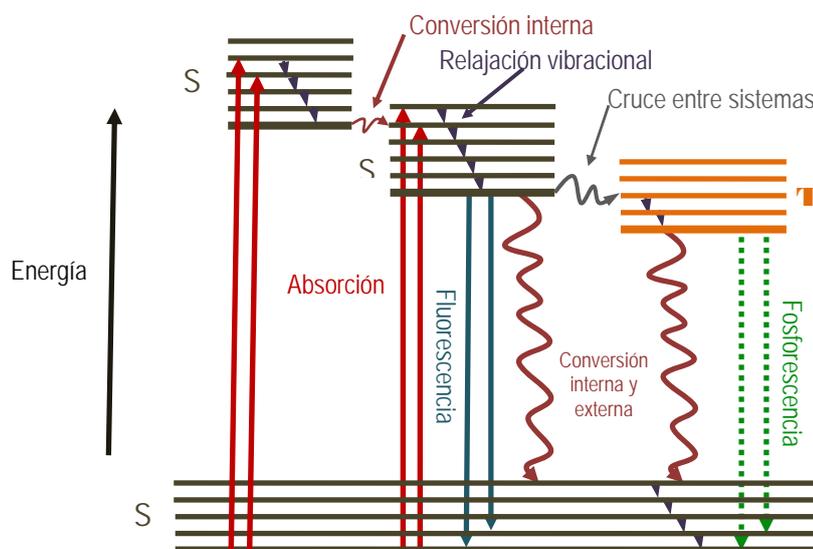


Figura 3: Diagrama de Jablonski

El tiempo de vida de la fluorescencia y la eficiencia cuántica son probablemente las características más importantes de los fluoróforos. Para moléculas altamente fluorescentes, como rodamina B y fluoresceína, el rendimiento cuántico alcanza la unidad. Sin embargo, la emisión siempre será de menor energía en promedio que la energía absorbida, debido a la relajación vibracional. El cambio en la energía del fotón causa un cambio en el espectro de fluorescencia hacia longitudes de onda más amplias, respecto al espectro de absorción. Este fenómeno observado por G. G. Stokes en 1852 se denomina desplazamiento de Stokes. Existen gran número de técnicas espectroscópicas o microscópicas basadas en el tiempo de vida, la anisotropía, la transferencia de energía o la intensidad de emisión de sondas fluorescentes. Estas técnicas son muy sensibles, permiten incluso la detección de moléculas aisladas, y pueden ser miniaturizadas o automatizadas. La integración de sondas moleculares fluorescentes en dispositivos da lugar a los sensores químicos. Las sondas moleculares suelen ser también denominadas quimiosensores,⁹ y se definen como compuestos de origen abiótico que complejan de forma reversible a analitos dando como resultado un cambio en la señal fluorescente, y constituyen las unidades

⁹ S. K. Kim, D. H. Lee, J.-I. Hong, J. Yoon, *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42*, 23-31.

activas de un sensor. En muchos casos, el diseño de materiales indicadores se ha basado en la preparación de nuevos receptores más que en la existencia de nuevas sondas fluorogénicas, de las que existe un número muy limitado. El diseño clásico de un indicador fluorescente se compone de dos partes, un receptor responsable del reconocimiento molecular del analito y un fluoróforo responsable de la señalización del evento. Hay tres estrategias principales para el diseño de indicadores moleculares fluorescentes en disolución. La primera da lugar a **sondas fluorescentes intrínsecas**, que son moléculas fluorescentes donde el mecanismo para la transducción de la señalización comprende la interacción del analito con un ligando que es parte del sistema π del fluoróforo. La detección se produce por la perturbación de la transferencia de carga fotoinducida del grupo dador al grupo aceptor conjugado cuando uno de los dos actúa como receptor (Figura 4)

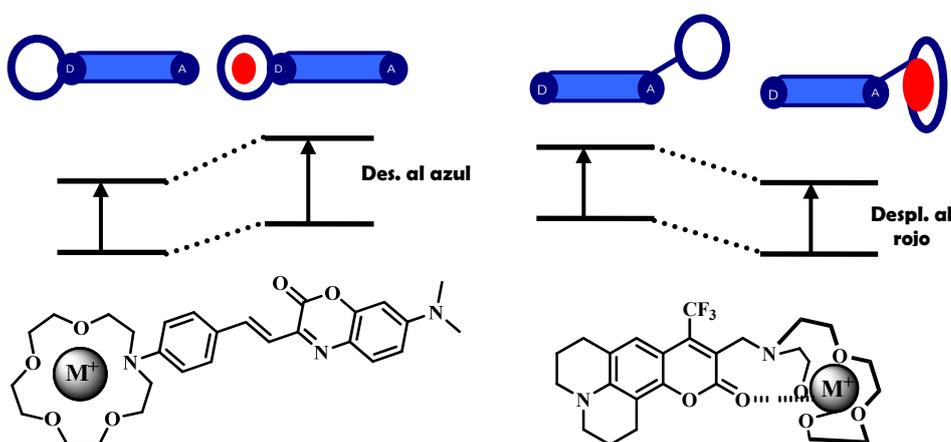


Figura 4: Quimiosensores basados en la transferencia de carga fotoinducida

La segunda consiste en **sondas fluorescentes extrínsecas**, en las que el fragmento receptor y el fluoróforo están unidos covalentemente pero son electrónicamente independientes. En este caso, se pueden sintetizar diferentes moléculas receptoras que después son unidas químicamente a un fluoróforo para construir la sonda detectora. Debido a la unión covalente a través de un espaciador, ambas partes están espacialmente muy próximas por lo que la interacción del analito con el receptor induce un cambio el entorno químico del fluoróforo, e induce asimismo un cambio en su fluorescencia.

Habitualmente el cambio en la señal fluorescente suele suceder mediante la inhibición de la transferencia electrónica fotoinducida de un dador en el receptor a un aceptor en el fluoróforo (Figura 5)

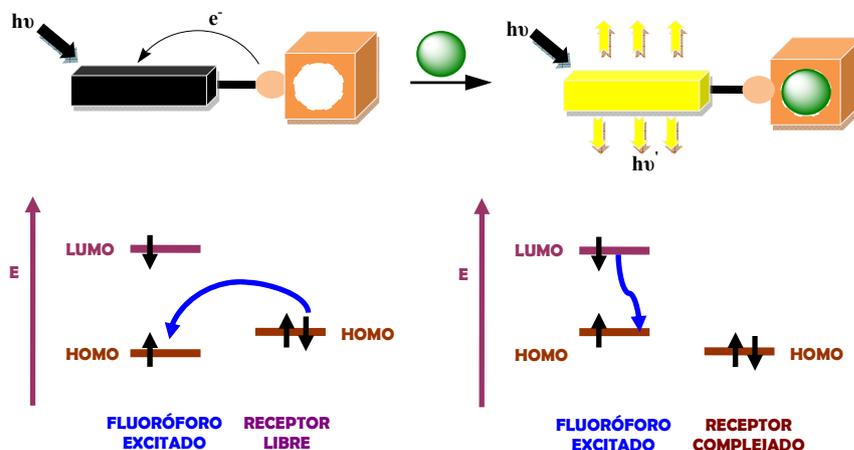


Figura 5: Quimiosensor basado en la transferencia electrónica fotoinducida

Cuando una sonda fluorogénica contiene dos fluoróforos y la distancia entre ellos se ve afectada por la complejación de un analito, el reconocimiento de este analito puede ser detectado por la diferencia de la fluorescencia entre el monómero y el excímero, dando lugar a los llamados quimiosensores basados en excímeros (Figura 6).

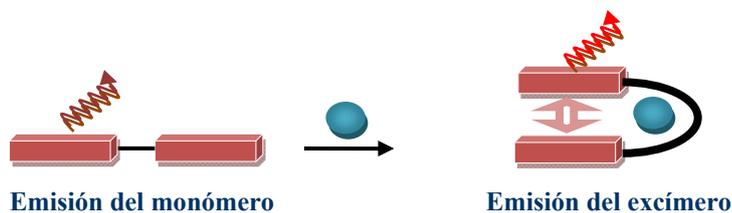


Figura 6: Quimiosensor basado en excímero

La tercera estrategia es la llamada del **conjunto quimiosensor**, que se basa en un ensayo competitivo en que un conjunto receptor-fluoróforo es selectivamente disociado por adición de un analito competitivo capaz de interactuar eficientemente con el receptor dando lugar a una respuesta detectable del fluoróforo. Esta estrategia se lleva a cabo mediante desplazamiento del fluoróforo e inserción del analito (Figura 7) o a la inversa mediante reacción química provocada por el analito, dando lugar a los llamados

dosímetros químicos (Figura 8).

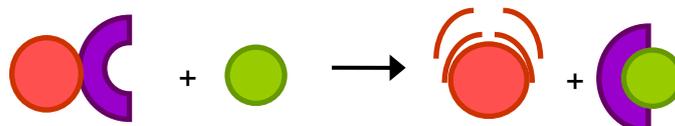


Figura 7: Aproximación del desplazamiento



Figura 8: Aproximación del dosímetro químico

Después de la producción de un indicador fluorescente, el siguiente paso para la fabricación de un sensor químico es normalmente la preparación de material detector mediante la incorporación del indicador a un soporte sólido. Hasta ahora la aproximación más común para la inmovilización del quimiosensor era la incorporación mediante mezcla física del material detector a una matriz polimérica, lo que tiene muchos inconvenientes de falta de homogeneidad e inestabilidad, lo que da lugar a falta de reproducibilidad, por lo que no se suele incorporar a instrumentos comerciales. Se han desarrollado otros materiales en que los componentes del sistema detector están confinados direccionalmente en un espacio físico, por ejemplo inmovilizados covalentemente en una superficie o formando agregados surfactantes. Un gran número de materiales como partículas de sílica, superficies de vidrio y oro, nanopartículas, películas de Langmuir-Blodgett, vesículas o liposomas han sido combinados con muchos receptores químicos con el fin de crear materiales fluorescentes sensibles. Por otra parte, los materiales sol-gel comprenden un gran número de materiales compuestos orgánicos-inorgánicos que tienen en común que se preparan a baja temperatura de manera parecida, mediante la hidrólisis de precursores y condensación posterior. Las sondas fluorescentes pueden ser incorporadas fácilmente dando lugar a aplicaciones como sensores muy potentes. Entre éstos, los sólidos mesoporosos basados en sílica, que son estructuras ordenadas con forma de panal de abejas, preparados mediante surfactantes y química sol-gel dirigida, pueden ser funcionalizados en la matriz inerte y constituyen soportes adecuados para la inserción

covalente de las sondas fluorogénicas (Figura 9).¹⁰

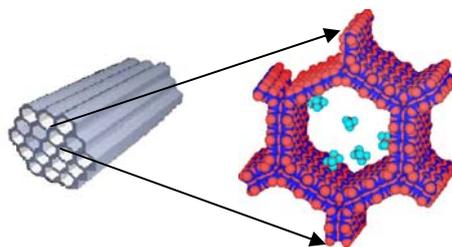


Figura 9: Sólido mesoporoso funcionalizado y ampliación de su estructura interna.

1.1. Diseño de unidades receptoras para los distintos tipos de sustratos

1.1.1. Detección de cationes

La detección de cationes es de gran interés en campos como el estudio de los procesos biológicos, medicina, química oceanográfica, medioambiente, etc. Existen numerosos métodos analíticos para la detección de cationes, como la fotometría de llama, la espectrometría de absorción atómica, electrodos sensibles a iones, etc., pero en general son caros y requieren muestras preparadas específicamente que no pueden monitorizarse de forma continua. Sin embargo, los métodos basados en sensores químicos, en especial de tipo cromogénico, proporcionan grandes ventajas, sobre todo porque los cambios de color pueden ser detectados a simple vista.

El proceso de reconocimiento más sencillo es aquel en el que el sustrato presenta forma esférica. Esto comprende tanto a los cationes metálicos (alcalinos, alcalinotérreos,

¹⁰ (a) S. Basurto, T. Torroba, M. Comes, R. Martínez-Máñez, F. Sancenón, L. Villaescusa, P. Amorós, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 5469-5472. (b) R. Martínez-Máñez, F. Sancenón, *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 4419-4476. (c) R. Casasús, M. D. Marcos, R. Martínez-Máñez, J. V. Ros-Lis, Juan Soto, L. A. Villaescusa, P. Amorós, D. Beltrán, C. Guillem, J. Latorre, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 8612-8613. (d) M. Comes, M. D. Marcos, R. Martínez-Máñez, M. C. Millán, J. V. Ros-Lis, F. Sancenón, J. Soto, L. A. Villaescusa, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 2162-2170. (e) R. Casasús, E. Aznar, M. D. Marcos, R. Martínez-Máñez, F. Sancenón, J. Soto, P. Amorós, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 6661-6664. (f) A. B. Descalzo, R. Martínez-Máñez, F. Sancenón, K. Hoffmann, K. Rurack, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 5924-5948. (g) R. Casasús, E. Climent, M. D. Marcos, R. Martínez-Máñez, F. Sancenón, J. Soto, P. Amorós, J. Cano, E. Ruiz, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 1903-1917. (h) M. Comes, M. D. Marcos, R. Martínez-Máñez, F. Sancenón, J. Soto, L. A. Villaescusa, P. Amorós, *Chem. Commun.* **2008**, *47*, 3639-3641.

metales de transición, etc.) como a los aniones de los halógenos. Desde el descubrimiento de los éteres corona en 1967 por Charles J. Pedersen,¹¹ descubrimiento por el que le fue otorgado el Premio Nobel en Química en el año 1987,¹² el desarrollo de estos sistemas como unidades receptoras de cationes ha sido de gran importancia. Actualmente, la gran mayoría de los sensores que se diseñan para el reconocimiento de cationes se basan en este tipo de estructuras.¹³

Los éteres corona son macrociclos muy flexibles, que presentan varios átomos de carácter donador en su estructura. Consisten básicamente en derivados cíclicos con un determinado número de átomos de oxígeno (o dadores blandos, como N, S, etc) separados por unidades orgánicas, generalmente grupos $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$. La selectividad de estas estructuras frente a los distintos cationes depende de diversos factores como la relación de tamaños entre la cavidad receptora y el catión, número de átomos dadores, distancia entre los átomos dadores, solvatación del catión y el ligando, así como el radio iónico, carga, dureza o número de coordinación del catión. Así, por ejemplo el éter 15-corona-5 (**1**) presenta un tamaño óptimo para el catión sodio (Figura 10). A partir del estudio de los éteres corona se han diseñado multitud de estructuras para el reconocimiento de cationes,¹⁴ como los coronandos, que comprenden todo tipo de éteres y heteroéteres corona, muy utilizados en química de reconocimiento de cationes y moléculas neutras,¹⁵ como el 1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano (*ciclam*)¹⁶ (**2**), que puede coordinarse con cationes

¹¹ C. J. Pedersen, *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 7017-7036.

¹² C. J. Pedersen, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, *27*, 1021-1027.

¹³ G. W. Gokel, *Crown Ethers and Cryptands*, (Ed.: J. F. Stoddart), The Royal Society of Chemistry: Cambridge, UK, **1991**.

¹⁴ Gokel, G. W.; Leevy, W. M.; Weber, M. E. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 2723-2750.

¹⁵ (a) C. Y. Chen, C. T. Cheng, C. W. Lai, P. W. Wu, K. C. Wu, P. C. Chou, Y. H. Chou, H. T. Chiu, *Chem. Commun.* **2006**, 263-265; (b) M. Licchelli, A. O. Biroli, A. Poggi, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 915-918; (c) T. D. James, S. Shinkai, *Chem Commun.* **1995**, 1483-1485; (d) L. Nuñez, R. D. Rogers, *J. Coord. Chem.* **1993**, *28*, 347-354; (e) J. D. Owen, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1983**, 407-415; (f) M. Baruah, W. Qin, R. A. L. Vallée, D. Beljonne, T. Rohand, W. Dehaen, N. Boens, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 4377-4380.

¹⁶ (a) I. Lukeš, J. Kotek, P. Vojtišek, P. Hermann, *Coord. Chem. Rev.* **2001**, *287*, 216-217, (b) B. P. Hay, R. D. Hancock, *Coord. Chem. Rev.* **2001**, *212*, 61-78.

metálicos como Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} y Hg^{2+} ,¹⁷ permitiendo la detección de cationes de los metales de transición,¹⁸ o los podandos, que consisten en poliéteres de cadena abierta¹⁹ (3), muy flexibles pero que poseen menor afinidad por los cationes que los correspondientes ligandos cíclicos (Figura 10).

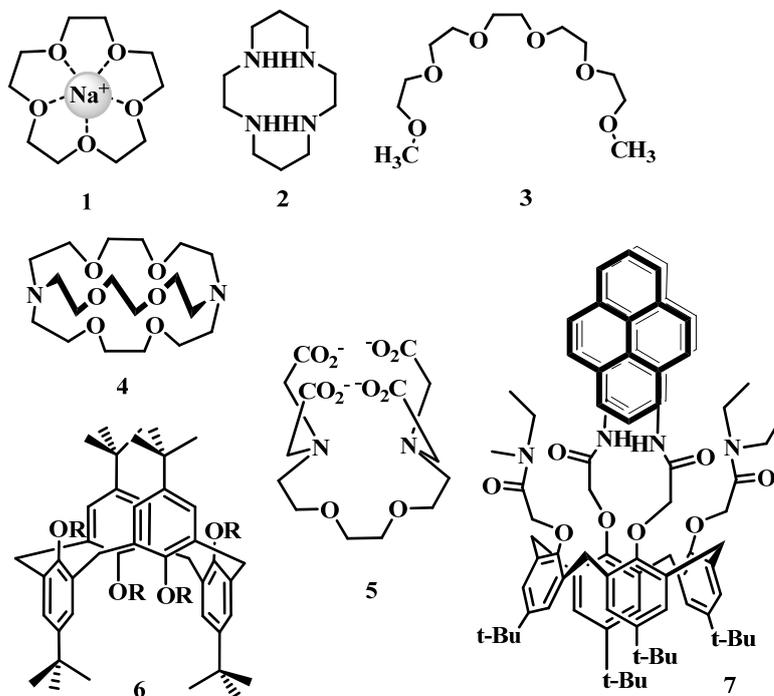


Figura 10.

Posteriormente se han descrito multitud de receptores, como quelatos (5), macrobicyclos (criptandos) (4) y derivados de calixareno (6, 7), mostrados en la figura 10. La necesidad de múltiples centros de enlace es debida a la debilidad de las interacciones que presentan los receptores con los analitos. En general, se considera que una cavidad

¹⁷ (a) A. Bianchi, M. Micheloni, P. Paoletti, *Coord. Chem. Rev.* **1991**, *110*, 17-113; (b) M. Meyer, V. Dahaoui-Gindrey, C. Lecomte, R. Guilard, *Coord. Chem. Rev.* **1998**, *178*, 1313-1405; (c) L. Fabbrizzi, M. Licchelli, P. Pallavicini, D. Sacchi, *Supramol. Chem.* **2001**, *13*, 569-582.

¹⁸ (a) S. H. Kim, J. S. Kim, S. M. Park, S-K. Chang, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 371-374; (b) P. Ceroni, V. Vicinelli, M. Maestri, V. Balzani, S. Lee, J. Heyst, M. Gorka, F. Vögtle, *J. Organomet. Chem.* **2004**, *689*, 4375-4383.

¹⁹ G. Gokel, O. Murillo, *Comprehensive Supramolecular Chemistry*, (Eds.: J. L. Atwood, J. E. D. Davies, D. D. MacNicol, F. Vögtle), Pergamon: Oxford, **1996**, *vol. 1*, 1-33.

complejante es selectiva para un catión que tenga su mismo tamaño, pero en realidad un éter corona, por ejemplo, puede complejar un catión más grande o más pequeño de lo esperado. Así, el diámetro de la cavidad del éter 15-corona-5 es 1.7-2.2 Å, que corresponde al sodio, cuyo diámetro iónico es de 1.8 Å. La constante de estabilidad para este catión es de $\log K_s = 3.24$ en metanol. Sin embargo, en el caso del potasio (diámetro iónico de 2.32 Å) la constante de estabilidad es mayor: $\log K_s = 3.43$ por lo que el éter 15-corona-5 compleja al K^+ con más fuerza que al Na^+ . Lo que ocurre es que debido a que el potasio es demasiado grande para la cavidad del éter, y el número de átomos donadores es insuficiente, se forma un complejo de tipo sandwich. De la misma forma, el sodio es eficazmente complejado por el éter 12-corona-4 (Figura 11a). Si el catión es demasiado grande, la cavidad complejante puede replegarse alrededor del catión, si ésta es suficientemente flexible. Un buen ejemplo de esto es la complejación de K^+ con el éter dibenzo-30-corona-10 (Figura 11b), en el que el receptor adopta una disposición plegada alrededor del catión.²⁰

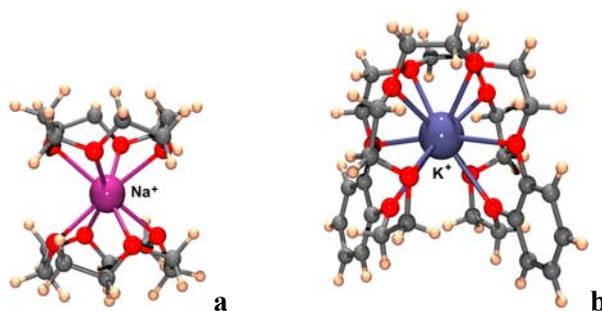
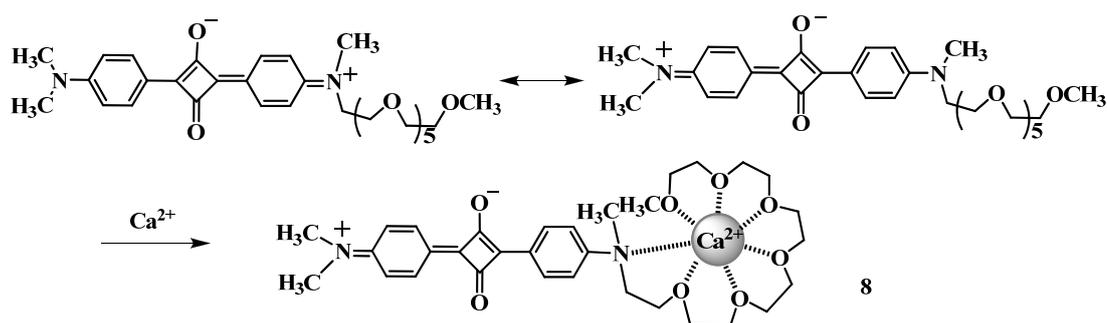


Figura 11.

Un ejemplo típico de este tipo de receptores es el que se recoge en el Esquema 1, donde el poliéter de cadena abierta **8** reconoce selectivamente el Ca^{2+} .²¹ La unidad de señalización está formada por un grupo escuaridina, sistema que se utiliza de forma habitual en la síntesis de sensores y dosímetros químicos.

²⁰ E. C. Constable, "Coordination Chemistry of Macrocyclic Compounds", Oxford Chemistry Primers, Oxford Science Publication, 1999.

²¹ A. Ajayaghosh, E. Arunkumar, *Org. Lett.* **2005**, 7, 3135-3138.



Esquema 1: Reconocimiento de Ca^{2+} por el poliéter 8.

En la síntesis de éteres corona tipo lazo es habitual partir de aza-éteres corona, donde uno o varios átomos de oxígeno se sustituyen por átomos de nitrógeno. Estos átomos permiten introducir en la estructura del sensor las cadenas laterales típicas de estos derivados, las cuales contribuyen a mejorar la coordinación de los cationes, así como permiten introducir grupos cromogénicos o fluorogénicos como unidades de señalización en el diseño del sensor. La molécula de la Figura 12 es un derivado del diaza-18-corona-6, donde se ha introducido dos cadenas laterales simétricas que contienen grupos quinolina, que permiten la detección de Zn^{2+} en medios acuosos. En el derivado **9** se produce un aumento de la fluorescencia tras el reconocimiento del catión. El proceso de coordinación esta asociado con la desprotonación del grupo sulfonamida lo que provoca el aumento de la fluorescencia en disolución.²²

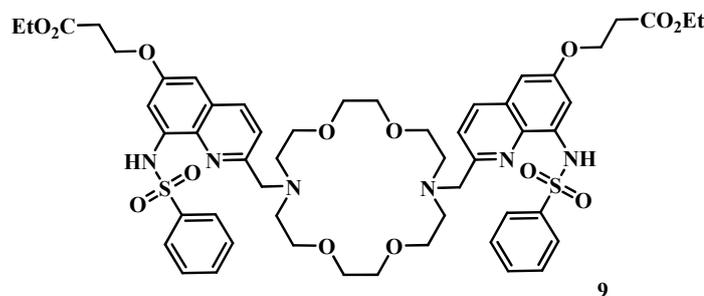


Figura 12

²² G. Xue, J. S. Bradshaw, N. K. Dalley, P. B. Savage, R. M. Izatt, L. Prodi, M. Montalti, N. Zaccheroni. *Tetrahedron*. **2002**, 58, 4809-4815.

Los criptandos son análogos de los éteres corona en las tres direcciones del espacio. Su nombre hace referencia a su capacidad para encapsular a los cationes, mejorándose notablemente su selectividad, debido a que se produce un reconocimiento esférico del metal.²³ El criptando más sencillo es el [2.2.2]criptando (4) para el reconocimiento de K^+ (Figura 13). En general, estos tipos de sistemas son más selectivos frente a diferentes cationes que los correspondientes éteres lazo, pero presentan cinéticas más lentas, ya que es más difícil la entrada del catión dentro de la estructura del criptando.

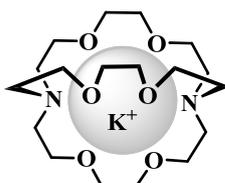


Figura 13

Los calixarenos son una clase de macrociclos formados por la condensación de fenilos sustituidos en posición *para*- con formaldehído. Presentan forma cónica, y recuerdan a la de una copa, de ahí su nombre (del griego *calix crater*, un tipo de recipiente griego en forma de copa). Existe gran cantidad de publicaciones y revisiones a cerca de los calixarenos y su papel dentro de la Química Supramolecular,²⁴ sobre todo como ligandos de cationes metálicos.²⁵ Son candidatos idóneos para la extracción de diferentes cationes metálicos, gracias a los grupos complejantes que presentan (átomos de oxígeno, nitrógeno, etc.). También pueden comportarse como moléculas para el transporte de sustancias, debido a la capacidad de organización espacial que presentan en presencia de diferentes agentes quelantes como éteres, ésteres, amidas y sus análogos, cetonas, derivados de amonio, alquenos, aminoácidos o heterociclos.

²³ J. M. Lehn. *Supramolecular Chemistry: Concepts and Perspectives*, VCH: Weinheim, **1995**.

²⁴ (a) C. D. Gutsche. *Calixarenes*, Monographs in Supramolecular Chemistry, Series, (Ed.: J. F. Stoddart), Royal Society of Chemistry, Cambridge: **1989**; (b) *Calixarenes. A Versatile Class of Macrocyclic Compounds* (Eds.: J. Vicens, V. Böhmer), Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, **1991**; (c) V. Böhmer. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 713-744; (d) C. D. Gutsche, *Calixarenes Revisited*, Royal Society of Chemistry: Cambridge, **1998**.

²⁵ (a) *Calixarenes 2001* (Eds.: Z. Asfari, V. Böhmer, J. Harrowfield, J. Vicens), Kluwer: Dordrecht, The Netherlands, **2001**; (b) C. Wieser, D. B. Dieleman, D. Matt. *Coord. Chem. Rev.* **1997**, *165*, 93-161; (c) A. T. Yordanov, D. M. Roundhill. *Coord. Chem. Rev.* **1998**, *170*, 93-124.

Un ejemplo es el descrito por J. O. Dalbavie et al. (Figura 14)²⁶ Este calixareno forma complejos con diferentes cationes de los metales de transición de estequiometrías varias (**10** y **11**). Así, con Cu^+ y Cu^{2+} forma complejos mononucleares de estequiometría 1:1, mientras que en presencia de Ni^{2+} , Co^{2+} y Zn^{2+} los complejos formados son de estequiometría 1:2.

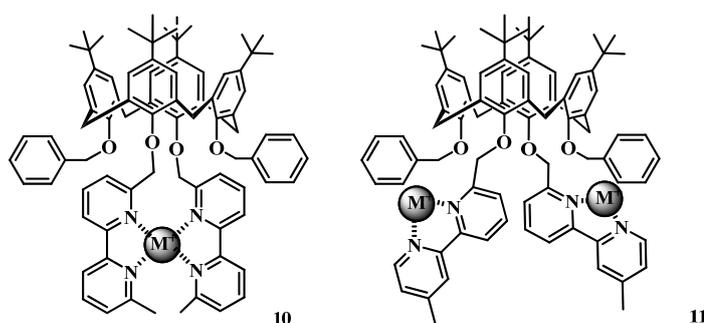


Figura 14

Los sensores redox de tetratíafulvaleno (TTF)²⁷ para cationes metálicos constituyen un grupo muy desarrollado.²⁸ La coordinación de un catión en una cavidad cercana a un TTF conduce a una alteración de la capacidad donadora de electrones de esta unidad, debido al efecto inductivo ejercido por el catión coordinado. Becher y col. han realizado la síntesis de derivados cíclicos de TTF tipo **12**²⁹ que son receptores de cationes alcalinos que dan señal solamente en presencia de un exceso muy grande del catión del metal, probablemente por falta de comunicación electrónica entre el receptor y la unidad de TTF, donde se localiza la densidad de la carga (Figura 15).

²⁶ J. O. Dalbavie, J. B. Regnouf-de-Vains, R. Lamartine, M. Perrin, S. Lecocq, B. Fenet. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2002**, 901-909.

²⁷ (a) M. B. Nielsen, C. Lomholt, J. Becher, *Chem. Soc. Rev.*, 2000, **29**, 153-164; (b) N. Martín, J. L. Segura, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2001**, **40**, 1372-1409; (c) M. R. Bryce, *J. Mater. Chem.*, **2000**, **10**, 589-598.

²⁸ P. D. Beer, P. A. Gale, G. Z. Chen, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **1999**, **1**, 1897-1909.

²⁹ (a) T. K. Hansen, T. Jørgensen, P. C. Stein, J. Becher, *J. Org. Chem.*, **1992**, **57**, 6403-6409; (b) T. Jørgensen, T. K. Hansen, J. Becher, *Chem. Soc. Rev.*, **1994**, **23**, 41-51.

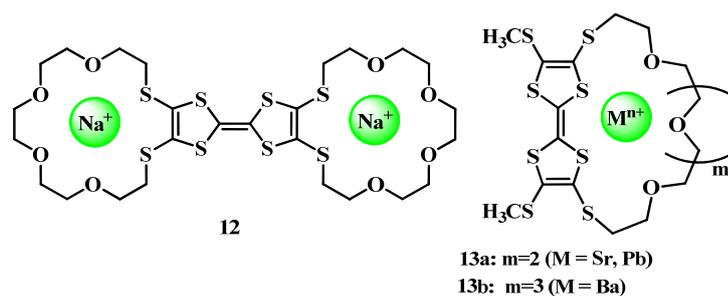


Figura 15: Sensores químicos de cationes basados en la estructura TTF.

Se han descrito otros receptores que incorporan una unidad de éter-corona conectada a dos posiciones vecinales de TTF,³⁰ y también presentan respuestas electroquímicas moderadas a la coordinación de cationes metálicos. Tales observaciones subrayan la importancia del diseño molecular y el papel crucial de la conexión entre el elemento redox-activo de la unidad coordinante y de la unidad indicadora. Así, los derivados bis-sustituídos de éter-corona-TTF **13**³¹ afinidad alta para muchos cationes en cantidades estequiométricas. La selectividad con respecto al ión del metal depende del tamaño o la naturaleza dura o blanda de los sitios de interacción. El primer ejemplo de receptores basados en TTF con un receptor acíclico fue descrito por Bryce y col. (**14**) (Figura 16).³² El compuesto **14** muestra una buena selectividad para Ag^+ de acuerdo con la teoría de Pearson. El TTF-podando **15**³³ muestra en cambio una buena afinidad para Pb^{2+} .

³⁰ S. G. Liu, L. Echegoyen, *Eur. J. Org. Chem.*, **2000**, 1157–1163.

³¹ F. Le Derf, M. Mazari, N. Mercier, E. Levillain, G. Trippé, A. Riou, P. Richomme, J. Becher, J. Garín, J. Orduna, N. Gallego-Planas, A. Gorgues, M. Sallé, *Chem.–Eur. J.*, **2001**, *7*, 447–455.

³² B. Johnston, L. M. Goldenberg, M. R. Bryce, R. Katakya, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **2000**, 189–190.

³³ (a) J. Lyskawa, F. Le Derf, E. Levillain, M. Mazari, M. Sallé, L. Dubois, P. Viel, C. Bureau, S. Palacin, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 12194–12195; (b) J. Lyskawa, F. Le Derf, E. Levillain, M. Mazari, M. Sallé, *Eur. J. Org. Chem.*, **2006**, *10*, 2322–2328.

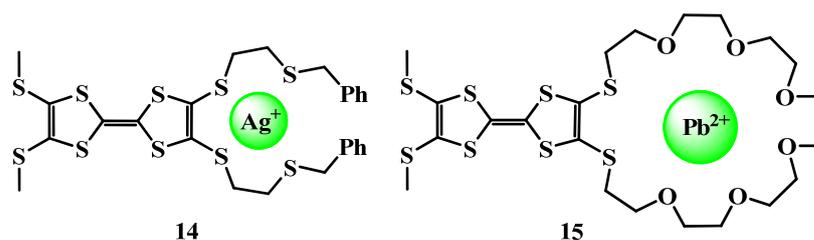


Figura 16: Sensor químico de cationes basados en la unidad de TTF.

La unidad de calix[4]areno ha sido utilizada como plataforma adecuada para generar cavidades de enlace tridimensionales capaces de complejar varios huéspedes con afinidad alta. En este contexto, se han sintetizado receptores basados en TTF, **16a-b** (Figura 17) y estudiado su capacidad de coordinación de iones metálicos.³⁴ Estos receptores poseen una buena afinidad para el catión sodio, además, el complejo disódico pudo ser caracterizado en estado sólido.

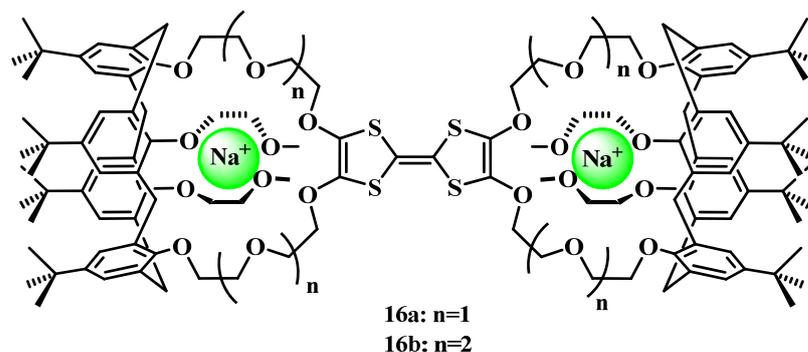
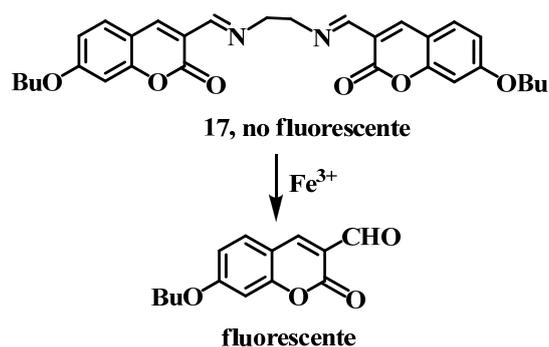


Figura 17: Receptores bis(calixcorona)tetrathiafulvaleno.

Los dosímetros químicos, al igual que los sensores, pueden utilizarse en la detección de cationes. Un ejemplo de dosímetro químico es el obtenido para la detección de Fe^{3+} basado en la hidrólisis de una base de Schiff. La bis(cumarinil)imina **17** es hidrolizada bajo adición de Fe^{3+} dando lugar a una cumarina altamente fluorescente (Esquema 2).³⁵

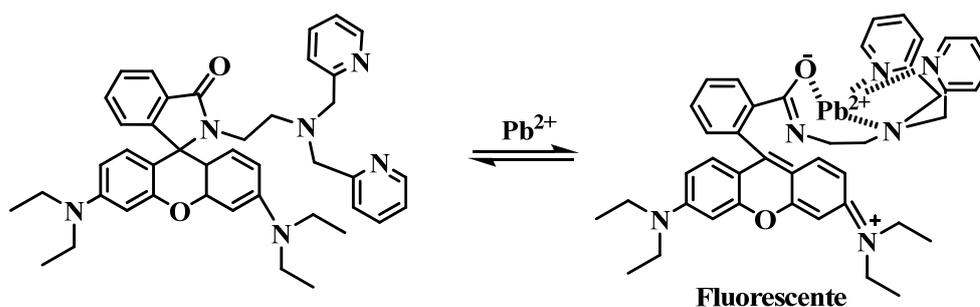
³⁴ (a) B. T. Zhao, M. J. Blesa, N. Mercier, F. Le Derf, M. Salle, *J. Org. Chem.*, **2005**, *70*, 6254–6257. (b) M. J. Blesa, B. T. Zhao, M. Allain, F. Le Derf, M. Sallé, *Chem. Eur. J.*, **2006**, *12*, 1906–1914.

³⁵ W. Lin, L. Yuan, J. Feng, X. Cao, *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, *16*, 2689–2692.



Esquema 2

Un ejemplo de sensor fluorogénico es el derivado de rodamina B sintetizado por J. Y. Kwon *et al.* para la detección selectiva de Pb^{2+} en acetonitrilo³⁶ El derivado incoloro en disolución evoluciona a un derivado de color rosa con la fluorescencia característica de la rodamina B en presencia del analito (Esquema 3).



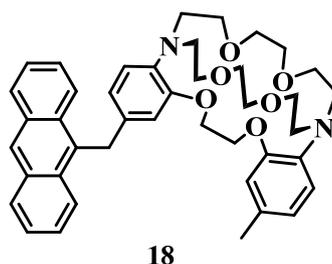
Esquema 3

Con cationes metálicos con actividad redox también puede tener lugar una transferencia electrónica desde el fluoróforo al ión metálico o viceversa.

El compuesto **18** es un ejemplo de quimiosensor basado en una transferencia electrónica fotoinducida (PET) para detección de cationes alcalinos por fluorescencia, cuyo receptor es una estructura macrocíclica, un criptando (Figura 18).³⁷

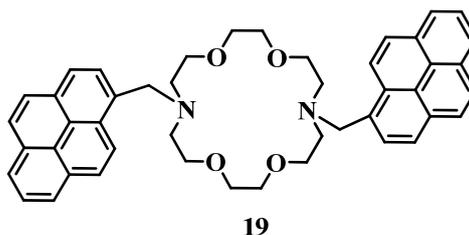
³⁶ J. Y. Kwon, Y. J. Jang, Y. J. Lee, K. M. Kim, M. S. Seo, W. Nam, J. Yoon, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10107-10111.

³⁷ A. Prasanna de Silva, H. Q. Nimal Gunaratne, K. R. A. Samankumara Sandanayake, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 5193-5196.

**Figura 18**

En este caso, tras la excitación del fluoróforo, un electrón del orbital molecular ocupado de mayor energía (HOMO), es promocionado al orbital molecular desocupado de menor energía (LUMO) que permite la transferencia electrónica desde el orbital HOMO del grupo dador de electrones al orbital HOMO del fluoróforo, causando la desaparición de la fluorescencia del fluoróforo. Tras la unión del catión, el potencial redox del dador es aumentado por lo que la energía del orbital HOMO del receptor disminuye, en consecuencia la transferencia electrónica no es posible, por lo que se restablece la fluorescencia.

Una molécula constituida por un éter diazacorona con dos pirenos unidos por los grupos amina (**19**) forma un excímero como resultado de la unión de un ion metálico. El porcentaje monómero/excímero depende fuertemente de la naturaleza del analito. Las constantes de estabilidad mayores para el complejo fueron obtenidas para el caso de los cationes K^+ y Ba^{2+} , de acuerdo con el tamaño respecto del diámetro del éter corona (Figura 19).³⁸

**Figura 19**

³⁸ K. Kubo, N. Kato, T. Sakurai, *Bull. Chem. Soc. Japan* **1997**, *70*, 3041-3046.

El derivado **20** para la detección de cationes alcalinos, cuyo receptor es un macrociclo, ha sido estudiado por N. B. Sankaran *et al.*³⁹. La especificidad a cada catión se basa en la longitud de la cadena que conecta el dador y el aceptor y en la posibilidad de formación de un excímero entre el grupo dador y aceptor ($n = 0, 1, 3, 5$). En este derivado se combinan las propiedades de transferencia de carga fotoinducida (PET) con la formación de excímeros.

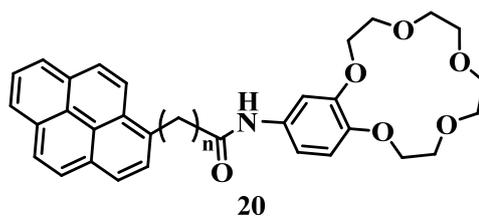


Figura 20

1.1.2. Detección de aniones

El interés por la química de coordinación de aniones ha aumentado en gran medida en los últimos 20 años. Los aniones están presentes no sólo en multitud de sistemas biológicos, sino que, además, se han convertido en importantes contaminantes medioambientales por su amplio uso en muchos procesos industriales, así como en la agricultura.⁴⁰ Por ello el diseño de nuevos sensores aniónicos es un campo de gran importancia, existiendo numerosas revisiones en bibliografía.⁴¹

El diseño de sensores de aniones es más complicado que en el caso de los cationes. Hay que tener en cuenta que los aniones son de mayor tamaño que sus

³⁹ N. B. Sankaran, S. Nishizawa, M. Watanabe, T. Uchida, N. Teramae, *J. Mater. Chem.* **2005**, *15*, 2755-2761.

⁴⁰ (a) R. F. Schmidt, G. Thews, *Human Physiology*, 2nd ed.; Springer-Verlag: Berlin, **1989**; (b) W. J. Marshall, S. K. Bangert, *Clinical Chemistry*, 5th ed.; Elsevier: Edinburg, **2004**; (c) *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 6th ed.; Wiley VCH: New York, **1999**.

⁴¹ (a) Ver volumen especial sobre reconocimiento de aniones: *Coord. Chem. Rev.* **2003**, *240*, 1-226; (b) R. Martínez-Máñez, F. Sancenón, *J. Fluoresc.* **2005**, *15*, 267-285. P. A. Gale. *Chem. Commun.* **2005**, 3761-3772; (c) R. Martínez-Máñez, F. Sancenón, *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 4419-4476; (d) C. Suksai, T. Tuntulani, *Chem. Soc. Rev.* **2003**, *32*, 192-202; (e) P. A. Gale, *Coord. Chem. Rev.* **2001**, *213*, 79-128; (f) P. A. Gale, *Coord. Chem. Rev.* **2000**, *199*, 181-233; (g) P. D. Beer, P. A. Gale, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 486-516; (h) L. Fabbrizzi, M. Licchelli, G. Rabaioli, A. F. Taglietti, *Coord. Chem. Rev.* **2000**, *205*, 85-108.

correspondientes cationes isoelectrónicos, y por ello su relación carga-radio es menor, lo que se traduce en que las interacciones electrostáticas son menos efectivas. Por ello, mientras que es posible la coordinación de cationes a ligandos multidentados neutros, en el caso de los aniones es necesario introducir en la molécula receptora grupos cargados positivamente. Es el caso de los iones K^+ y F^- , representados en la figura 21, donde se observa que el K^+ es complejado por el éter 18-corona-6 (**21**), mientras que en el caso del F^- es necesaria la introducción de grupos amonio (**22**).

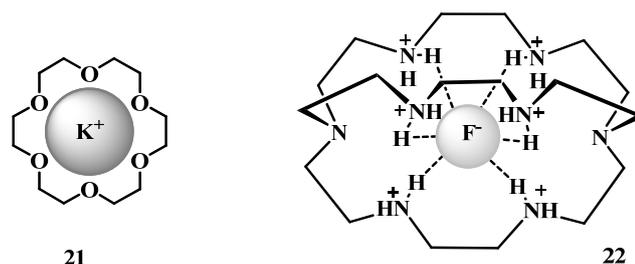


Figura 21: Ejemplos de unidades receptoras en quimio-sensores basados en la formación de enlaces de hidrógeno con grupos NH.

Además, hay que tener en cuenta que los aniones son sensibles al pH y presentan una amplia variedad de geometrías: esférica, lineal, trigonal plana, tetraédrica, octaédrica u otras estructuras de mayor complejidad (Figura 22).

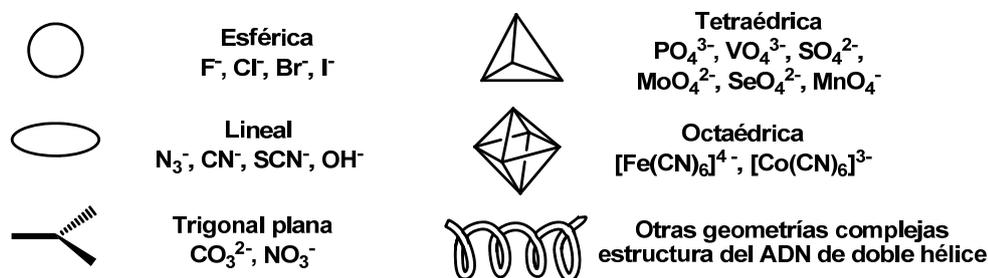


Figura 22: Diferentes estructuras aniónicas.

También es muy importante tener en cuenta el disolvente en el que se va a llevar a cabo el reconocimiento del anión. En el proceso de solvatación del anión las fuerzas predominantes son de carácter electrostático, y los disolventes próticos favorecen la formación de puentes de hidrógeno. Así, un receptor aniónico debe competir con las interacciones del disolvente, por lo que receptores en los que sólo intervengan

interacciones de tipo ión-dipolo deberán utilizarse en medios apróticos, mientras que los receptores cargados podrán utilizarse en medios próticos.

Los sensores de aniones pueden clasificarse en dos grandes categorías, considerando el tipo de interacciones no-covalentes que se producen durante el reconocimiento del anión. Un primer grupo lo constituyen aquellos sensores basados en la formación de enlaces de hidrógeno con grupos NH (y que en algunos casos incluyen también interacciones electrostáticas) y un segundo grupo lo forman aquellos sensores basados en interacciones metal-ligando. Además, existe un tipo especial de sensores que se basan en el método por desplazamiento, y que incluye ambas categorías.

En los sensores basados en la formación de enlaces de hidrógeno con grupos NH, al ser los enlaces de hidrógeno direccionales, es posible el diseño de receptores con formas específicas que sean capaces de diferenciar los aniones por su geometría o por los requerimientos necesarios para la formación de enlaces de hidrógeno en medios no polares. Estos sistemas incluyen generalmente unidades receptoras con grupos urea,⁴² tiourea,⁴³ amina,⁴⁴ amida⁴⁵ y pirrol,⁴⁶ unidas a diferentes unidades de señalización (Figura 23). En el caso de sensores cromogénicos, las unidades de señalización más frecuentes son grupos azobenceno, nitrobenzeno, indoanilina y antraquinona, o grupos con conjugación aromática extendida como quinoxalinas, oxadiazoles y porfirinas, mientras

⁴² E. J. Cho, B. J. Ryu, Y. J. Lee, K. C. Nam, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 2607-2609.

⁴³ (a) T. Gunnlaugsson, P. E. Kruger, P. Jensen, J. Tierney, H. D. P. Ali, G. M. Hussey, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 10875-10878; (b) A. P. Davis, J. B. Joos, *Coord. Chem. Rev.* **2003**, *240*, 143-156; (c) A. J. Ayling, M. N. Perez-Payan, A. P. Davis, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 12716-12717; (d) A. P. Davis, J. J. Perry, R. S. Warham, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 4569-4572.

⁴⁴ (a) J. Hodačová, M. Chadim, J. Zábada, J. Aguilar, E. García-España, S. V. Luis, J. F. Miravet, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 2042-2047; (b) R. J. Fitzmaurice, G. M. Kyne, D. Douheret, J. D. Kilburn, *Perkin Trans. I* **2002**, 841-864; (c) J. Raker, T. E. Glass, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 6113-6116.

⁴⁵ D. Saravanakumar, N. Sengottuvelan, M. Kandaswamy, P. G. Aravindan, D. Velmurugan, *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 7255-7258.

⁴⁶ (a) D. Aldakov, M. A. Palacios, P. Anzenbacher Jr., *Chem. Mater.* **2005**, *17*, 5238-5241; (b) P. A. Gale, *Chem. Commun.* **2005**, *30*, 3761-3772; (c) A. Baeyer, *Ver. Dtsch. Chem. Ges.* **1886**, *19*, 2184-2185; (d) P. A. Gale, J. L. Sessler, V. Král, V. Lynch, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 5140-5141; (e) P. A. Gale, J. L. Sessler, V. Král, *Chem. Commun.* **1998**, 1-8; (f) P. A. Gale, P. Anzenbacher Jr., J. L. Sessler, *Coord. Chem. Rev.* **2001**, *222*, 57-102; (g) R. Nishiyabu, P. Anzenbacher Jr., *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 8270-8271.

que en los sensores fluorogénicos los grupos más frecuentes se basan en hidrocarburos aromáticos policíclicos (antraceno, naftaleno, pireno, etc), heterociclos aromáticos (acridina, diazapireno, fenantridinio, etc) o complejos con diferentes metales (rutenio, iridio, osmio, renio).

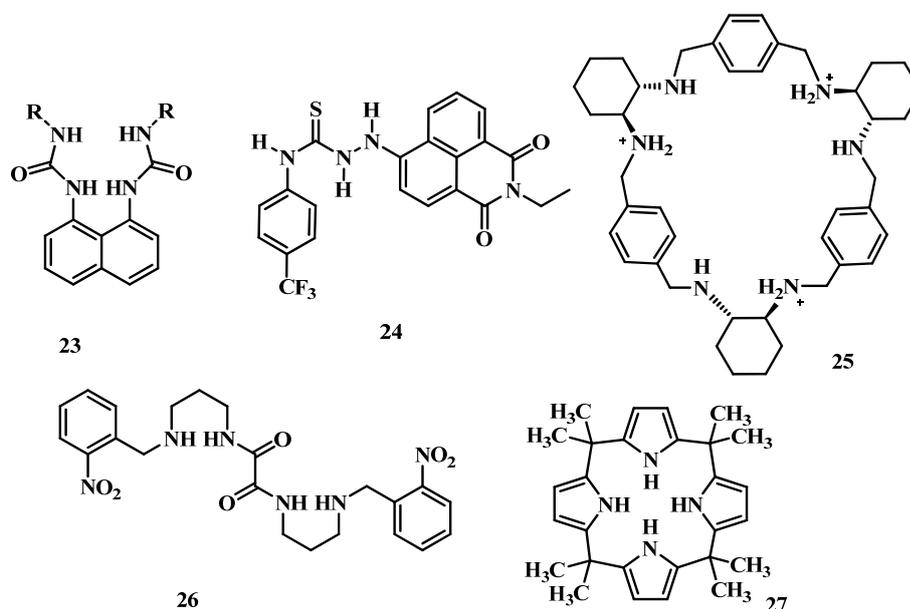


Figura 23: Ejemplos de unidades receptoras en sensores basados en la formación de enlaces de hidrógeno con grupos NH.

En los sensores basados en interacciones metal-ligando los aniones actúan como ligandos coordinándose a distintos cationes metálicos, formando complejos más o menos estables, mediante distintos tipos de interacciones. Dichas interacciones pueden ser de tipo electrostático o covalentes, dependiendo de las características del metal. Por ello, los complejos metálicos pueden utilizarse como receptores aniónicos.⁴⁷ Este tipo de receptores presenta una serie de ventajas. Una de ellas es que las interacciones que envuelven un centro metálico son más fuertes que en otros tipos de receptores donde las interacciones predominantes son de tipo electrostático o enlaces de hidrógeno. Además, el receptor metálico puede presentar determinadas preferencias geométricas que permitan inducir cierta selectividad frente a un determinado anión. Sin embargo, es conveniente

⁴⁷ P. A. Gale, *Coord. Chem. Rev.* **2003**, *240*, 191-221.

modular el carácter coordinante del metal, por ejemplo bloqueando la mayoría de las posiciones coordinantes de éste. Dentro de estos receptores caben destacar dos tipos: los que incluyen en su estructura ácidos de Lewis y los que presentan metales de transición.

Los receptores tipo ácido de Lewis incorporan en su estructura átomos como Hg(II), Zn(II) y boro (**28**), donde no están saturadas todas sus posiciones de coordinación, quedando alguna vacante para la coordinación con el par electrónico del anión.⁴⁸ También existen ejemplos en los que se introducen en la unidad receptora metales de transición tales como europio (**29**), terbio, etc, y que aprovechan sus propiedades luminiscentes. Generalmente se combinan con *ciclen*, que se utiliza como ligando para la construcción de este tipo de complejos (Figura 24).⁴⁹

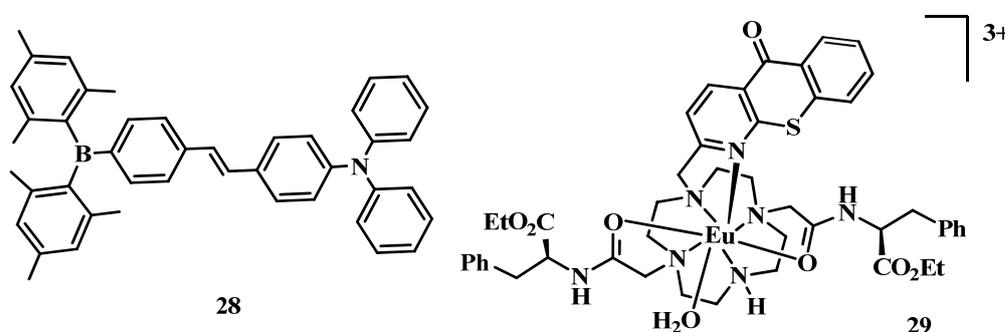


Figura 24: Ejemplos de cada tipo de unidad receptora.

En general, el diseño de un sensor químico incluye una subunidad receptora unida covalentemente a una subunidad que emite una determinada señal. Ambos componentes pueden estar unidos entre sí directamente o a través de un grupo espaciador. Sin embargo, existen otros métodos alternativos en el diseño de sensores. Es el caso de los sensores

⁴⁸ Algunos ejemplos recientes: (a) Y. Kubo, M. Yamamoto, M. Ikeda, M. Takeuchi, S. Shinkai, S. Yamaguchi, K. Tamao, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 2036-2040; (b) S. Solé, F. P. Gabbaï, *Chem. Commun.* **2004**, 1284-1285; (c) J. D. Hoefelmeyer, S. Solé, F. P. Gabbaï, *Dalton Trans.* **2004**, 1254-1258; (d) S. Arimori, M. G. Davidson, T. M. Fyles, T. G. Hibbert, T. D. James, G. I. Kociok-Köhn, *Chem. Commun.* **2004**, 1640-1641; (e) Y. Kubo, A. Kobayashi, T. Ishida, Y. Misawa, T. D. James, *Chem. Commun.* **2005**, 2846-2848; (f) Z. Q. Liu, M. Shi, F. Y. Li, Q. Fang, Z. H. Chen, T. Yi, C. H. Huang, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 5481-5484; (g) M. Melaimi, F. P. Gabbaï, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 9680-9681.

⁴⁹ (a) P. Caravan, J. J. Ellison, T. J. McMurry, R. B. Lauffer, *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2293-2352; (b) D. Parker, J. Yu, *Chem. Commun.* **2005**, 3141-3143; (c) J. Yu, D. Parker, *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 4249-4252; (d) L. Fabbrizzi, F. Foti, A. Taglietti, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 2603-2606.

basados en el desplazamiento, en los que las dos unidades no están unidas de forma covalente, sino que forman un complejo de coordinación. Los avances en este campo han sido descritos con detalle por Anslyn y col.⁵⁰ A partir de su trabajo, se han desarrollado diversos sistemas basados en esta metodología. Por ejemplo, Schumuck y col. han diseñado un sistema para la detección visual de citrato en medios acuosos (Figura 25).⁵¹

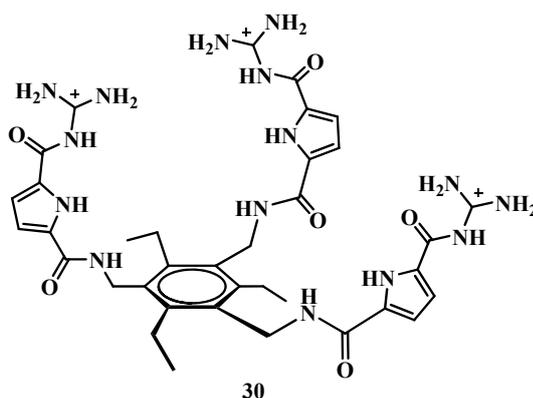


Figura 25: Receptor implicado en la detección de citrato.

Mención especial requiere la detección del anión cianuro. La contaminación por cianuro en el medio ambiente constituye una preocupación importante debido a la toxicidad extrema del cianuro: 0.5–3.5 mg/kg de peso corporal son letales para los seres humanos, por lo que su concentración en el agua potable no puede ser mayor que 2 μ M según a la Organización Mundial de la Salud. Por lo tanto, hay una necesidad generalizada de desarrollar sensores eficaces de anión cianuro. Ros-Lis y col. sintetizaron el fluoróforo subftalocianina **31**,⁵² que responde a aniones cianuro, observándose una completa decoloración, atribuida a una reacción química con el átomo de boro. En acetonitrilo-agua (5%) el quimiosensor responde selectivamente a cianuro (Figura 26).

⁵⁰ S. L. Wiskur, H. Ait-Haddou, J. L. Lavigne, E. V. Anslyn, *Acc. Chem. Res.* **2001**, 963-972.

⁵¹ C. Schumuck, M. Schwegmann, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, 4, 836-838.

⁵² J. V. Ros-Lis, R. Martínez-Mañez, J. Soto, *Chem Commun.*, **2005**, 5260-5262.

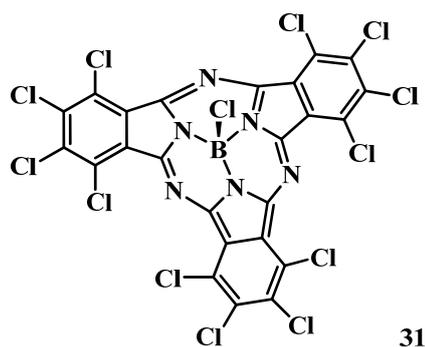
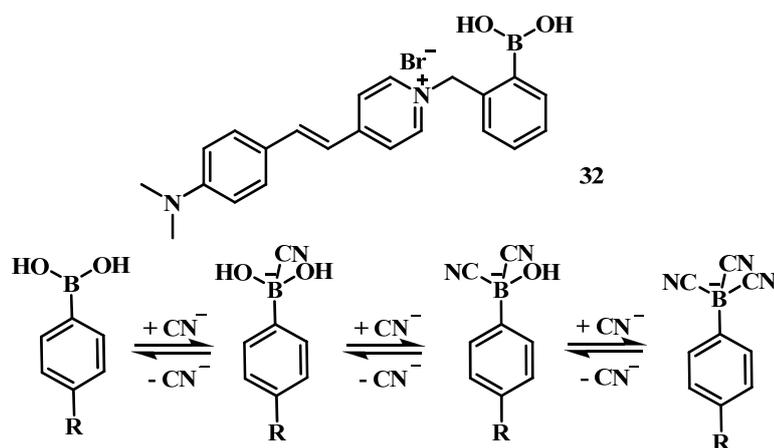


Figura 26: Sensor químico selectivo a cianuro.

Badagu y col. han desarrollado sensores de hemicianina solubles en agua con moléculas de ácido borónico que responden a cianuro.^{53, 54} En este caso la interacción con cianuro provoca una modulación de la capacidad electrón donadora del ácido borónico **32**, que da lugar a un aumento significativo en su fluorescencia (Esquema 4).



Esquema 4: Sensor químico selectivo a cianuro basado en el ácido borónico.

Chung y col. han aplicado el conocimiento de la reactividad química de los derivados fluorescentes del trifluoroacetilo hacia nucleófilos^{55, 56, 57} para detectar cianuro

⁵³ R.Badagu, J. R. Lakowicz, C. D. Geddes, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 3635-3641.

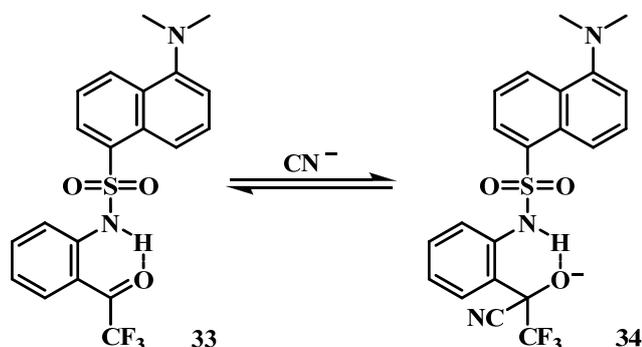
⁵⁴ R. Badagu, J. R. Lakowicz, C. D. Geddes, *Dyes Pigments*, **2005**, *64*, 49-55.

⁵⁵ G. J. Mohr, F. Lehmann, U. W. Grummt, U. E. Spichiger, *Anal. Chim. Acta*, **1997**, *344*, 215-225.

⁵⁶ G. J. Mohr, C. Demuth, U. E. Spichiger, *Anal. Chem.*, **1998**, *70*, 3868-3873.

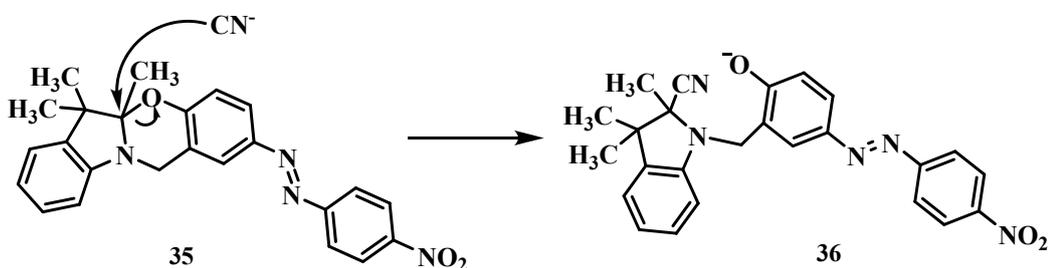
⁵⁷ G. J. Mohr, N. Tirelli, U. E. Spichiger, *Anal. Chem.*, **1999**, *71*, 1534-1539.

en MeCN.⁵⁸ Cuando el quimiosensor **33** se expone a cianuro, acetato, fluoruro o dihidrógeno fosfato el máximo de fluorescencia se modifica, aumentando cinco veces su valor inicial. La interacción con cianuro es debida a la estabilización del aducto resultante **34** mediante interacción por un puente de hidrógeno intramolecular (Esquema 5).



Esquema 5: Sensor químico fluorescente de cianuro.

Tomasulo y col. han diseñado un quimiodosímetro para el anión cianuro basado en una reacción irreversible que provoca la apertura del anillo de una oxazina.^{59, 60} En concreto, un anillo de benzoxazina se fusiona con un fragmento de indolina dando el derivado **35**. Debido a la reacción con cianuro el anillo de benzooxazina se abre y se forma un 4-nitrofenilazofenolato cromofórico **36** (Esquema 6).



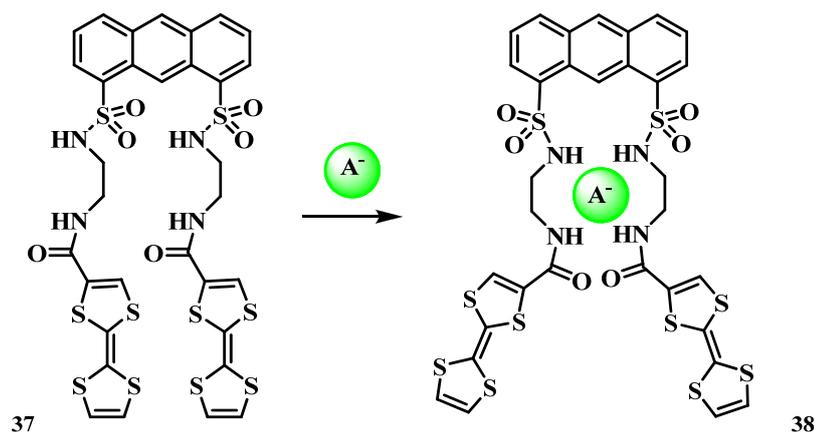
Esquema 6: Sensor químico de cianuro basado en la apertura de una oxazina.

⁵⁸ Y. M. Chung, B. Raman, D. S. Kim, K. H. Ahn, *Chem. Commun.*, **2006**, 186-188.

⁵⁹ M. Tomasulo, F. M. Raymo, *Org. Lett.*, **2005**, 7, 4633-4636.

⁶⁰ M. Tomasulo, S. Sortino, A. J. P. White, F. M. Raymo, *J. Org. Chem.*, **2006**, 71, 744-753.

Los receptores de TTF para aniones son también objeto de gran interés. La unidad de TTF puede utilizarse para el proceso de reconocimiento de un anión, así el receptor de aniones **37** se basa en un derivado de disulfonamida antraceno que incorpora dos unidades de TTF,⁶¹ en que la distancia entre las unidades TTF y el antraceno puede ser modulada a través de la coordinación de un anión en el hueco intermedio formado por los enlaces NH (Esquema 7). En particular, **37** muestra una alta sensibilidad y selectividad hacia ión fluoruro, que se caracteriza por un fuerte incremento de la fluorescencia del antraceno.



Esquema 7: Receptor de aniones dual óptico-electroquímico.

El derivado de TTF **39**⁶² exhibe selectividad notable para H_2PO_4^- sobre una amplia gama de aniones (Figura 27), formando un complejo de estequiometría 2:1.

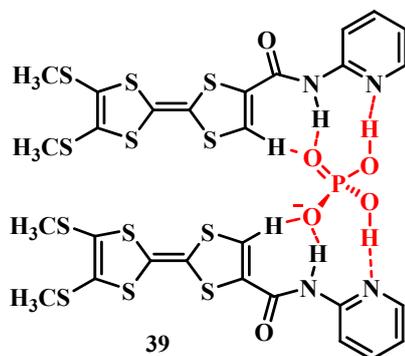


Figura 27: Compuestos de TTF-amida-piridina para la complejación de aniones o cationes.

⁶¹ H. Lu, W. Xu, D. Zhang, C. Chen, D. Zhu, *Org. Lett.*, **2005**, 7, 4629-4632.

⁶² H. Lu, W. Xu, D. Zhang, D. Zhu, *Chem. Commun.*, **2005**, 4777-4779.

El ajuste de la fuerza, número y orientación de las interacciones entre complejos basados en puentes de hidrógeno es otro objetivo de considerable interés actual dentro de la comunidad de química supramolecular. En el caso de receptores conteniendo calix[4]areno se ha observado un mecanismo de complejación cooperativo del anión mediante unidades de acrilamida actuando de forma conjunta. El derivado de calixareno **40** muestra una afinidad buena para H_2PO_4^- con una estructura de cono que se vuelve rígida mediante coordinación del anión (Figura 28).⁶³

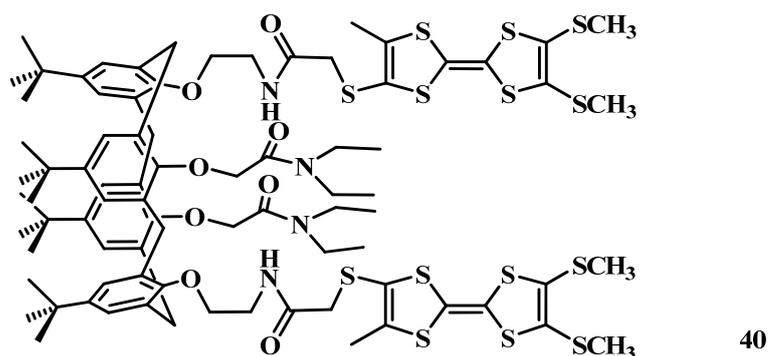


Figura 28: Receptor de H_2PO_4^- derivado de calixareno.

El núcleo de calix[4]pirrol, que tiene analogía estructural con los calixarenos, ha sido muy estudiado como receptor de aniones.⁶⁴ Basado en este esqueleto, Sessler y col. han sintetizado una serie de TTF-calix[4]pirroles **41–44** (Figura 29) capaces de detectar aniones haluro. Los cuatro protones NH centrales desempeñan un papel crítico en esa alta afinidad por aniones haluro en disolventes orgánicos.⁶⁵ El receptor **41** muestra afinidades para aniones X^- que están entre las mayores para calix[4]pirroles.⁶⁶ La metodología sintética ha sido adaptada a TTF-oligopirroles basados en meso-octametilcalix[4]pirrol,

⁶³ (a) Q. Y. Zhu, H. H. Lin, J. Dai, G. Q. Bian, Y. Zhang, W. Lu, *New J. Chem.*, **2006**, *30*, 1140-1144. (b) B. T. Zhao, M. J. Blesa, N. Mercier, F. Le Derf, M. Sallé, *Supramol. Chem.*, **2005**, *17*, 465-468.

⁶⁴(a) J. L. Sessler, S.Camiolo, P. A. Gale, *Coord. Chem. Rev.*, **2003**, *240*, 17-55; (b) C. H. Lee, H. Miyaji, D. W. Yoon, J. L. Sessler, *Chem. Commun.*, **2008**, 24-34.

⁶⁵ K. A. Nielsen, J. O. Jeppesen, E. Levillain, J. Becher, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2003**, *42*, 187-191.

⁶⁶ C. H. Lee, H. K. Na, D. W. Yoon, D. H. Won, W. S. Cho, V. M. Lynch, S. V. Shevchuk, J. L. Sessler, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 7301-7306.

que llevan uno (**42**), dos (**43**) o cuatro unidades de monopirrol-TTF⁶⁷ (**44**) y que muestran fuerte afinidad por aniones haluro. Se observan mayores constantes de asociación pero menor selectividad a medida que aumenta el número de unidades TTF en la periferia. El compuesto **44** puede actuar como un receptor para moléculas neutras deficitarias de electrones como el explosivo 1,3,5-trinitrobenzeno, TNB, que se intercala entre cada par de unidades de TTF alternadas.⁶⁸ El proceso de reconocimiento se ve a simple vista mediante adición de cloruro ya que la fuerte afinidad de **44** para Cl⁻ cambia el equilibrio, pasando de color verde a amarillo.

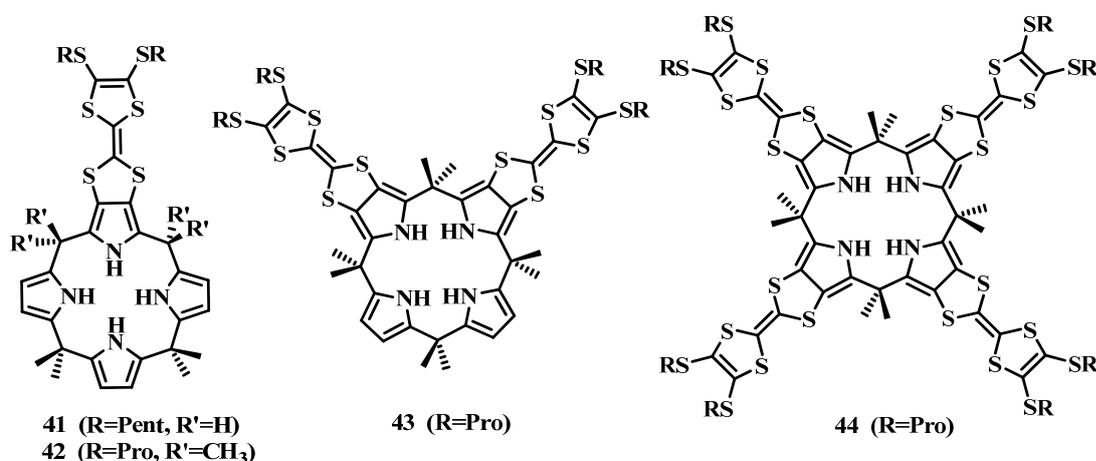


Figura 29: Derivados de TTF-calixpirrol.

1.2. Detección de moléculas neutras

La detección de analitos neutros mediante sensores químicos es un tema poco explorado en comparación con la detección de cationes o aniones. Existen pocos ejemplos de moléculas que actúen como ligandos e indicadores en el reconocimiento de moléculas neutras. Entre los más utilizados se encuentran los éteres corona, las ciclodextrinas o los calixarenos. El reconocimiento no covalente de este tipo de moléculas se basa en enlaces

⁶⁷ K. A. Nielsen, W. S. Cho, J. Lyskawa, E. Levillain, V. M. Lynch, J. L. Sessler, J. O. Jeppesen, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 2444-2451.

⁶⁸ K. A. Nielsen, W. S. Cho, J. O. Jeppesen, V. M. Lynch, J. Becher, J. L. Sessler, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 16296-16297.

de hidrógeno, interacciones de Van der Waals o interacciones de tipo hidrofóbico. El diseño de sensores en estos casos es muy complicado debido a la diversidad de analitos existentes, de tamaño mucho mayor que los aniones y cationes inorgánicos, y a que las interacciones dominantes son de carácter débil. En la detección de moléculas neutras, las que mayor interés suscitan son biomoléculas como urea (**45**), aminas, ácidos carboxílicos, hidroquinonas, alcaloides, carbohidratos (**46**),⁶⁹ aminoácidos⁷⁰ (**47**) y péptidos (Figura 30).

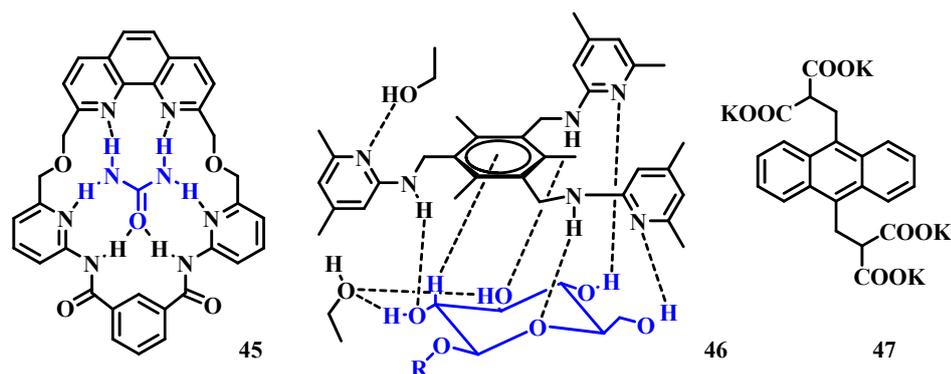


Figura 30: Diferentes ejemplos de receptores de moléculas neutras

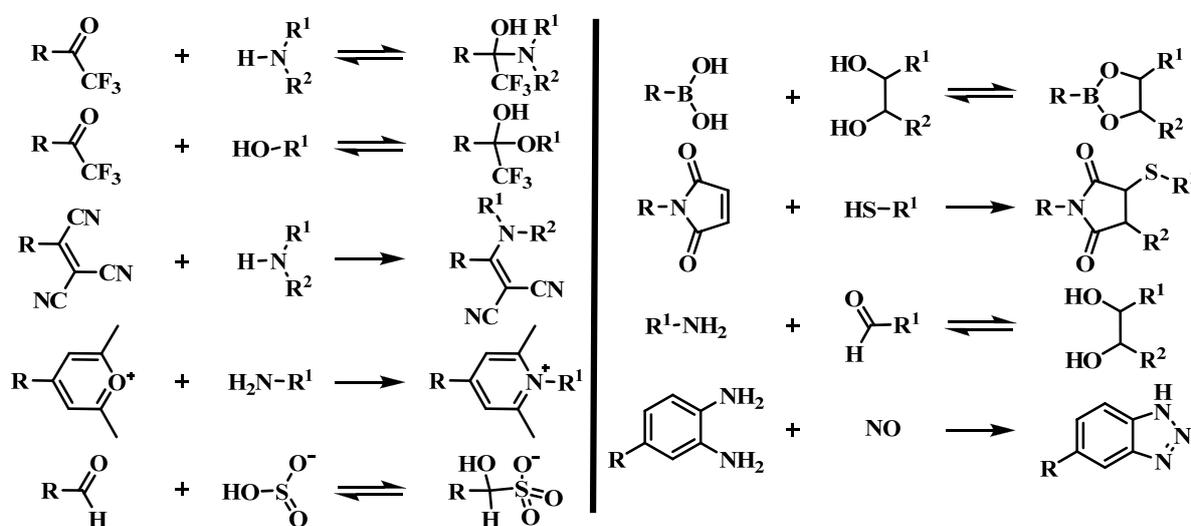
La forma más común de detectar moléculas neutras es mediante *dosímetros químicos*, que implican una reacción química en presencia del analito y permiten discriminar analitos por su reactividad química (nucleofilia, electrofilia). Como consecuencia de los cambios estructurales que provoca la reacción con el analito de interés, se detectan cambios en el color de la disolución, modificaciones en la absorbancia en UV-Visible o variaciones en la intensidad emisora fluorescente, lo que permite la detección del analito. En general este tipo de detección es útil cuando la reacción química que ocurre es reversible, lo que permite recuperar el reactivo inicial y usarlo repetidas veces en los análisis. Sin embargo, aunque la reacción química no sea reversible, este tipo de moléculas es útil en la industria, por ejemplo para la obtención de papeles o películas

⁶⁹ a) T. Zhang, E. V. Anslyn. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 1649-1652; b) M. Mazik, H. Cavga. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 2957-2963; c) M. Mazik, M. Kuschel, W. Sicking. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 855-858; d) S. Litvinchuk, N. Sordé, S. Matile. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 9316-9317; e) M. Mazik, W. Radunz, R. Boese. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 7448-7462; f) M. Mazik, W. Sicking. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 3117-3121; g) M. Mazik, H. Cavga, P. G. Jones. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 9045-9052.

⁷⁰ Y. Fu, H. Li, W. Hu, D. Zhu. *Chem. Commun.* **2005**, 3189-3191.

de PVC indicadoras, que permitan la detección de los analitos de manera muy rápida, sencilla y sin la necesidad de ningún aparato.

La formación de enlaces covalentes reversibles es útil para detectar moléculas de analito cuando da lugar a señales ópticas de transducción.⁷¹ Los enlaces pueden ser estables, dando lugar a una sonda para el analito (quimiodosímetro) o pueden ser reversibles, de forma que el quimiosensor (cromoreactivo) se puede utilizar para la monitorización continua de la sustancia a analizar⁷². Ejemplos relevantes de reacciones químicas usadas para la evaluación óptica se muestran en el esquema siguiente.⁷³



Esquema 8: Funciones receptoras que pueden utilizarse para reconocer el analito vía formación de enlace covalente reversible.

1.2.1. Sensores de aminas, diaminas y aminoácidos

El grupo de Wolfbeis ha introducido recientemente sondas selectivas ópticas para aminas alifáticas primarias que contienen en su estructura el ión pirilio^{74,75}. La sonda 2,6-dimetilpirilio **48** exhibe un máximo de emisión de 665 nm. Cuando esta sonda reacciona

⁷¹ G. J. Mohr, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2006**, 386, 1201-1214.

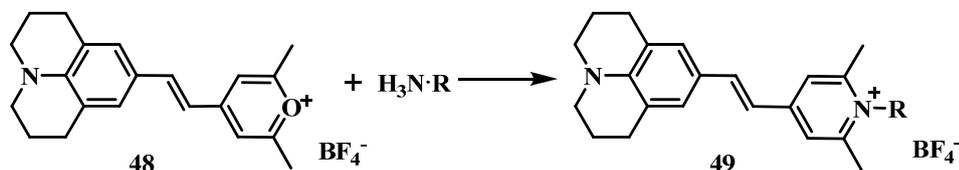
⁷² G. J. Mohr, *Chem. Eur. J.*, **2004**, 10, 1083-1090.

⁷³ G. J. Mohr, *Sens Actuators B*, **2005**, 107, 2-13.

⁷⁴ B. K. Wetzl, S. M. Yarmoluk, D. B. Craig, O. S. Wolfbeis, *Angew. Chem.*, **2004**, 116, 5515-5517.

⁷⁵ B. K. Höfelschweiger, A. Dürkop, O. S. Wolfbeis, *Anal Biochem*, **2005**, 344, 122-129.

con aminas, el color azul cambia a rojo con un máximo de emisión de 602 nm. La reacción es irreversible por lo que se puede utilizar para cuantificar aminas (Esquema 9).



Esquema 9

M. Comes y colaboradores han utilizado una estructura similar, 4-(4-aminofenil)-2,6-difenilpirilio **50** para la detección de aminas alifáticas en solución acuosa,⁷⁶ mediante un cambio de color de magenta a amarillo. Para inducir selectividad en el reconocimiento se unió covalentemente el derivado de pirilio a un material de silica mesoporoso llamado MCM-41. El sistema poroso favorece la entrada de aminas de cadena media como *n*-heptil-, *n*-octil- y *n*-nonilamina, mientras que no se producen cambios de color para aminas con cadenas alquílicas muy cortas o muy largas. El mismo sensor se introdujo en cavidades de zeolita *Beta* observándose de nuevo selectividad a aminoalcanos lipófilos lineales, pero no respuesta frente a aminas voluminosas o hidrofílicas⁷⁷ (Figura 31).

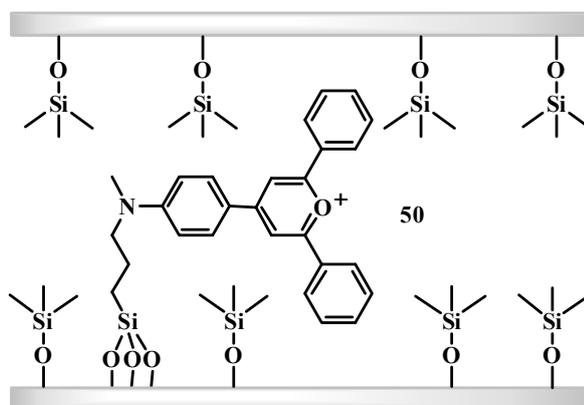


Figura 31

⁷⁶ M. Comes, M. D. Marcos, R. Martínez-Mañez, M. C. Millán, F. Sancenón, J. Soto, L. A. Villaescusa, P. Amorós, D. Beltrán, *Adv. Meter.*, **2004**, *16*, 1783-1786.

⁷⁷ M. Comes, M. D. Marcos, R. Martínez-Mañez, M. C. Millán, J. V. Ros-Lis, F. Sancenón, J. Soto, L. A. Villaescusa, *Chem. Eur. J.*, **2006**, *12*, 2162-2170.

El grupo de trabajo ha sintetizado un sensor de aminas que absorbe a otras longitudes de onda mediante la incorporación de un derivado de dicianometileno indeno **51** dentro del mesoporo de MCM-41⁷⁸. En este caso se observa que las partículas del sensor tienen más afinidad por aminas de cadena alifática media. El cambio de color observado va de morado a naranja pálido, con desplazamientos en el máximo de absorbancia que van desde 554 nm a 445 nm. En este caso, las partículas del sensor son más sensibles a aminas con cadenas alquílicas largas, *n*-nonilamina, *n*-decilamina y *n*-undecilamina, y no dan respuesta a cianuro, hidróxido o cationes (Figura 32).

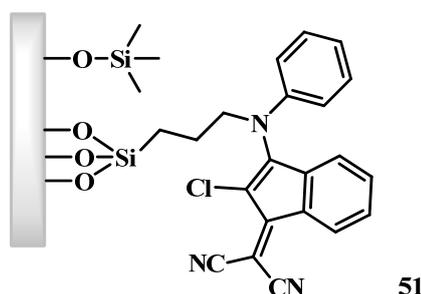
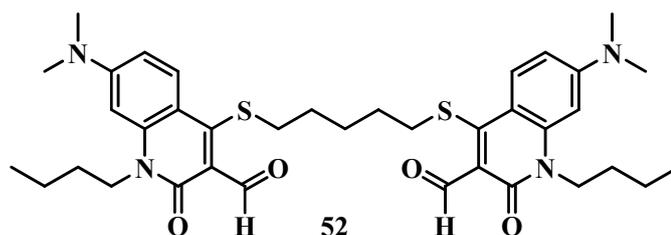


Figura 32

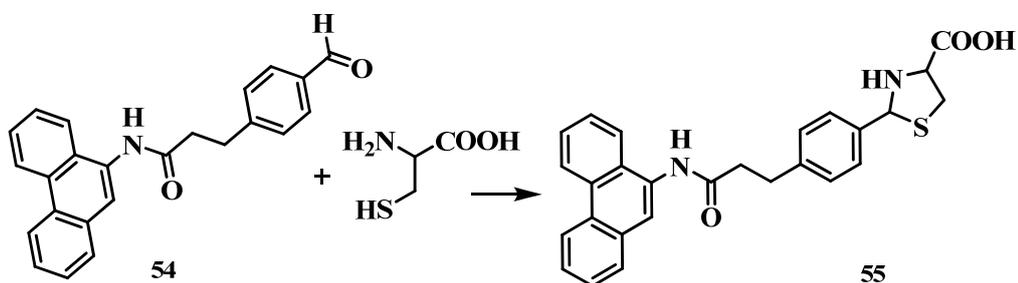
Secor y colaboradores han utilizado un elemento diferente para inducir la selectividad en el reconocimiento de aminas⁷⁹ mediante un receptor bifuncional para diaminoalcanos y aminoácidos relacionados, como ornitina y lisina. Cuando el dímero del aldehído de quinolona **52** reacciona con diaminopropano se observa un desplazamiento en el máximo de absorbancia de 440 nm a 470nm, con un aumento de la fluorescencia a 530 nm. La mayor selectividad de **52** se observa para 1,3-diaminopropano, seguido de lisina, ornitina, 1,5-diaminopentano y 1,4-diaminobutano, formando bis-iminas (Figura 33).

⁷⁸ S. Basurto, T. Torroba, M. Comes, R. Martínez-Mañez, F. Sancenon, L. A. Villaescusa, P. Amorós, *Org. Lett.*, **2005**, 7, 5469-5472.

⁷⁹ K. Secor, J. Plante, C. Avesta, T. Glass, *J. Mater. Chem.*, **2005**, 15, 4073-7077.

**Figura 33**

Tanaka y colaboradores introdujeron un aldehído fluorogénico para la detección de aminoácidos, especialmente, cisteína⁸⁰. El derivado de fenantreno fluorescente **53**, que contiene una función aldehído reactiva, reacciona con cisteína para formar el derivado de tiazolidina **54**. Como consecuencia de esta reacción química específica, la fluorescencia aumenta significativamente. Solo el glutatión muestra un pequeño aumento en la fluorescencia mientras que los otros aminoácidos investigados (metionina, serina, lisina, prolina, histidina, etc.) no muestran ninguna respuesta. A partir de este uso selectivo, y de la respuesta irreversible, los autores concluyeron que la tiazolidina **54** en lugar de la formación hemiaminal o imonio fue la responsable de la selectividad observada hacia la cisteína (Esquema 10).

**Esquema 10**

Sasaki y colaboradores han utilizado la función tricloroacetilo para detectar aminoácidos⁸¹. Sintetizaron un derivado bifuncional **56**, donde el primer grupo tricloroacetilo fue utilizado para formar un hemiaminal con la función amino, mientras que el segundo reacciona con la función carboxilato. El fluoroionóforo **56** muestra un

⁸⁰ F. Tanaka, N. Mase, C. F. Barbas, *Chem. Commun.*, **2004**, 1762-1763.

⁸¹ S. Sasaki, G. Monma, D. Citterio, K. Yamada, K. Suzuki, *Chimia.*, **2005**, 59, 204-208.

aumento significativo de su fluorescencia cuando se expone a glicina, cisteína y fenilalanina en disolución o colocado en una capa fina de PVC que se pone en contacto con aminoácidos (Figura 34).

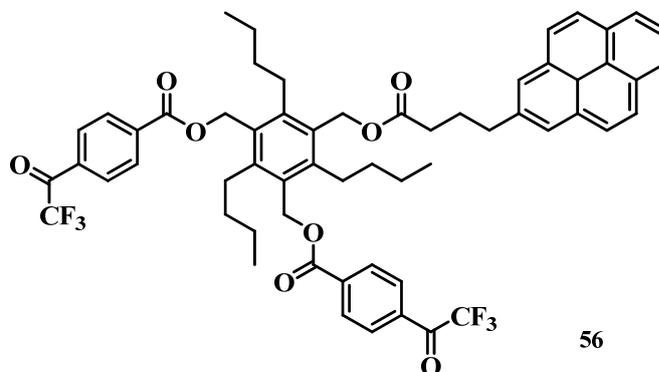
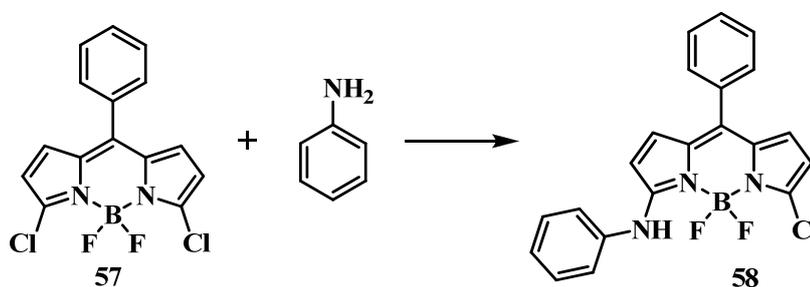


Figura 34

Un indicador para aminas aromáticas, desarrollado por Roland y colaboradores, consiste en 3,5-dicloro-BODIPY **57** que muestra una reactividad significativa hacia aminas,⁸² mostrando cambios de absorbancia y fluorescencia, y que puede ser utilizado para la detección de aminas menos nucleofílicas (Esquema 11).



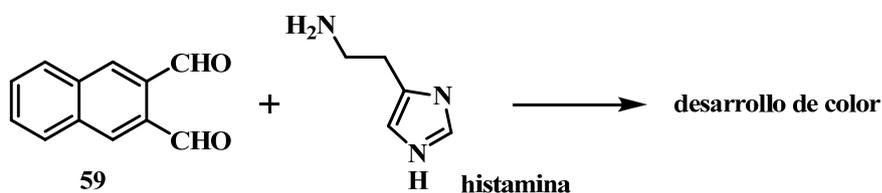
Esquema 11

Oguri y colaboradores encontraron que el 2,3-naftalendicarboxaldehído **59** actúa como un reactivo de color selectivo para histamina en ausencia de reductor,⁸³ mostrando un aumento de la absorbancia. No se observa una formación de color igual para el caso de

⁸² T. Rohand, M. Baruah, W. Qin, N. Boens, W. Dehan, *Chem Commun.*, **2006**, 266-268; *Anal. Chim. Acta*, **2006**, 556

⁸³ S. Oguri, A. Mizusawa, M. Kamada, M. Kohori, *Anal. Chim. Acta*, **2006**, 558, 326-331.

aminoácidos como glicina, alanina, arginina, lisina, triptofano o aminas biogénicas como cadaverina, putrescina, espermidina o tiramina, mientras que se observaron interferencias significativas por histidina y serotonina. Los autores también desarrollaron una técnica para enriquecer la histamina a partir de una muestra retenida en silicagel (Esquema 12).



Esquema 12

Otro método consiste en el uso de moléculas receptoras colestéricas, por ejemplo el colesteril ester del ácido 4-trifluoroacetilbenzoico **60**, el cual es sensible a vapores de amina.⁸⁴ (Figura 35). Para obtener una película estable del sensor se combinó con polímero dispersado en una película de cristal líquido, que mostró un desplazamiento en el máximo de reflectancia y un cambio de color de azul a verde en presencia de vapores de 1-butilamina, selectivamente con respecto a dietilamina, debido a que las aminas primarias interaccionan mejor con el trifluoroacetilo de **60** para formar un hemiaminal.

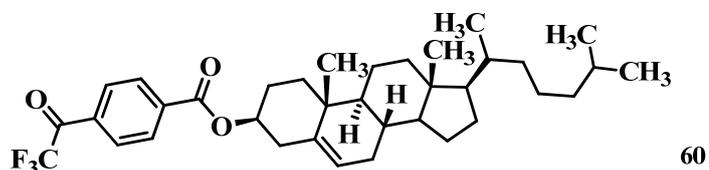


Figura 35

1.2.2. Detección de agentes de guerra organofosforados

En un intento de detectar agentes de guerra organofosforados, Ilhan y colaboradores desarrollaron un quimiosensor derivado del antraceno, con alta solubilidad en disolventes polares debido a la introducción de grupos tetraetilenglicoxilo dentro de su estructura **61**⁸⁵ que no muestra fluorescencia a causa de la transferencia electrónica

⁸⁴ N. Kirchner, L. Zedler, T. G. Mayerhöfer, G. J. Mohr, *Chem. Commun.*, **2006**, 1512-1514.

⁸⁵ F. Ilhan, D. S. Tyson, M. A. Meador, *Chem. Mater.*, **2004**, *16*, 2978-2980.

fotoinducida de la amina al antraceno. La reacción con diclorotiofosfato, dicloruro metilfosfónico o cloruro dimetilfosfínico dio lugar a la generación de fluorescencia verde. Inmovilizando **61** sobre sílica se observa un aumento similar de fluorescencia (Figura 36).

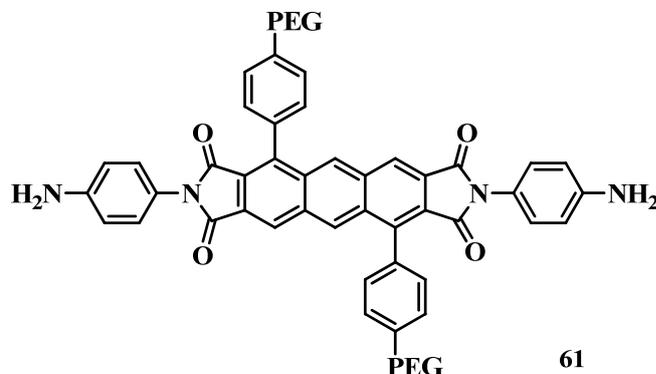
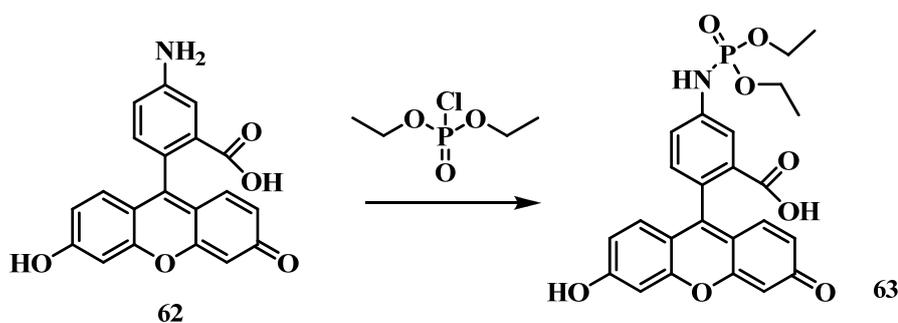


Figura 36

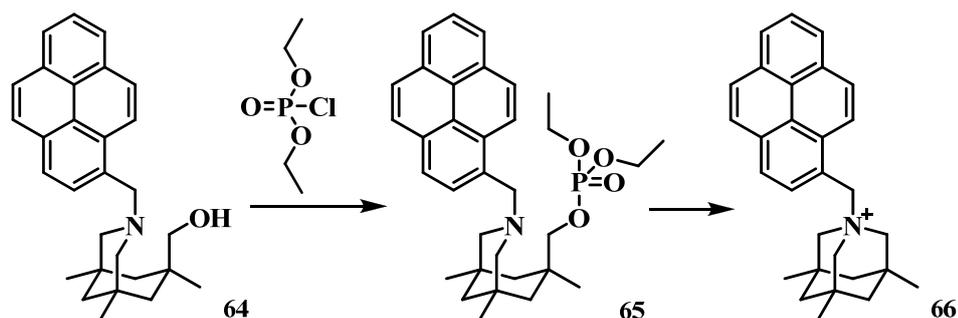
El grupo de investigación de David Walt presentó un estudio para la detección de vapores reactivos de un agente organofosforado de guerra por inmovilización de la fluoresceinamina **62** sobre microcapas de polímero⁸⁶. Esta operación se basa en el hecho de que los agentes nerviosos poseen funciones reactivas que inhiben la acetilcolinoesterasa y que esas mismas funciones pueden reaccionar con indicadores fluorescentes. La fluoresceinamina **62** muestra una fluorescencia débil que aumenta significativamente mediante reacción con dietilclorofosfato, (Esquema 13).



Esquema 13

⁸⁶ S. Bencic-Negale, T. Sternfeld, D. R. Walt, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 5041-5048.

Dale y Rebek utilizaron una reacción en dos pasos para detectar agentes nerviosos.⁸⁷ El sensor **64** no es fluorescente, pero la ciclación de **64** para formar la sal de amonio **66** en presencia de dialquilcloro- o fluorofosfatos aumenta la fluorescencia en 22 veces. Los autores también prepararon una dispersión de **64** sobre papel de filtro y observaron un aumento visible de la fluorescencia cuando se expone a vapores de diisopropilfluorofosfato (Esquema 14).



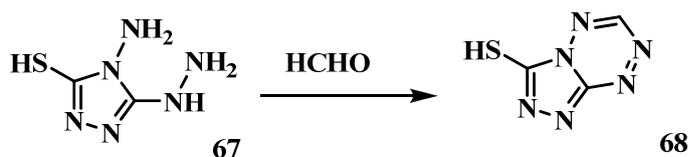
Esquema 14

1.2.3. Detección de formaldehído

Kawamura y colaboradores desarrollaron un sensor de mano de gas formaldehído para la detección del llamado síndrome del edificio enfermo⁸⁸. Para esto gotearon soluciones del reactivo 4-amino-3-hidrazino-5-mercapto-1,2,4-triazol **67** junto con hidróxido potásico acuoso sobre un filtro de cristal, justo antes de cada medida. Cuando el filtro que contiene esta mezcla acuosa se expuso a formaldehído acuoso con un flujo de 400 mL/min se observó un color púrpura con un máximo de absorbancia en torno a 540 nm, observada a través de un dispositivo con un LED como fuente de luz y un fotodiodo para la detección de luz reflejada. La sensibilidad del dispositivo estuvo en el rango de 0.04-1 ppm y no dio respuesta a interferentes como alcoholes, cetonas, ácido acético o amoníaco en concentraciones hasta 1000 ppm, mientras que se observó una respuesta menor para acetaldehído y glutaraldehído (Esquema 15).

⁸⁷ T. J. Dale, J. Rebek, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 4500-4501.

⁸⁸ K. Kawamura, K. Kerman, M. Fujihara, N. Nagatani, T. Hashiba, E. Tamiya, *Sens Actuators B*, **2005**, *105*, 495-501.



Esquema 15

Toda y colaboradores presentaron un sistema portátil para la detección continua de formaldehído gaseoso basado en una reacción cromogénica. Desarrollaron un sistema *stopped-flow* utilizando una unidad depuradora de difusión para enriquecer formaldehído y después se eluyó el formaldehído con una disolución buffer para reaccionar con la 3-metil-2-benzotiazolona hidrazona **69** y FeCl_3 , dando un color intenso a 629 nm. El límite de detección fue 0.08 ppb, y el tiempo de medida medio fue de 5 min⁸⁹ (Figura 37).

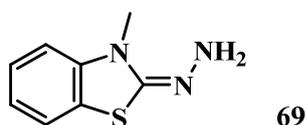
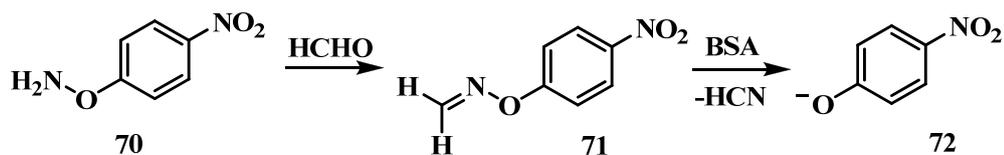


Figura 37

Salahuddin y colaboradores han descrito una nueva reacción química para la detección de aldehído basada en la fragmentación de enlaces oxima de estructuras cromogénicas/fluorogénicas que tiene lugar a temperatura ambiente⁹⁰. Sintetizaron oxiaminas de nitrofenoles (**70**) y umbeliferonas que reaccionan con aldehídos a pH neutro para formar oximas (**71**) que sufren reacciones de fragmentación (β -eliminación) en presencia de catalizador albúmina de suero bovino (BSA) para dar aniones fenolato (**72**) coloreados o fluorescentes. Como ejemplo, la microvaloración de *O*-(4-nitrofenil)-hidroxilamina (**70**) con formaldehído en buffer a pH = 7.2, da lugar al aumento irreversible de la absorbancia a 405 nm en el rango de 1 μM -4mM de formaldehído (Esquema 16).

⁸⁹ K. Toda, K. I. Yoshioka, K. Mori, S. Hirata, *Anal. Chim. Acta*, **2005**, 531, 41-49.

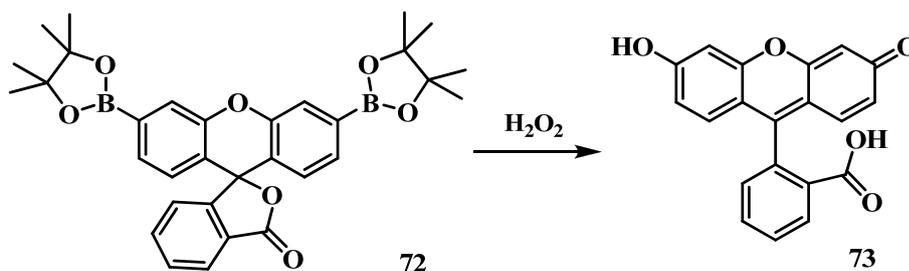
⁹⁰ S. Salahuddin, O. Renaudet, J. L. Reymond, *Org. Biomol. Chem.*, **2004**, 2, 1471-1475.



Esquema 16

1.2.4. Detección de peróxido de hidrógeno

Chang y colaboradores diseñaron una sonda óptica de celda permeable para peróxido de hidrógeno utilizando el 3',6'-bis(pinacolatoboron)fluorano **73**⁹¹ que no es fluorescente a pH = 7 y no absorbe en el visible debido a su forma lactona. Expuesto a peróxido de hidrógeno sufre la desprotección hidrolítica de las funciones boronato, generando una fluoresceína abierta coloreada y fluorescente a 510 nm, excitando a 450 nm. En células vivas **73** es permeable a la membrana y responde a peróxido de hidrógeno en un rango del orden de los micromoles (Esquema 17).



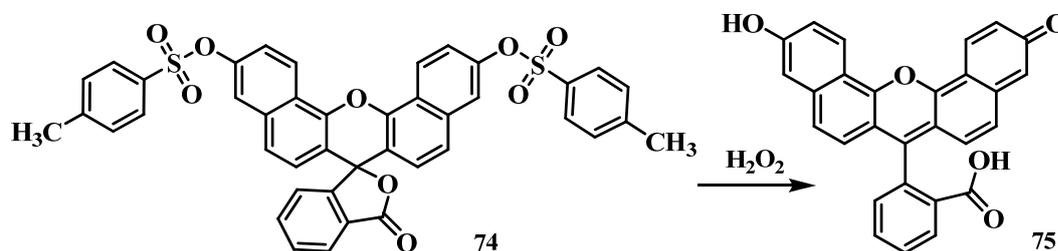
Esquema 17

Xu y colaboradores desarrollaron un quimiosensor disulfonato de naftofluoresceína **74** en que la fluorescencia y la absorbancia se desplazan hasta cerca del infrarrojo cercano en la detección⁹². El quimiosensor inicial es una lactona incolora que se hidroliza en presencia de peróxido de hidrógeno, formando la naftofluoresceína (**75**) coloreada y fluorescente con un máximo de fluorescencia a 662 nm (excitación a 602 nm). El sensor mostró una calibración lineal en el rango de 6 nM - 4 μM de peróxido de hidrógeno y un límite de detección de 81.5 pM en una mezcla DMSO/buffer (1:9) a pH

⁹¹ M. C. Y. Chang, A. Pralle, E Y. Isacof, C. J. Chang, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126, 15392-15393.

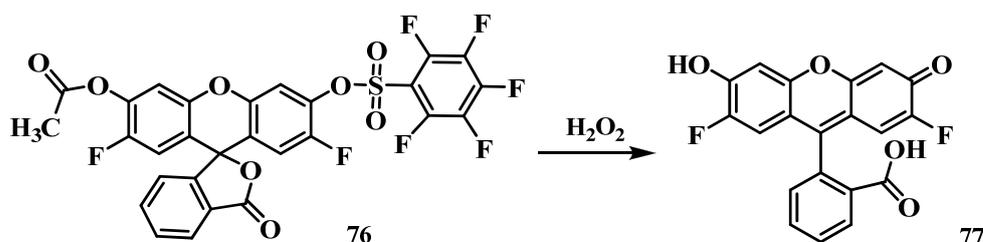
⁹² K. Xu, B. Tang, H. Huang, G. Yang, Z. Chen, P. Li, L. An, *Chem Commun.*, **2005**, 5974-5976.

7.4, con buena selectividad, y puede ser utilizado para controlar concentraciones nanomolares de peróxido de hidrógeno en células vivas (Esquema 18).



Esquema 18

Maeda y colaboradores han sintetizado derivados comparables de fluoresceína con sustituyentes cloro- y fluoro-, por ejemplo el compuesto **76**, observando una selectividad y sensibilidad comparable (5 pmol a 9 nmol de peróxido de hidrógeno), aunque con aumento de fluorescencia en torno a 524 nm, excitando a 492 nm⁹³ (Esquema 19).



Esquema 19

1.2.5. Detección de óxido nítrico y anión nitrito

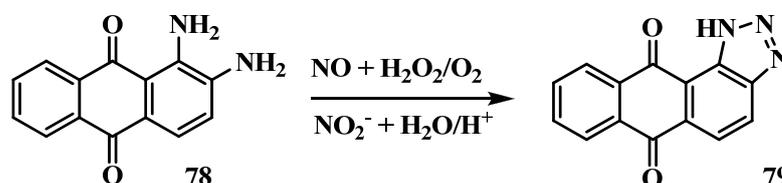
Una revisión dedicada al uso de sensores fluorescentes para especies nitrógeno reactivas cubre la detección de óxido nítrico, anión peroxinitrito y algunos de sus derivados en fluidos biológicos y no biológicos.⁹⁴ Como ejemplo representativo, Bru y colaboradores han utilizado un polímero dopado con 1,2-diaminoantraquinona **78** para detectar óxido nítrico y nitrito mediante formación de triazoles **79**.⁹⁵ Así, polimerizaron 2-

⁹³ H. Maeda, Y. Fukuyasu, S. Yoshida, M. Fukuda, K. Sueki, H. Matsuno, Y. Yamauchi, K. Yacida, K. Hirata, K. Miyamoto, *Angew. Chem.*, **2004**, *116*, 2443-2445.

⁹⁴ A. Gomes, E. Fernández, J. L. F. C. Lima, *J. Fluoresc.*, **2006**, *16*, 119-139.

⁹⁵ M. Bru, M. I. Burguete, F. Galindo, S. V. Luis, M. J. Marin, L. Vigara, *Tetrahedron Lett.*, **2006**, *47*, 1787-1791.

hidroxietilmetacrilato y etilenglicoldimetacrilato en presencia de 1,2-diaminoantraquinona para dar capas delgadas de polímero de color rojo y las expusieron a disoluciones acuosas de óxido nítrico a pH = 7.4, observando que el máximo de absorbancia a 520 nm desaparecía, formándose un nuevo máximo de absorbancia a 350 nm. Aunque **78** no estaba unido covalentemente a la matriz polimérica, no se observaron pérdidas por lixiviación al almacenar la capa en una disolución de agua tamponada a pH = 7.4 durante 6 meses. Se encontró un cambio similar de color para el caso del anión nitrito en una solución de ácido acético al 1%, dando una correlación lineal en el rango del límite de detección de 120 μM (Esquema 20).



Esquema 20

Zguris y Pishko han desarrollado un hidrogel de poli(etilenglicol) fluorescente para detectar óxido nítrico en disolución acuosa,⁹⁶ insertando 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoresceína **80** en la microestructura del hidrogel, utilizando métodos fotolitográficos sobre sustratos de cristal. La capa de sensor mostró un aumento lineal de fluorescencia a 515 nm (excitación a 480 nm) mediante exposición a 0.5-8 μM de óxido nítrico en una disolución de fosfato a pH = 7.4, dando respuesta irreversible (Figura 38).

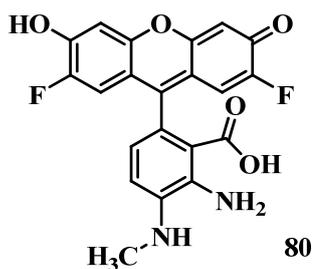
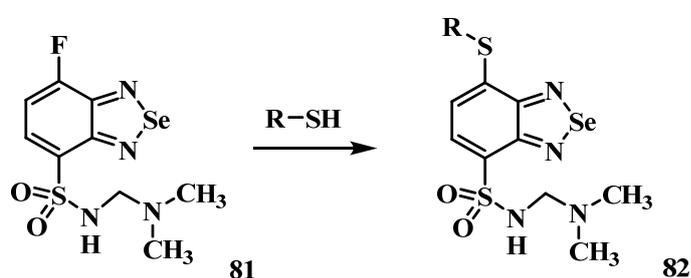


Figura 38

⁹⁶ J. Zguris, M. V. Pishko, *Sens Actuators B*, **2006**, *115*, 503-509.

1.2.6. Detección de péptidos y proteínas a través de grupos tiol

Saimaru y colaboradores sintetizaron el quimiosensor no fluorescente **81** para analizar péptidos y proteínas mediante su reactividad con tioles⁹⁷. Por interacción de **81** con proteínas y péptidos a pH = 9.0, en presencia de una guanidina y un derivado de ácido cólico, se formaron derivados altamente fluorescentes con máximos de excitación y emisión a 426 nm y 540 nm, respectivamente. Posteriormente se aislaron proteínas y péptidos como albúmina de suero bovino, α -lactoalbúmina, insulina, calcitonina, somatostatina y oxitocina vía HPLC, seguidas de digestión enzimática e identificación de las proteínas derivatizadas mediante ESI-MS/MS (Esquema 21).



Esquema 21

1.2.7. Detección de sacáridos

Se han publicado varias revisiones sobre sensores fluorescentes de sacáridos que contienen en su estructura boro.^{98, 99, 100} Generalmente los sensores para sacáridos se basan en la formación reversible de un éster cíclico entre el ácido borónico receptor unido a la molécula indicadora y la función diol de los sacáridos. La formación del éster afecta a la acidez de Lewis del átomo de boro, provocando cambios en la transferencia de carga interna, en la transferencia foto-inducida del electrón o en la transferencia de energía.

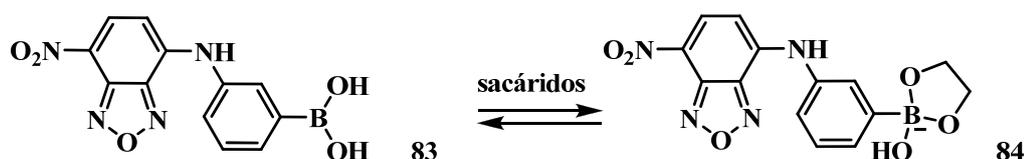
⁹⁷ H. Saimuru, M. Masuda, C. Toriumi, T. Santa, E. Ichikawa, N. Takamura, K. Imai, *J. Mater. Chem.*, **2005**, *15*, 2865-2872.

⁹⁸ H. Cao, M. D. Heagy, *J. Fluoresc.*, **2004**, *14*, 569-584.

⁹⁹ H. Fang, G. Kaur, B. Wang, *J. Fluoresc.*, **2004**, *14*, 481-488.

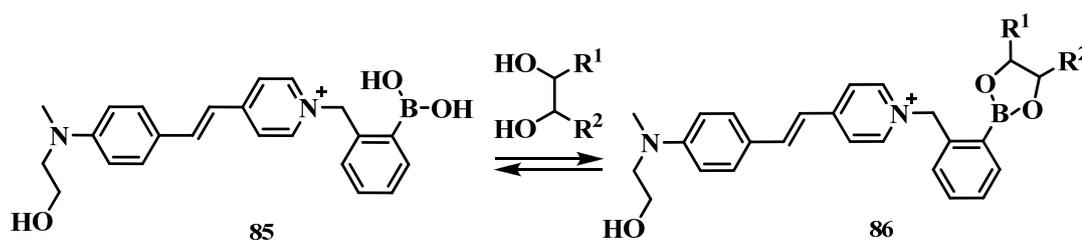
¹⁰⁰ S. Shinkai, M. Takeuchi, *Biosens Bioelectron*, **2004**, *20*, 1250-1259.

Badugu y colaboradores han desarrollado una sonda ratiométrica¹⁰¹ en que la presencia de sacáridos causa una interacción que favorece la transferencia de carga intramolecular. La sonda **83** muestra un máximo de absorbancia a 490 nm en tampón fosfato a pH = 7.0, que se desplaza a 500 nm en presencia de fructosa, con cambio de color de amarillo a naranja. La interacción del ácido borónico con los sacáridos genera una forma aniónica de corto periodo de vida que afecta a la capacidad electrón-donadora del grupo amino hacia el grupo nitro, con cambio de color. La sensibilidad para fructosa fue de 0.2 a 20 mM, mientras que para glucosa fue de 1 a 100 mM (Esquema 22).



Esquema 22

Trupp y colaboradores han desarrollado una hemicianina **85** que tiene su máximo de absorbancia a 460 nm y su máximo de emisión a 600 nm, y muestra aumentos importantes en su fluorescencia en presencia de sacáridos en disolución acuosa a pH fisiológico.⁸⁶ El aumento máximo de la señal de **85** fue de un 86% y se debió a su exposición a D-fructosa a pH = 7.13. La función N-hidroxietilo del fluoróforo aumenta su solubilidad en disolución acuosa y puede ser utilizada para unir el sensor a matrices poliméricas (Esquema 23). Se ha descrito un mecanismo similar de reconocimiento de sacáridos con derivados de 2-borobencilquinolinio.¹⁰²



Esquema 23

¹⁰¹ R. Badugu, J. R. Lakowicz, C. D. Geddes, *Dyes Pigments*, **2006**, 68, 159-163.

¹⁰² R. Badugu, J. R. Lakowicz, C. D. Geddes, *J. Fluoresc.*, **2003**, 13, 371-374.

Trupp y colaboradores sintetizaron un derivado estructural de naftalimida con reactividad similar hacia sacáridos, basándose en el mecanismo de transferencia de energía fotoinducida. El quimiosensor **87** muestra un aumento de fluorescencia de 130% a 530 nm (excitación a 410 nm) en presencia de *D*-fructosa a pH = 7.15 (Figura 39).

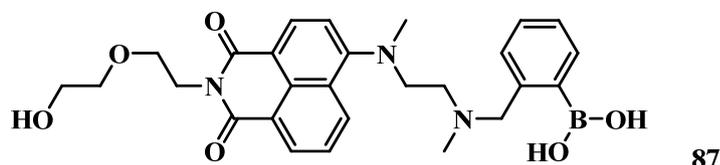


Figura 39

Por último, Zhao y colaboradores han desarrollado un quimiosensor enantioselectivo para azúcares con grupos carboxílicos, a través de la síntesis de ácidos borónicos quirales como **88**.¹⁰³ Estos quimiosensores, basados en antraceno, mostraron un gran aumento de luminiscencia a 429 nm (excitación a 365 nm) cuando se expusieron a azúcares quirales ácidos en una solución al 52% de metanol en buffer, especialmente, ácidos *D*- y *L*-tartárico, ácido *D*-glutárico y ácido *D*-glucónico. La enantioselectividad ($K_R:K_S$) fue de 490:1 para el ácido *D*-tartárico y de 1:550 para el ácido *L*-tartárico (Figura 40).

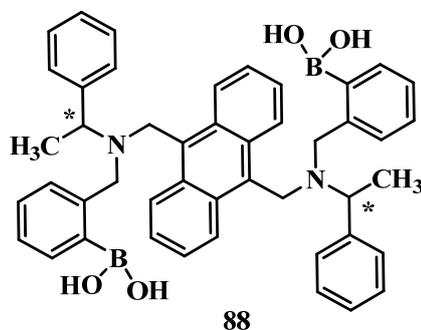


Figura 40

¹⁰³ J. Zhao, M. G. Davidson, M. F. Mahon, G. Kociok-Köhn, T. D. James, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 16179-16186.

Haciendo uso de la experiencia en el campo de las sondas moleculares¹⁰⁴ que tiene el grupo de trabajo, en esta Tesis Doctoral se pretende abordar el diseño de sensores fluorogénicos selectivos para biomoléculas de pequeño tamaño, especialmente aminoácidos e hidroxiaácidos de especial interés, y metabolitos neutros de interés biológico, debido a que el número de quimiosensores ópticos para analitos orgánicos es escaso.¹⁰⁵ También queremos preparar sensores cromogénicos o fluorogénicos de contaminantes medioambientales orgánicos para los que no hay actualmente métodos fiables de detección, como el metilmercurio, así como contaminantes inorgánicos comunes, como el ión cobre(II), cuya detección sistemática y fiable no ha sido aún resuelta, mediante la preparación de quimiosensores fluorogénicos diferenciales.¹⁰⁶ Recientemente, el grupo de trabajo ha puesto a punto una nueva familia de sondas fluorogénicas intrínsecas muy selectivas,¹⁰⁷ capaces de desarrollar grandes diferencias de fluorescencia en presencia de determinados analitos debido a un solvatocromismo elevado, que les convierte en sondas sensibles no sólo a un determinado grupo funcional cargado, dependiendo del receptor añadido, sino que son capaces de interactuar con los grupos funcionales secundarios, lo que les convierte en sondas diferenciales entre series análogas de biomoléculas. La mayor parte de los grupos de investigación que trabajan en sondas fluorogénicas utilizan colorantes fluorescentes tradicionales (rodamina, fluoresceína, acridina, escuarina, BODIPY, antraquinonas, cianinas, derivados de antraceno o perileno, etc),¹⁰⁸ muchos de ellos comerciales o ligeramente modificados, por lo que la mayor parte de los esfuerzos de esos grupos consisten en la generación de nuevos receptores para la detección de moléculas orgánicas cargadas, especialmente aniones en agua, que es el campo al que se orientan la mayor parte de los esfuerzos en la

¹⁰⁴ (a) S. Basurto, O. Riant, D. Moreno, J. Rojo, T. Torroba, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 4673-4688. (b) L. S. Evans, P. A. Gale, M. E. Light, R. Quesada, *Chem. Commun.* **2006**, 965-967. (c) P. A. Gale, R. Quesada, *Coord. Chem. Rev.* **2006**, *250*, 3219-3244. (d) P. Prados, R. Quesada, *Supramolec. Chem.* **2008**, *20*, 201-216.

¹⁰⁵ (a) T. W. Bell, N. M. Hext, *Chem. Soc. Rev.* **2004**, *33*, 589-598. (b) G. J. Mohr, *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 1082-1090.

¹⁰⁶ J. J. Lavigne, E. V. Anslyn, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 3118-3130.

¹⁰⁷ M^a Teresa Gómez Martínez, Tesis Doctoral, 25 de septiembre de 2008.

¹⁰⁸ M. Sameiro T. Gonçalves, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 190-212.

actualidad.¹⁰⁹ La ventaja que ofrecen las nuevas sondas fluorogénicas que se van a desarrollar a lo largo del proyecto de Tesis es que su modo de acción difiere de las sondas conocidas, permitiendo la detección selectiva de especies para las que no existe en la actualidad ningún modo de detección.

¹⁰⁹ (a) T. Gunnlaugsson, M. Glynn, G. M. Tocci, P. E. Kruger, F. M. Pfeffer, *Coord. Chem. Rev.* **2006**, 250, 3094–3117. (b) I. Stibor, *Top. Curr. Chem.* **2005**, 255, 1-229.

2. OBJETIVOS

Las razones para el planteamiento de la siguiente Tesis Doctoral están inspiradas en la importancia que ha adquirido el desarrollo de sensores químicos moleculares fluorogénicos y cromogénicos en los últimos años a nivel internacional. Éstos son sistemas que presentan un doble interés, uno científico básico (estudios de interacciones huésped-receptor-colorante en relación a la señalización de procesos de coordinación) y otro aplicado, sobre el desarrollo de sistemas de detección de especies químicas de interés mediante simples cambios de color y/o emisión fluorescente. En este área el grupo de investigación en que se realiza la Tesis Doctoral ha trabajado en la detección de cationes y en mucha menor medida en la detección de aniones y especies neutras, sin embargo en el último periodo el grupo de trabajo ha puesto a punto una nueva familia de sondas fluorogénicas intrínsecas muy selectivas, capaces de desarrollar grandes diferencias de fluorescencia en presencia de determinados analitos, por lo que en la presente Tesis Doctoral se pretende desarrollar la capacidad que tienen estas sondas para interactuar de forma no covalente con los analitos, con el fin de realizar la detección selectiva de miembros determinados entre series análogas de biomoléculas, así como la detección selectiva de especies para las que no existen en la actualidad quimiosensores específicos.

El objetivo general de la Tesis Doctoral es el desarrollo de sistemas sensores capaces de reconocer biomoléculas de pequeño tamaño: ω -aminoácidos, α,ω -bis-aminoácidos y ω -amino- α -hidroxiácidos metabólicos, contaminantes medioambientales orgánicos o inorgánicos de alto riesgo: catión metilmercurio y catión cobre(II), y la discriminación selectiva de miembros de series homólogas o de familias de metabolitos relacionados, por ejemplo, diferenciación entre creatinina y creatina, detección diferencial de suplementos deportivos como carnitina o arginina, detección de inhibidores GABA como pregabalina o gabapentina, o detección y diferenciación de aminas biogénicas.

Objetivo específico 1: Desarrollo de una sonda cromogénica orientada a la detección y especiación de mercurio(II) y catión metilmercurio(II).

La contaminación medioambiental por derivados de mercurio(II) tiene gran importancia a causa de la enorme cantidad de mercurio que se emite al medio ambiente por la acción humana. De las especies de mercurio metal que pueden encontrarse en el medio ambiente, la que tiene más importancia es el catión metilmercurio, que se produce en el medio ambiente por bacterias a partir de mercurio(II) en agua. El catión metilmercurio es lipofílico, con lo que tiende a acumularse en organismos vivos, como por ejemplo peces, por lo que puede entrar en la cadena alimentaria creando un gran riesgo por su toxicidad neurológica, especialmente en mujeres embarazadas, por el riesgo que supone para el normal desarrollo del feto.¹

En esta parte de la Tesis Doctoral se llevará a cabo el desarrollo de sondas cromogénicas para mercurio(II) y catión metilmercurio(II) y para la especiación de catión metilmercurio y mercurio(II), basados en el cambio de color combinado con la metilación/desmetilación de la sonda.

Se prevé utilizar los productos en protocolos de detección de catión metilmercurio(II) y de especiación de catión mercurio(II) y catión metilmercurio(II) en disolución acuosa, procedentes de muestras de origen sintético o biológico.

¹ F. Zahir, S. J. Rizwi, S. K. Haq, R. H. Khan, *Environ. Toxicol. Pharm.* **2005**, *20*, 351–360.

El propósito de esta parte del trabajo será el estudio de la capacidad de detección de los compuestos en distintos disolventes híbridos orgánico-acuosos, con especial atención a determinar las estructuras de los intermedios formados y los valores de las constantes aparentes de asociación de los mismos en solución orgánica y en presencia de agua.

Objetivo específico 2: Desarrollo de nuevos materiales sensores orientados a la detección fluorogénica de cobre(II).

El grupo de trabajo ha estudiado previamente la síntesis y propiedades químico-físicas de derivados de indeno que presentan comportamiento como sensores químicos. Además de buscar una buena selectividad frente aniones y cationes en disolventes orgánicos apróticos, como MeCN, DMSO, ... y en disolventes próticos, como el metanol o etanol, también se busca una buena selectividad y sensibilidad en medios acuosos o parcialmente acuosos.

La escasa selectividad y sensibilidad de estos compuestos ha llevado al estudio de derivados de indeno que lleven un grupo fluorogénico, mediante la introducción de un sustituyente quinolina en la posición 5 de la indanona, a través de una reacción de acoplamiento de Suzuki entre el halógeno y el ácido borónico correspondiente. Para complementar su actividad como quimiosensor se quiere introducir en la posición 3 un grupo capaz de formar quelatos, buscando así una mejor selectividad frente a cationes y/o aniones en medios acuosos o parcialmente acuosos, y dar lugar a nuevos quimiosensores fluorogénicos.

Como objetivo se planteó obtener un compuesto que presente un comportamiento, adecuado a lo pretendido como sensor químico óptico, debido a la alta conjugación de los compuestos de este tipo.

El propósito de esta parte del trabajo será el estudio de los cambios espectroscópicos de dicho compuesto, tanto en sus espectros de absorción en UV-Vis,

emisión fluorescente, como en resonancia magnética nuclear, que pudieran ser de utilidad como detectores de cationes y aniones, orientado a la detección de cobre(II).

Objetivo específico 3.- Desarrollo de nuevos protocolos de reconocimiento fluorogénico para la detección selectiva de algunos aminoácidos y sus metabolitos de interés biosanitario.

Esta sección está dirigida al diseño, preparación y estudio de ligandos capaces de actuar como sondas fluorogénicas en disolución para la complejación y detección de aminoácidos y sus metabolitos de interés biológico.

De entre las distintas aproximaciones que se pueden emplear para el diseño de quimiosensores haremos uso de la aproximación de sondas intrínsecas de la que se ha hecho mención en la introducción. Para llevar a cabo un diseño racional de los ligandos es preciso establecer con claridad cuales son las unidades señalizadoras y las unidades complejantes de mayor interés para conseguir una complejación fuerte y selectiva y una transducción eficaz y fácil de detectar. Así, se llevará a cabo la preparación de ligandos adecuados para la complejación y detección de carboxilatos y grupos amonio, especialmente orientado a la detección de aminoácidos.

Terminada la preparación de los ligandos deseados se llevarán a cabo estudios de reconocimiento con diversos aminoácidos tanto comunes (alfa-aminoácidos) como menos comunes (beta-aminoácidos), así como frente a sus metabolitos de interés (omega-aminoácidos, bis-aminoácidos, aminas biogénicas, dipéptidos), especialmente aquellos que sirven como marcadores de procesos fisiológicos anómalos o constituyen aditivos alimentarios o farmacéuticos. En todos los casos se estudiará la influencia de la longitud de la cadena y el efecto que puedan originar otros grupos funcionales presentes, especialmente un segundo grupo amino presente en los bis-aminoácidos y en los dipéptidos como carnosina.

En resumen, el trabajo puede dividirse de la siguiente manera:

1. Síntesis y caracterización de los ligandos objeto de estudio y de los correspondientes sistemas de control monofuncionalizados.
2. Estudio de la capacidad complejante de los ligandos en distintos disolventes con especial atención a determinar las estequiometrías de los complejos formados, los valores de las constantes de complejación y la geometría de los complejos de los mismos en solución orgánica y cuando sea posible en presencia de agua.
3. Estudio de la capacidad de detección de los ligandos en presencia de aminoácidos comunes y menos comunes, así como sus metabolitos de interés, aminas biogénicas, dipéptidos, etc. Se llevarán a cabo estudios tanto de UV como de fluorescencia y se valorará la influencia del agua o de otros disolventes próticos en la capacidad sensora.

3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

**PARTE I. DESARROLLO DE
UNA SONDA CROMOGÉNICA
DE MERCURIO(II).**

Uno de los metales pesados que mayor preocupación genera en los problemas medioambientales es el mercurio. Pese al control existente en la actualidad y las legislaciones en busca de una utilización cero del mismo, la interferencia del hombre en el ciclo natural del mercurio es muy importante.¹ La facilidad de acumularse en lechos marinos y sufrir procesos de transformación en compuestos que pueden pasar a las cadenas tróficas, con consecuencias letales, hace que la identificación del catión mercurio(II) sea un tema de investigación importante. Además, hay que destacar que, dentro de las cadenas tróficas, el mercurio sufre procesos de bioconcentración, principalmente en los animales marinos y en los cereales, lo que hay que tener muy en cuenta como fuente de contaminación accidental.

La fuente natural de contaminación más importante es debida a la sublimación del propio mercurio metal por lo que se crea un ciclo atmosférico² como vía de entrada a las cadenas tróficas. Las fuentes antropogénicas son varias; la utilización del mercurio como fungicida, herbicida y conservante de semillas en agricultura; las papeleras, la industria

¹ a) W. F. Fitzgerald, C. H. Lamborg, C. R. Hammerschmidt, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 641-662. b) I. Onyido, A. R. Norris, E. Buncel, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 5911-5929.

² K. S. Johnson, J. A. Needoba, S. C. Riser, W. J. Showers. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 623-640

electroquímica, su uso en pinturas y pilas, la industria de los catalizadores, la combustión de carbones y los vertidos industriales, que son las más importantes;³ en cualquier caso, todas estas fuentes terminan aportando mercurio al ciclo atmosférico o directamente al agua y al suelo.

En la atmósfera, la especie predominante es la de Hg^{2+} , formada a partir de otras especies de mercurio, como el dimetilmercurio, el HgO o el propio Hg metal, en diferentes procesos químicos. El mercurio es biotransformado, en especial en el agua de los océanos, por microorganismos e incorporado a las cadenas tróficas como sales de metilmercurio; la especie predominante es la de Hg^{2+} , muy soluble y que puede ser bioacumulado directamente por los peces, o seguir un proceso de biotransformación, realizado por microorganismos acuáticos, dando lugar a dos especies orgánicas, el dimetilmercurio volátil, que se recicla a la atmósfera y el metilmercurio(I), que se bioacumula en los peces, y por tanto es incorporado a las cadenas tróficas siendo esta la principal vía de exposición humana a los derivados de mercurio.

Se hace necesario, por lo tanto, poner a punto métodos de detección que permitan monitorizar la presencia de todos estos contaminantes en las propias regiones donde es más abundante, en los alimentos⁴ y muy especialmente en peces⁵.

Las sondas químicas están basadas principalmente en la detección rápida de Hg^{2+} , normalmente a través de la formación de complejos que ofrecen respuestas colorimétricas o fluorimétricas. Para el diseño de sondas que detecten Hg^{2+} hay que tener en cuenta que el quimiosensor debe ser altamente selectivo frente a otros iones presentes en la muestra. La química de coordinación del Hg^{2+} debe considerarse para el diseño de esos sensores. Debido a su configuración electrónica $5d^{10}6s^2$ y a la baja energía de

³ A. P. Wenddroff, *Nature*, **1990**, 347, 623

⁴ (a) S. G. Capar, W. R. Mindak, J. Cheng, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2007, **389**, 159; (b) P. Kubá, P. Houserová, P. Kubá, P. C. Hauser and V. Kubá, *Electrophoresis*, 2007, **28**, 58; (c) B. R. Vermillion, R. J. M. Hudson, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2007, **388**, 341.

⁵ (a) S. Yoon, E. W. Miller, Q. He, P. H. Do, C. J. Chang, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2007, **46**, 6658; (b) S.-K. Ko, Y.-K. Yang, J. Tae, I. Shin, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 14150.

estabilización de campo, el mercurio puede acomodarse a un rango diverso de número de coordinación y geometría, siendo las geometrías lineal y tetraédrica las más comunes. La afinidad y selectividad en un quimiosensor para mercurio puede variarse modificando las unidades de unión con el mercurio. El mercurio es un ácido blando y el uso de átomos dadores blandos como azufres aumentará la selectividad y afinidad del sensor químico; otro átomo dador adecuado para la coordinación del mercurio(II) es el nitrógeno. Así, es habitual el uso de heteroéteres corona en los que se introducen átomos de nitrógeno y azufre en su estructura buscando una mayor selectividad; como en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**, que permite la detección fluorimétrica de Hg^{2+} en peces.⁶ Este sensor combina las buenas propiedades ópticas y de solubilidad en agua de la unidad de señalización y la alta selectividad de la unidad receptora hacia el Hg^{2+} gracias a la presencia de los átomos de azufre en su estructura.

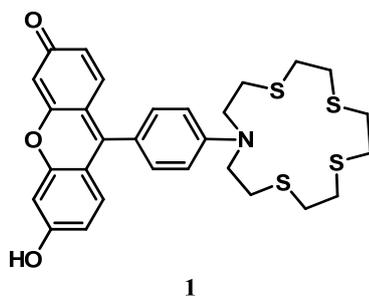


Figura 1: Un quimiosensor fluorogénico de mercurio(II)

También funcionan para el mismo propósito estructuras abiertas como los poliéteres de la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**, que presentan una alta selectividad para la detección fluorimétrica⁷ de Hg^{2+} .

⁶ S. Yoon, A. E. Albers, A. P. Wong, C. J. Chang. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 16030-16031.

⁷ J. Wanga, X. Qian, *Chem. Commun.* **2006**, 109–111.

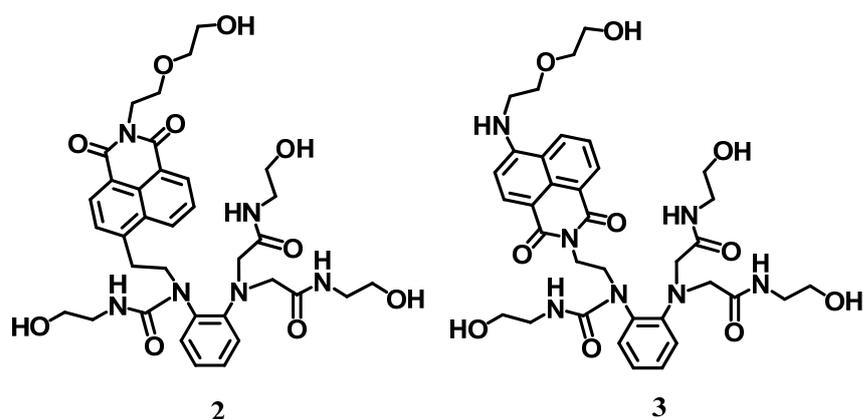


Figura 2

En este caso se combina el efecto de los tres grupos amida con el de los nitrógenos de la *o*-fenilendiamina, lo que hace que la interacción con el Hg^{2+} sea especialmente efectiva. Por otro lado, los cuatro grupos hidroxilo de los extremos favorecen la solubilidad en agua. La naftalimida actúa como unidad de señalización contribuyendo a la fluorescencia una vez coordinada con el Hg^{2+} .

Otro ejemplo distinto de receptores es el desarrollado en el trabajo de M. K. Nazeeruddin y colaboradores.⁸ En este caso el compuesto **4** actúa como quimiosensor, es un complejo de Ru(II) (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**) depositado sobre films de nanocristales de TiO_2 , esto permite crear un sistema de detección insoluble en agua pero que permite la detección de Hg^{2+} en la disolución por cambio de color del film.

⁸ M. K. Nazeeruddin, D. Di Censo, R. Humphry-Baker, M. Grätzel, *Adv. Funct. Mater.* **2006**, *16*, 189–194.

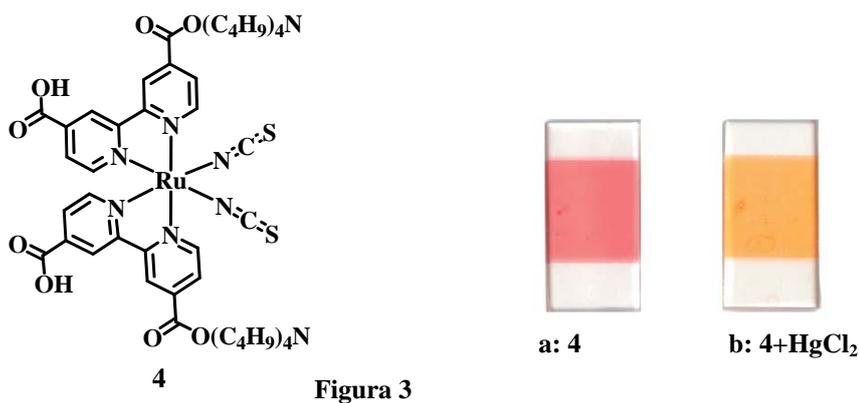


Figura 3

La coordinación con el Hg^{2+} se produce sobre las bases blandas del complejo, es decir, sobre los átomos de azufre y no sobre los grupos carboxilo. El proceso de detección es reversible, recuperándose el color original del film al añadir sobre el mismo una disolución de KI.

Uno de los objetivos principales en el diseño de cualquier quimiosensor de Hg^{2+} , aparte de la selectividad, es la búsqueda de un límite de detección óptimo para el analito en estudio. Para ello se han desarrollado distintos métodos. Uno de los que presenta resultados más espectaculares es el descrito por Chad A. Mirkin y colaboradores.⁹ En este caso los quimiosensores están basados en nanopartículas de oro funcionalizadas con moléculas de ADN (DNA-AuNPs) (Figura 4).

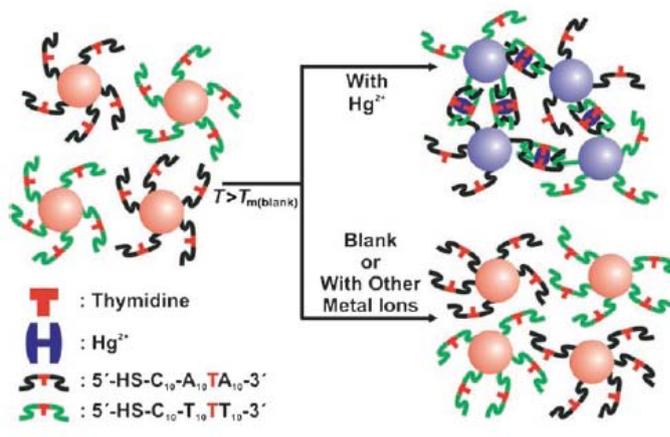


Figura 4

⁹ J.-S. Lee, M. S. Han, C. A. Mirkin. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 4093–4096.

Estas estructuras muestran límites de detección de Hg^{2+} en agua de aproximadamente 20 ppb. La alta selectividad de las timidinas presentes por el Hg^{2+} y los elevados coeficientes de extinción molar ($10^8 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$) de las AuNPs son los principales causantes de sus excelentes propiedades.

Otro ejemplo está constituido por la estructura sintetizada por Li y col¹⁰ basada en dos macrociclos ditio-dioxa-aza como sustituyentes en una estructura de BODIPY (Figura 5).

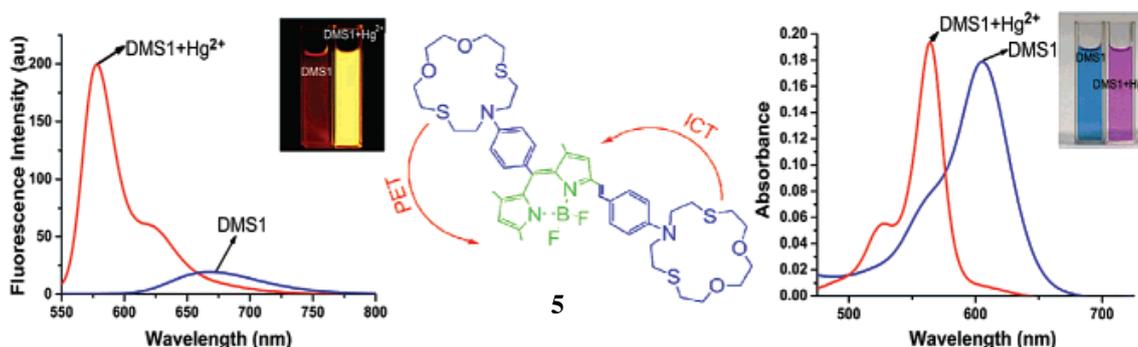


Figura 5

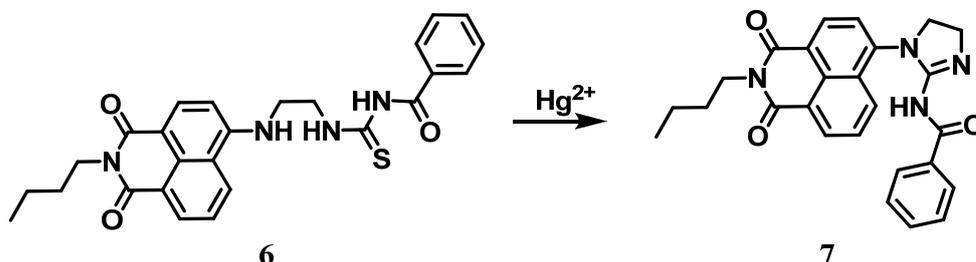
Esta estructura permite, por un lado, la formación de una banda de transferencia de carga ICT y por otro la fluorescencia a través de un proceso de transferencia de electrones fotoinducida PET.

También son abundantes los casos en los que es con la aproximación del dosímetro químico con la que se puede identificar la presencia de Hg^{2+} tanto por cambios en la fluorescencia como en el color de las especies que intervienen. B. Liu y col. han publicado recientemente un dosímetro químico fluorescente para la detección de Hg^{2+} en medios acuosos¹¹ que consta de un grupo 1,8-naftalimida unido covalentemente a una tiourea a través de un grupo etilamina. En presencia de Hg^{2+} , la unidad de tiourea reacciona para dar una imidazolina, que es un grupo con menor carácter electrón-dador que la tiourea, lo que provoca una disminución de la deslocalización electrónica, y por

¹⁰ M. Yuan, Y. Li, J. Li, C. Li, X. Liu, J. Lv, J. Xu, H. Liu, S. Wang, D. Zhu, *Org. Lett.*, 2007, **9**, 2313-2316.

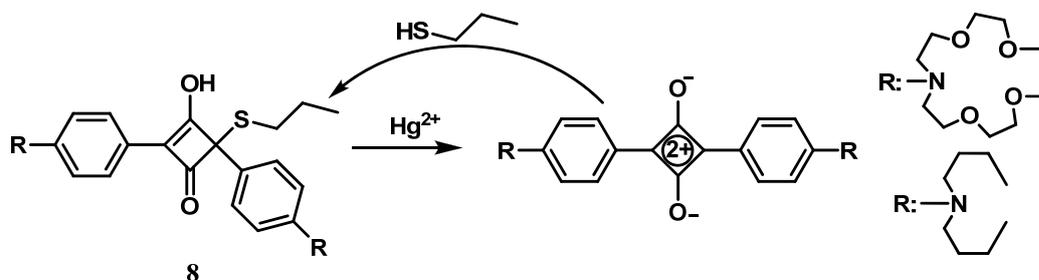
¹¹ B. Liu, H. Tian. *Chem. Commun.* **2005**, 3156-3158.

tanto, un desplazamiento hipsocrómico de las bandas de absorción y emisión fluorescente (Esquema 1).



Esquema 1: Dosímetro químico fluorescente basado en la 1,8-naftalimida para la detección de mercurio (II) en agua.

Un grupo frecuente en el diseño de dosímetros químicos de Hg^{2+} es el grupo escuaridina.¹² Combinando las propiedades de este grupo con la afinidad del Hg^{2+} por los grupos tiol, Ros-Lis et al. han desarrollado un dosímetro para la detección de Hg^{2+} en medios acuosos, con límites de detección menores de 2 ppb.¹³ Así, mediante una reacción de adición se introduce un grupo propiltiol, que “apaga” el color y la fluorescencia de la escuaridina inicial. La presencia de Hg^{2+} provoca la eliminación del grupo tiol y la obtención de la escuaridina inicial, lo que se traduce en la reaparición de color y fluorescencia. El dosímetro puede además regenerarse mediante adición de propiltiol, de manera que puede reutilizarse de nuevo (Esquema 2).

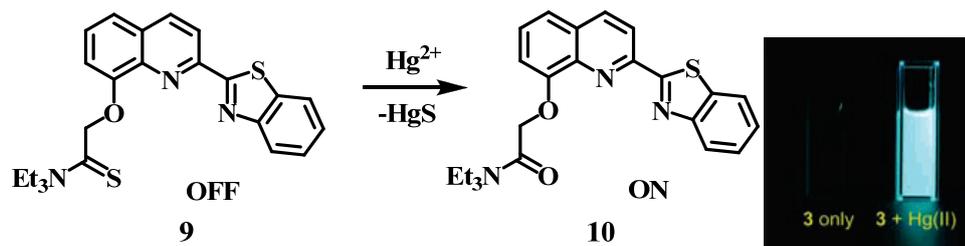


¹² A. Ajayaghosh. *Acc. Chem. Res.* **2005**, *38*, 449-459.

¹³ J. V. Ros-Lis, M. D. Marcos, R. Martínez-Mañez, K. Rurack, J. Soto. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 4405-4407.

Esquema 2: Dosímetro químico fluorescente basado en la escuaridina para la detección de mercurio (II) en agua.

Otro ejemplo de dosímetro fluorescente específico de Hg^{2+} en medios acuosos es el diseñado por Suk-Kyu Chang¹⁴ y col. está basado en una tioamida derivada de la 8-hidroxiquinolina-benzotiazol (Esquema) la cual presenta una elevada selectividad frente al Hg^{2+} originándose la formación de la correspondiente amida altamente fluorescente:

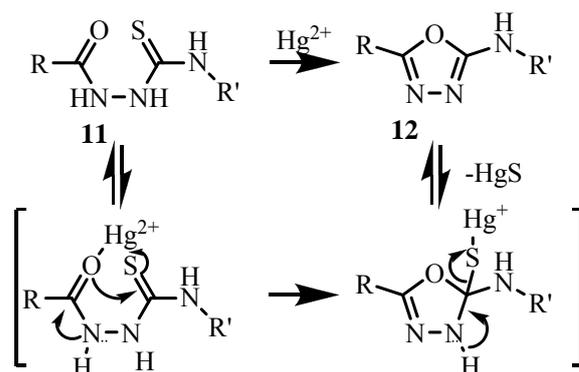


Esquema 3: Dosímetro químico fluorescente basado en una tioamida derivada de la 8-hidroxiquinolina-benzotiazol para la detección de mercurio (II) en agua.

Algunos de los métodos de detección más interesantes son aquellos que permiten realizar ensayos en vivo, S.-K. Ko y col. han desarrollado un dosímetro que permite la detección de Hg^{2+} en células de organismos vertebrados¹⁵ gracias a la permeabilidad del sensor, que responde estequiométricamente al Hg^{2+} en medio acuoso y a temperatura ambiente. El quimiosensor se basa en la capacidad del Hg^{2+} para promover la ciclación de una tiosemicarbazida para formar el 1,3,4-oxadiazol (Esquema):

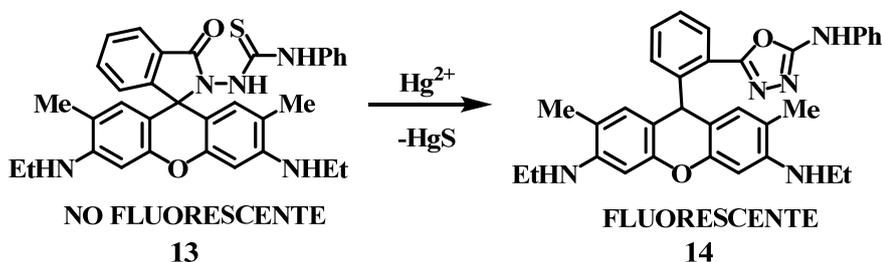
¹⁴ K. C. Song, J. S. Kim, S. M. Park, K.-C. Chung, S. Ahn, S.-K. Chang. *Org. Lett.* **2006**, 8, 3413-3416.

¹⁵ S.-K. Ko, Y.-K. Yang, J. Tae, I. Shin. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 14150-14155.



Esquema 4

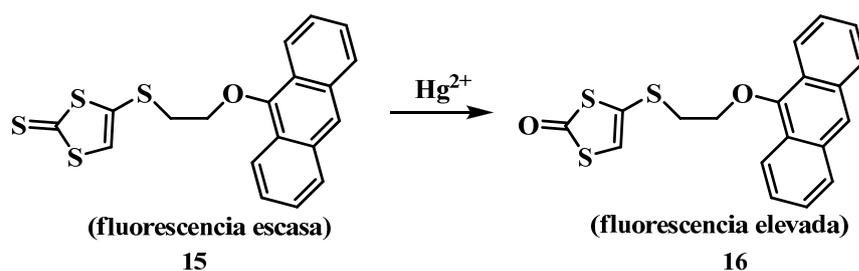
Tomando como base la Rhodamina e introduciendo el grupo semicarbazida se forma una estructura (13) capaz de pasar a ser fluorescente en presencia de Hg^{2+} :



Esquema 5: Dosímetro químico para la detección de Hg^{2+} en células de organismos vertebrados.

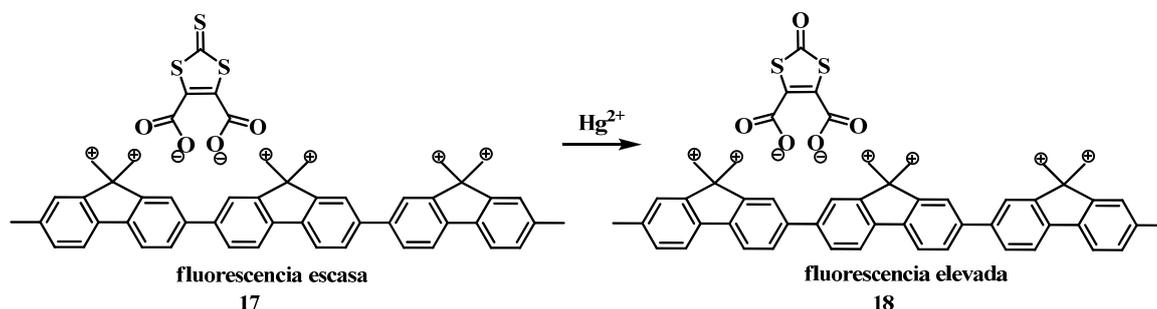
Algunos compuestos heterocíclicos, como las 1,3-ditiol-2-tionas que, en este caso, llevan una unidad de antraceno, han sido utilizados como dosímetros selectivos de ión $\text{Hg}(\text{II})$. En el ejemplo siguiente, el compuesto inicial es escasamente fluorescente, mientras que el producido mediante reacción de desulfuración con $\text{Hg}(\text{II})$ es fuertemente fluorescente, lo que hace que éste, y otros compuestos parecidos, sean buenos dosímetros de ión $\text{Hg}(\text{II})$ (Esquema 6).¹⁶

¹⁶ G. Zhang, D. Zhang, S. Yin, X. Yang, Z. Shuaia, D. Zhu, *Chem. Commun.*, **2005**, 2161-2163.



Esquema 6: Dosímetro químico de mercurio(II) basado en la unidad de 1,3-ditioil-2-tiona.

Un método selectivo para detectar iones Hg^{2+} utiliza un polímero catiónico conjugado. El mecanismo de transducción se basa en una desulfuración promovida por Hg^{2+} . En ausencia de iones de Hg^{2+} , el polímero forma un complejo con una 1,3-ditioil-2-tiona aniónica mediante interacción electrostática, que apaga la fluorescencia del polímero a través de transferencia de electrones entre la 1,3-ditioil-2-tiona y el polímero. Al añadir Hg^{2+} , la reacción de la 1,3-ditioil-2-tiona con el Hg^{2+} hace que se transforme en 1,3-ditioil-2-ona, inhibiendo el apagado y recuperando la fluorescencia original del polímero. De esta forma es posible detectar iones Hg^{2+} en disolución acuosa (Esquema 7).¹⁷



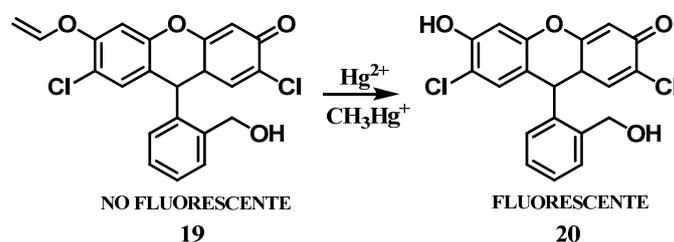
Esquema 7: Polímero catiónico conjugado utilizado en la detección de Hg(II).

Aunque no existen quimiosensores específicos de catión metilmercurio(II), MeHg^+ , algunos de los quimiosensores de mercurio(II) han sido también estudiados como sistemas sensores de MeHg^+ , en general con baja selectividad.¹⁸ Como ejemplo, el grupo de K. H. Ahn ha desarrollado una sonda fluorogénica basada en la reacción de

¹⁷ H. Lu, Y. Tang, W. Xu, D. Zhang, S. Wang, D. Zhu, *Macromol. Rapid Commun.* **2008**, 29, 1467-1471.

¹⁸ Y.-K. Yang, S.-K. Ko, I. Shin, J. Tae, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, 7, 4590-4593.

oximercuración, seguida de hidrólisis, de un viniléter que da lugar a un hidroxiderivado fluorescente (Esquema 8).¹⁹



Esquema 8: Oximercuración e hidrólisis de un viniléter utilizado en la detección de Hg^{2+} y MeHg^+ .

El grupo de I. S. Lee y J. H. Jung ha desarrollado nanopartículas magnéticas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2$ funcionalizadas con un nuevo derivado aminonaftalimido fluorogénico, que tiene gran afinidad y selectividad por los iones Hg^{2+} and CH_3Hg^+ sobre otros iones metálicos, que sirve no sólo para la detección fluorogénica, sino también para la separación magnética de estos iones.²⁰

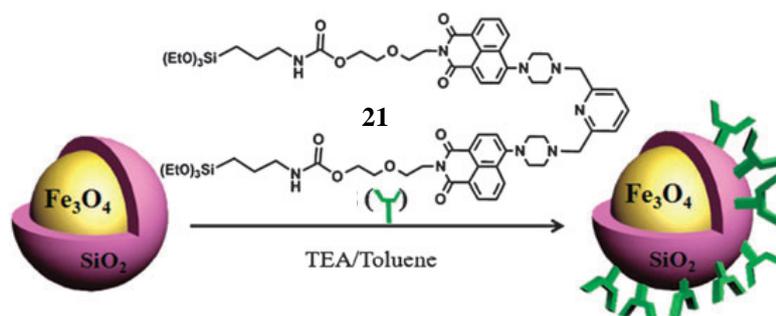


Figura 6

También se ha desarrollado un método, por el grupo de R. Martínez-Máñez y K. Rurack, en que la determinación de metilmercurio se realiza mediante materiales

¹⁹ M. Santra, D. Ryu, A. Chatterjee, S.-K. Ko, I. Shin, K. H. Ahn, *Chem. Commun.* **2009**, 2115–2117.

²⁰ M. Park, S. Seo, I. S. Lee, J. H. Jung, *Chem. Commun.* **2010**, 25, 4478–4480.

inorgánicos mesoporosos funcionalizados que son capaces de amplificación de señales.²¹

En otros casos, los procesos estudiados han resultado ser menos selectivos.²²

²¹ E. Climent, M. D. Marcos, R. Martínez-Mañez, F. Sancenón, J. Soto, K. Rurack, P. Amorós, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 8519–8522.

²² X. Chen, K.-H. Baek, Y. Kim, S.-J. Kim, I. Shin, J. Yoon, *Tetrahedron* **2010**, *66*, 4016-4021.

RESULTADOS EXPERIMENTALES:

En primer lugar se realizó un screening de 21 complejos organometálicos y 3 ligandos desprovistos de metal, todos ellos muy coloreados en disolución, que presentan variaciones en su banda de transferencia de carga según las características del medio en que se encuentran. Se ha evaluado su idoneidad como posibles sensores colorimétricos de cationes de especial incidencia en contaminación medioambiental, como es el Hg^{2+} . Los compuestos han sido sintetizados por el grupo del Profesor Gabriel García Herbosa, del área de Química Inorgánica. Dichos compuestos pueden soportar interacciones ácido-base, bien por la existencia de protones ácidos en el ligando unido al Paladio(II) (serie ABI), o por la posibilidad de producirse procesos de apertura-cierre que modifiquen las características en las bandas de transferencia de carga de los compuestos originales (serie RJV, OCG).

Serie ABI

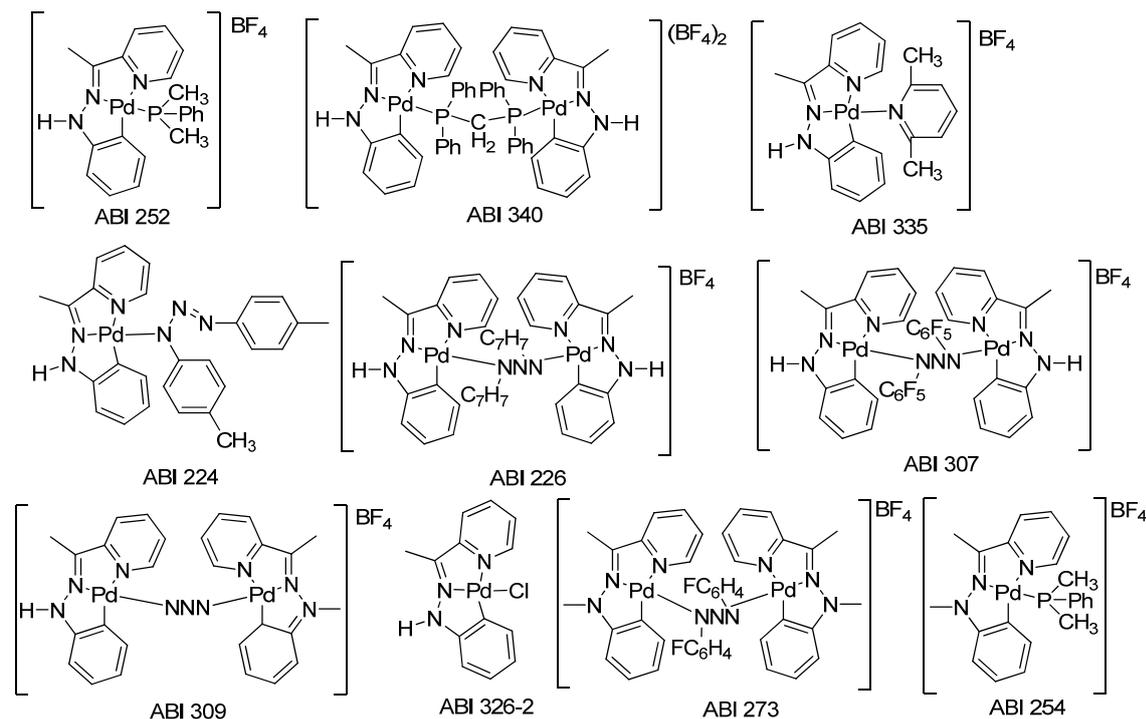


Figura 7

Aquellos complejos que poseen átomos de hidrógeno unidos a los átomos de nitrógeno del ligando presentan una alta sensibilidad al pH del medio debido a la acidez de estos protones, en consecuencia, no los hace interesantes para su estudio como sensores de aniones (sus equivalentes con grupos metilo en estas posiciones no varían al tratarlos con la serie de aniones) ya que no responden al tipo de anión añadido; por otro lado, respecto a cationes, aunque en el algún caso sí se producen cambios de color selectivos, la estabilidad de los complejos formados no se mantiene en medio acuoso. En ninguno de los productos de la serie parece importante el hecho de que tenga uno o dos átomos de metal en su estructura.

Serie RJV

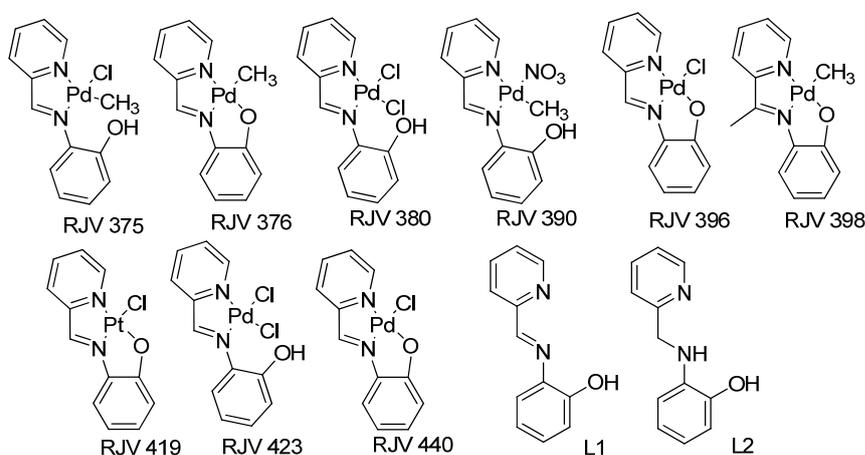


Figura 8

A la vista de los resultados de las pruebas iniciales, se aprecia un comportamiento muy poco selectivo frente a cationes de los compuestos ensayados, tanto abiertos como cerrados, lo que hace pensar que responden a la acidez de los cationes añadidos; asimismo, las especies coloreadas que se forman tanto de los unos como de los otros presentan una baja estabilidad al permanecer expuestos al aire. En el caso de los aniones la mayoría de los complejos pierden el color de la disolución al añadir CN⁻, lo que se debe a la formación de los tetracianoderivados del catión metálico correspondiente, con descomposición de los complejos iniciales.

Serie OGC:

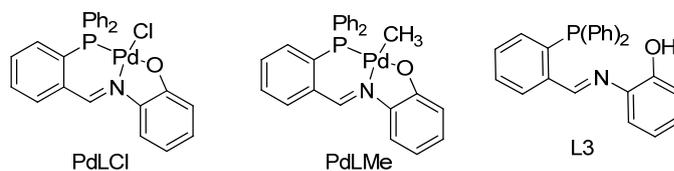
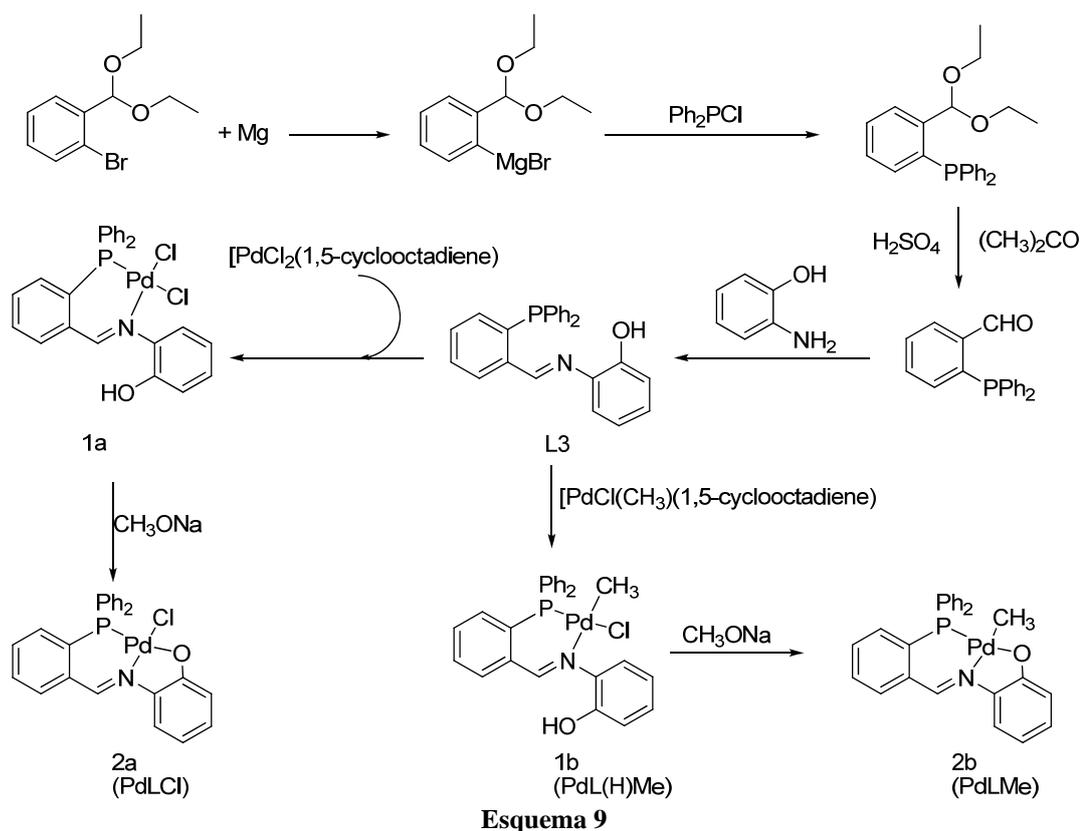


Figura 9

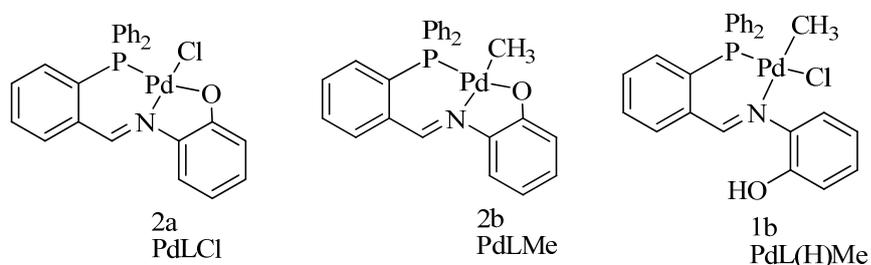
De los complejos mostrados en la Figura 3, el complejo PdLMe, presenta una notable selectividad respecto al Hg^{2+} , por lo que se ha estudiado en detalle. El compuesto PdLMe ha sido obtenido según el esquema de reacción²³ presentado a continuación (Esquema 9), que ha seguido las condiciones clásicas de síntesis de este tipo de complejos.²⁴ Tras la formación del magnesiano se realiza la sustitución sobre cloruro de difenilfosfina. Después se procede a la desprotección del aldehído en medio ácido y la formación del ligando (L3) con la hidroxianilina; por reacción de ésta con el complejo $[\text{PdCl}_2(1,5\text{-ciclooctadieno})]$ y posterior tratamiento con base se obtiene el derivado (PdLCl) **2a**; análogamente, si se trata con el organopaladio $[\text{PdCl}(\text{CH}_3)(1,5\text{-ciclooctadieno})]$ y tras el mismo tratamiento básico se obtiene el derivado (PdLMe) **2b**.

²³ Síntesis y caracterización: Olga del Campo González, Tesis Doctoral, Grupo Amido, *Área de Química Orgánica. Universidad de Burgos*.

²⁴ (a) M. J. Green, K. J. Cavell, P. G. Edwards, R. P. Tooze, B. W. Skelton and A. H. White, *Dalton Trans.*, **2004**, 3251; (b) K. R. Reddy, W.-W. Tsai, K. Surekha, G.-H. Lee, S.-M. Peng, J.-T. Chen and S.-T. Liu, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **2002**, 1776; (c) H.-B. Song, Z.-Z. Zhang and T. C. W. Mak, *Polyhedron*, **2002**, 21, 1043.



De los productos obtenidos a partir de la secuencia de reacción anterior se estudian las propiedades como sensor químico de los siguientes compuestos:



Para confirmar que los efectos como sensor de la molécula son debidos a toda su estructura y no únicamente al ligando se realizan las mismas pruebas con cationes sobre el ligando L3 a modo de pruebas en blanco. Se comienza con un estudio cualitativo en

distintos disolventes y a continuación se realizará el pertinente estudio cuantitativo mediante espectroscopia UV-Vis y Resonancia Magnética Nuclear- ^1H .

ESTUDIO CUALITATIVO DE LA SENSIBILIDAD FRENTE A CATIONES DEL COMPUESTO 2b (PdLMe).

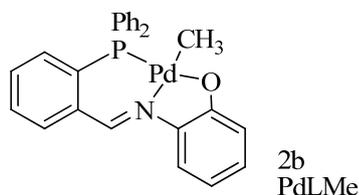


Figura 11

En primer lugar se preparó una disolución 10^{-4} M en MeCN del compuesto. La disolución presenta un color amarillo oscuro (anaranjado). En cada vial se añadió 1 equivalente de cada catión ($40\ \mu\text{l}$ disolución 5×10^{-3} M catión), excepto en el primero que quedó como referencia del color original (Figura 12). Tras la adición se pudieron diferenciar claramente 3 procesos, en primer lugar un grupo de cationes, como son: Ag^+ Ni^{2+} Cd^{2+} Zn^{2+} , sobre los que no se produjo ningún cambio respecto a la disolución original; hay otro grupo que originó una pérdida del color original: Sn^{2+} Pb^{2+} Cu^{2+} Fe^{3+} Sc^{3+} Al^{3+} ; por último el tercer efecto, el más evidente, el viraje de color total que se produjo al añadir Hg^{2+} . Tras aumentar la concentración de catión, los efectos observados no varían respecto de los iniciales.



2b(MeCN): Ag^+ Ni^{2+} Sn^{2+} Cd^{2+} Zn^{2+} Pb^{2+} Cu^{2+} Fe^{3+} Sc^{3+} Al^{3+} Hg^{2+}

Figura 12

A continuación se estudió el comportamiento de las especies formadas en presencia de agua. Añadiendo 1 equivalente se pudo ver cómo las disoluciones que habían

perdido el color comenzaban a recuperarlo, y tanto la disolución original como las que no habían cambiado comenzaban a tomar un color más amarillento, por otro lado el color rosáceo que se obtuvo al añadir Hg^{2+} permaneció estable. Con 2 equivalentes se confirmó el viraje de color hacia un amarillo claro (comenzaba a apreciarse el efecto de la dilución) excepto el Cu^{2+} , y Hg^{2+} que no presentan esa reversibilidad. Tras añadir el 4º equivalente se produjo el cambio de color total respecto a la disolución original, además se comprobó cómo el Cu^{2+} en presencia de agua permanece incoloro y la especie formada con el Hg^{2+} no modifica el color morado adquirido tras la adición del 1º equivalente de catión. Tras estudiar el comportamiento del producto PdLMe (**2b**), se compararon los resultados obtenidos con los del derivado clorado (PdLCl) de estructura análoga.

ESTUDIO CUALITATIVO DE LA SENSIBILIDAD FRENTE A CATIONES DEL COMPUESTO 2a (PdLCl).



Figura 13

En este caso la disolución de partida presentó un color rosáceo en MeCN.



2a(MeCN) · Ag⁺ Ni²⁺ Sn²⁺ Cd²⁺ Zn²⁺ Pb²⁺ Cu²⁺ Fe³⁺ Sc³⁺ Al³⁺ Hg²⁺

Figura 14

Con el 1^{er} equivalente se perdió el color, parcialmente, en la muestra que contiene Sn^{2+} y totalmente en la que se añadió Cu^{2+} o Al^{3+} . El Hg^{2+} no sufre cambio perceptible. El cambio se acentúa tras añadir el 2^o equivalente de Cu^{2+} y se mantiene con Sn^{2+} o Al^{3+} , también se apreció una ligera pérdida de color con Fe^{3+} y Sc^{3+} . Con 4 equivalentes no se apreció cambio alguno con Hg^{2+} , el resto de disoluciones tampoco lo hicieron o si variaron fue de forma muy poco evidente, tan solo el Cu^{2+} presentó una pérdida de color significativa, igual que ocurría con el compuesto anterior. A continuación se estudió el comportamiento de las especies formadas en presencia de agua. Tras añadir 2 equivalentes de agua desionizada se comprobó cómo se produjo un cambio de color hacia el naranja excepto el Sn^{2+} que pasó a amarillo y sobre todo el Cu^{2+} , que no recuperó el color. Al añadir un exceso de equivalentes (4 equivalentes) de agua se apreció un cambio total de color respecto a la disolución original, además se comprobó como el Cu^{2+} en presencia de agua no recupera el color. A la vista de los resultados parecían evidentes las diferencias de comportamiento (excepto respecto al Cu^{2+}) que presentaban los dos compuestos respecto a los cationes estudiados, lo que más interesó en este caso fue la selectividad respecto al Hg^{2+} que presentó el derivado PdLMe (**2b**) y que no existía en el derivado clorado **2a**.

ESTUDIO CUALITATIVO DE LA SENSIBILIDAD FRENTE A CATIONES DEL LIGANDO L3.

Llegados a este punto del estudio sobre los dos productos, se procedió a comprobar si los cambios de color eran debidos a transformaciones del complejo o únicamente al ligando tridentado; así pues se repitió el estudio sobre los cationes con el ligando **L3**. Con el 1^{er} equivalente se vio un ligero cambio de color con varios cationes, el viraje fue hacia el amarillo. Con el 2^o equivalente no se apreció variación alguna. Estos cambios de color no siguieron ninguna relación con los experimentados por los productos estudiados anteriormente, si bien cabe destacar el comportamiento frente al catión Cu^{2+} con el que formaba una especie de color marrón. Lo que parecía claro es que con el Hg^{2+} no se producía ningún cambio de color ni mucho menos tomaba el color rosáceo característico. A continuación se estudió el comportamiento de las especies formadas en presencia de agua. Con el 1^{er} equivalente no se apreció ninguna variación significativa.

Añadidos 3 equivalentes de agua destilada, la especie formada con Cu^{2+} tomó un color verde mientras que el resto permanecieron inalteradas si se comparaban con la situación en ausencia de agua.

ESTUDIO CUALITATIVO DE LA SENSIBILIDAD FRENTE A CATIONES DEL COMPUESTO INTERMEDIO **1b** [PdL(H)Me].

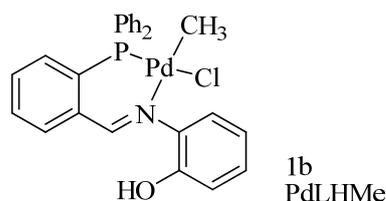


Figura 15

Dado que en la ruta sintética ha sido posible el aislamiento del intermedio **1b** PdL(H)Me, se hizo un estudio cuantitativo del mismo como referencia frente al derivado cerrado PdLMe. Se preparó una disolución 10^{-4} M del compuesto **1b**. La disolución fue prácticamente incolora.



1b(MeCN) · Ag⁺ Ni²⁺ Sn²⁺ Cd²⁺ Zn²⁺ Pb²⁺ Cu²⁺ Fe³⁺ Sc³⁺ Al³⁺ Hg²⁺

Figura 16

Se observó una pérdida de color con muchos de los cationes, pero lo más significativo fue el cambio de color producido al añadir Hg^{2+} . Una vez añadidos tres equivalentes se estudió el comportamiento de las especies formadas en presencia de agua. Añadiendo un equivalente, las disoluciones que antes no tenían color comenzaron a recuperar un color amarillo. Añadido el 3^o equivalente se comprobó ese cambio de color hacia un amarillo más claro, excepto en el caso del Cu^{2+} , que no recuperaba el color, también cómo el vial del Hg^{2+} permanecía con ese color morado. A la vista de los resultados, por un lado se confirmó la alta selectividad del derivado PdLMe (**2b**) frente al

Hg^{2+} , cosa que el derivado análogo PdLCl (**2a**) no presentaba. Las pruebas realizadas con **L3** confirmaron que el efecto sensor se debe al complejo en su totalidad y no únicamente a una posible coordinación del ligando libre con el catión añadido. Por otro lado la especie abierta PdL(H)Me, también estudiada, mostraba un comportamiento similar al de la especie cerrada frente al Hg^{2+} .

La presencia de medio ácido en las disoluciones generaba procesos de apertura de las estructuras; por ejemplo, pudo verse cómo en todos los casos en presencia de cationes ácidos (Fe^{3+}) las disoluciones se volvían incoloras, color correspondiente a las especies abiertas; del mismo modo, en presencia de agua, las disoluciones se volvían en todos los casos amarillas, correspondiente al color de los complejos cerrados de Pd(II) en disolución acuosa.

A partir de los resultados obtenidos, el siguiente paso fue realizar las mismas pruebas en otros disolventes, y aumentando el % en agua; de este modo se pudo estudiar el efecto del medio sobre el proceso de identificación del catión.

ESTUDIO CUALITATIVO DE LA SENSIBILIDAD FRENTE A CATIONES DEL COMPUESTO PdLMe (2b) EN ETANOL.

En este caso se llevaron a cabo las pruebas cualitativas con un disolvente prótico, en contraposición al MeCN utilizado inicialmente, para comprobar la respuesta de las especies en este medio. Se preparó una disolución 10^{-4} M del compuesto en EtOH. La disolución tenía un color amarillo. En cada vial se añadió 1 equivalente de cada catión (40 μl disolución 5×10^{-3} M catión), excepto en el primero que quedó como referencia del color original (Figura 17). Tras la adición de hasta 4 equivalentes de cada catión se comprobó cómo únicamente con Hg^{2+} se producía un cambio de coloración, pasando al color rosáceo que también se observó con MeCN, en este caso al parecer se ganó en selectividad ya que no hubo ninguna respuesta con el resto de los cationes. Después de añadir 4 equivalentes el cambio se mantuvo y la presencia del resto de cationes al parecer no afectó a la especie original.

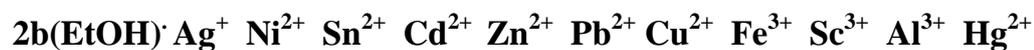


Figura 17

A continuación se estudió el comportamiento de las especies formadas en presencia de agua. No se apreció ningún cambio, únicamente después de haber añadido 4 equivalentes de agua desionizada comenzaba a apreciarse el efecto de la dilución.

ESTUDIO CUALITATIVO DE LA SENSIBILIDAD FRENTE A Hg^{2+} DEL COMPUESTO PdLMe (2b) EN OTROS DISOLVENTES:

A continuación se analizó el comportamiento de compuesto **2b** en distintas mezclas de disolventes:

Disolución 10^{-4} M en MeCN:H₂O (1:1):

En la siguiente serie se efectuaron pruebas únicamente con el catión de interés al ir añadiendo cantidades crecientes del mismo:

Ref 1eq Hg^{2+} Ref 2eq Hg^{2+} Ref 3eq Hg^{2+}

Figura 18

Se comprobó que la disolución en presencia de Hg^{2+} se volvía naranja desde el primer equivalente.

Disolución 10^{-4} M en EtOH:H₂O (1:1):

Se añadieron cantidades crecientes del catión Hg^{2+} :



Figura 19

Se observó el cambio instantáneo de color de la disolución en la que añadimos Hg²⁺ desde el primer equivalente.

Disolución 10⁻⁴M en DMSO:H₂O (1:1): Se añadieron cantidades crecientes del catión Hg²⁺ pero no se apreció cambio alguno al añadir el catión.

ESTUDIO CUALITATIVO DE LA SENSIBILIDAD FRENTE A CATIONES DEL COMPUESTO PdLCl EN ETOH.

Se preparó una disolución 10⁻⁴ M del compuesto. La disolución presentaba un color rosáceo anaranjado. Se observó que no se produce prácticamente ningún cambio con ninguno de los cationes. A continuación se estudió el comportamiento de las especies formadas en presencia de agua. El color permaneció estable respecto del original.

ESTUDIO CUALITATIVO DE LA SENSIBILIDAD FRENTE A CATIONES DEL COMPUESTO PdLCl en EtOH:H₂O (1:1)

Se preparó una disolución 10⁻⁴ M del compuesto. La disolución tenía un color anaranjado. Al igual que en el caso de las disoluciones en MeCN, el compuesto PdLCl no presentó sensibilidad frente al Hg²⁺, ni siquiera a altas concentraciones de catión.

ESTUDIO DE LA REVERSIBILIDAD EN MeCN DE LA ESPECIE FORMADA POR EL COMPUESTO PdLMe CON EL CATION Hg²⁺:

Para estudiar si el proceso por el cual la especie formada entre el catión y el complejo era reversible se utilizó un complejante muy selectivo que presentaba una gran afinidad por el Hg²⁺, como fue el 3,6-dioxa-1,8-octanoditiol (**4**). Lo que debía suceder en teoría al añadir esta especie es que la disolución inicial de color rojizo originada por la

interacción entre el compuesto PdLMe y Hg^{2+} recuperase el color original ya que el Hg^{2+} pasaría a formar el complejo con el ditiol.



Figura 20

Puede comprobarse cómo no se obtenía una disolución del color de la inicial, sino que en este caso era incolora, lo que podía corresponder con la forma abierta de la especie **1b**. A continuación, para comprobar si el proceso era reversible, se estudió lo que ocurría al añadir de nuevo el catión. Parece que eran necesarios 2 equivalentes más (Total: 3 equivalentes de catión mercúrico) para que se recuperara el color. Este efecto hizo suponer que **4** tenía la capacidad de deshacer el resultado de la interacción del Hg^{2+} y el complejo de Pd.

Se repitieron los mismos ensayos en otro disolvente con características distintas como era el EtOH: En primer lugar se añadió 3,6-dioxa-1,8-octanoditiol y a continuación se volvió a añadir Hg^{2+} para comprobar si se recuperaba el color inicial,

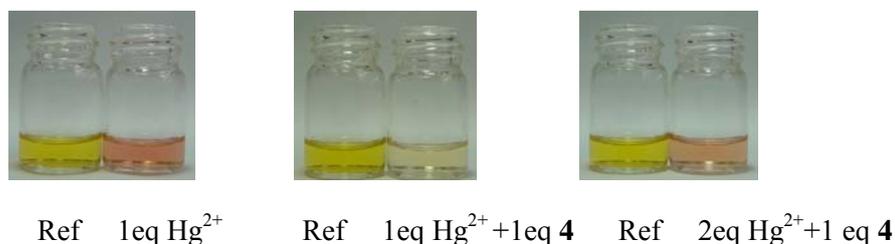


Figura 21

Al parecer el proceso era reversible ya que se obtenía el mismo color inicial. En el paso intermedio, tras añadir **4**, la disolución quedaba incolora, esto pareció indicar la presencia de la especie abierta PdL(H)Me. Se repitió todo el ciclo para comprobar la eficacia del proceso añadiendo 1 equivalente de ditiol y después varios equivalentes de

Hg²⁺, obteniéndose los mismos cambios de color; el proceso pudo repetirse indefinidamente con el único efecto apreciable de la dilución.

ESTUDIO CUALITATIVO DE LA SELECTIVIDAD DEL COMPUESTO PdLMe FRENTE A Hg²⁺ EN PRESENCIA DEL RESTO DE CATIONES

Siguiendo con el estudio cualitativo del complejo, se buscó conocer la selectividad del complejo cuando en el medio estaban presentes todos los cationes para los que se ha realizado el estudio, de este modo se añadió 1 equivalente de cada uno de los cationes de la serie estudiada: Ag⁺ Ni²⁺ Sn²⁺ Cd²⁺ Zn²⁺ Pb²⁺ Cu²⁺ Fe³⁺ Sc³⁺ Al³⁺ a excepción del Hg²⁺ a una disolución 10⁻⁴ M en EtOH del complejo (se realizó el ensayo en este disolvente ya que era en el que se obtenía un cambio de color especialmente significativo). Inicialmente, como era de esperar, no se producía variación alguna tras añadir toda la serie de cationes. Cuando se añadió 1equivalente de Hg²⁺ sí que se produjo el cambio de color que se había apreciado en los ensayos anteriores. Se pudo así confirmar que la presencia del resto de cationes no afectaba a la sensibilidad del derivado PdLMe hacia el catión Hg²⁺.



Ref todos los cationes Ref todos los cationes+ Hg²⁺

Figura 22

Pudo comprobarse también la reversibilidad en presencia de todos los cationes. Se añadió 1 equivalente del complejante 3,6-dioxa-1,8-octanoditiol sobre la disolución anterior, la disolución recuperó el color original, y al añadir de nuevo Hg²⁺ se recuperó el color de la especie formada entre el derivado PdLMe (**2b**) y el catión.

ESTUDIO CUALITATIVO DE LAS PROPIEDADES COMO SENSOR DEL COMPUESTO PdLMe RETENIDO SOBRE GEL DE SÍLICE.

Sobre 5 ml de una disolución 10^{-4} M en EtOH (5×10^{-8} moles) se añadió una punta de espátula de gel de sílice 60 (0.04-0.06 mm, 0.07 g), se agitó durante unos minutos y se eliminó el disolvente hasta obtener un sólido totalmente seco. El gel de sílice quedó del color que tenía la disolución, es decir amarillo claro. A continuación se añadieron 20 μ l de disolución de Hg^{2+} 5×10^{-3} M (20 eq), el cambio de color fue instantáneo; finalmente se eliminó el disolvente en la estufa (Figura inferior, izquierda). Se estudió la reversibilidad añadiendo sobre el vial que contenía Hg^{2+} , 20 μ l de disolución de ditiol 5×10^{-3} M. Se comprobó que se recuperaba el color amarillo inicial (Figura inferior, derecha)

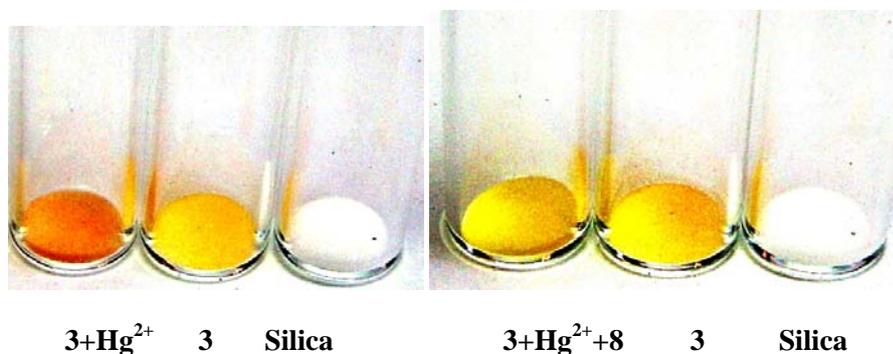


Figura 23

Cuando se añadió de nuevo Hg^{2+} (40 μ l de disolución de 5×10^{-3} M) volvió a recuperarse el color rosáceo que el complejo tomaba en presencia de mercurio, tal como se obtuvo inicialmente en la figura de la izquierda, con lo que el sensor podía utilizarse repetidamente.

ESTUDIO ESPECTROSCÓPICO MEDIANTE UV-VIS:

Una vez descrito el comportamiento de los compuestos frente a la serie de cationes de interés, se procedió al estudio cuantitativo del comportamiento y de las especies formadas entre el catión Hg^{2+} y el derivado PdLMe (**2b**), dado que es frente a éste frente al que mayor selectividad presentaba. Se realizaron una serie de valoraciones y posterior ajuste a modelos no lineales que indicaran el tipo de especies y equilibrios que se formaban entre el compuesto y el metal. Continuando con el orden desarrollado en el estudio cualitativo, se comenzó con las pruebas en MeCN, para posteriormente repetir idéntico procedimiento en EtOH y EtOH- H_2O .

La banda original que se observó a 460 nm disminuyó a medida que se añadieron los equivalentes de Hg^{2+} , y se formó una nueva banda en 510 nm, responsable del color morado final. Al desglosar esta gráfica en dos partes se comprobó cómo hasta el 1^{er} equivalente era donde se producía toda la variación y a partir de ahí el sistema no se modificaba aunque se siguieran añadiendo más equivalentes de catión. Con los resultados obtenidos se procedió a la representación de la variación de absorbancia frente a la concentración (moles/L) de Hg^{2+} para una longitud de onda fija, en este caso se utilizó aquella en la que la variación de absorbancia era más significativa, los valores se ajustaron a los modelos no lineales propuestos aplicando el programa de cálculo ORIGIN. Los resultados se ajustaron a un modelo del tipo 1:1, dando una constante $\log K = 6.30 \pm 0.15$.

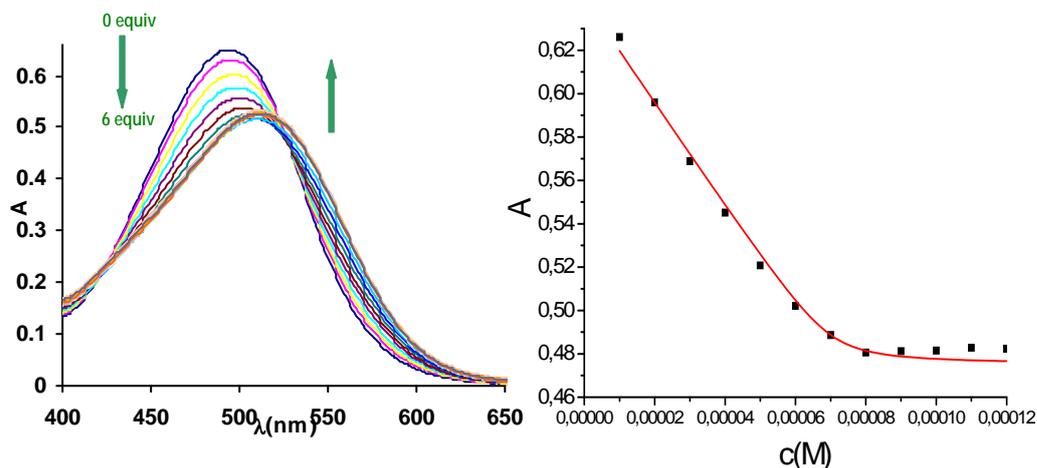


Figura 24. Curvas de valoración y ajuste de **2b**, disolución 10^{-4} M en MeCN, con Hg^{2+} .

Se encontró asimismo un punto isobéptico a 420 nm, visible entre 0 y 1 equivalentes de Hg^{2+} . El límite de detección de una disolución 10^{-5} M en MeCN, calculado mediante el método de la variabilidad del blanco, fue de 2.76×10^{-7} M.

La valoración cuantitativa de una disolución 10^{-4} M de **2b** en EtOH mostró que la absorción original a 465 nm disminuyó a medida que se añadía Hg^{2+} y se observó una nueva absorción a 500 nm, responsable del cambio de color. También se observaron dos puntos isobéuticos, uno a 510 nm entre 0 y 1 equivalentes de Hg^{2+} , y a 500 nm entre 1 y 2 equivalentes de Hg^{2+} . Esta vez las curvas se ajustaron a un modelo 2:1, la saturación se producía tras añadir 2 equivalentes de Hg^{2+} , a partir de lo que se obtuvieron las constantes de valoración: $\log K_1 = 4.13 \pm 0.04$ y $\log K_2 = 4.56 \pm 0.27$.

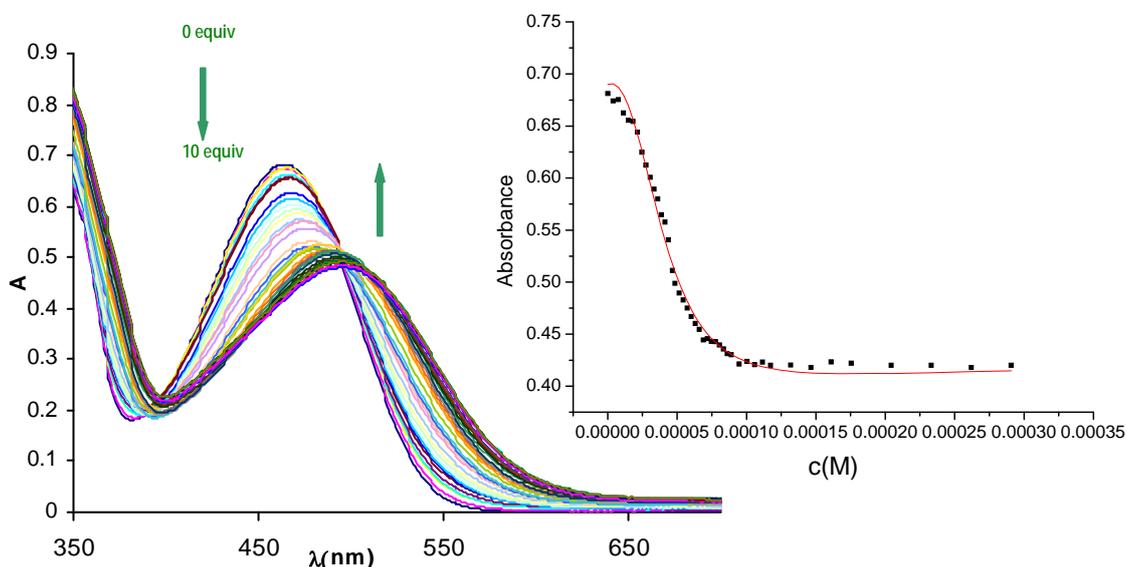


Figura 25: Izquierda: Espectros de absorción de la valoración de **2b** (10^{-4} M en ETOH) con Hg^{2+} . Derecha: Ajustes para el cálculo de las constantes de formación del complejo 2:1 ($\lambda_{\text{máxima}} = 455\text{nm}$)

Se realizaron valoraciones espectroscópicas en la mezcla EtOH:H₂O (1:1) como disolvente, el comportamiento fue el mismo que con EtOH, una banda que disminuía a $\lambda = 455$ nm y otra que iba aumentando progresivamente a $\lambda = 500$ nm.

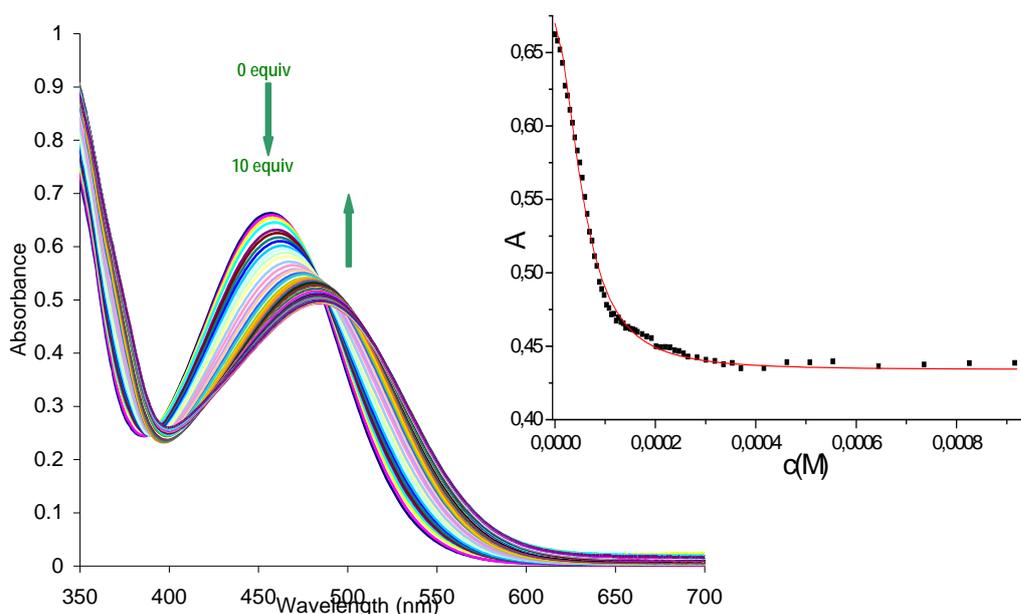


Figura 26: Izquierda: Espectro de absorción para la valoración de $3 \times 10^{-4} \text{ M}$ en ETOH:H₂O (1:1) con Hg^{2+} . Derecha: Ajustes para el cálculo de las constantes de formación 2:1 ($\lambda_{\text{máxima}} = 455 \text{ nm}$)

Se representó la curva de valoración a una longitud de onda fija (455 nm); se producía una saturación del sistema próximo a los 2 equivalentes, se ajustaron los datos obtenidos a un modelo no lineal y los resultados se aproximaron a un complejo del tipo 2:1, dando las constantes del sistema: $\log K_1 = 3.14 \pm 0.10$ y $\log K_2 = 4.93 \pm 0.68$.

Estudiando detenidamente el espectro obtenido tras la valoración, separándolo en tres etapas, se pudo distinguir:

0 a 1 equivalentes: en esta primera etapa se observó un punto isobéptico en 480 nm

1.1 a 2 equivalentes: el punto isobéptico se desplazó a otra posición, 500 nm.

2.1 a 10 equivalentes: en este tramo no hubo ninguna variación respecto al anterior.

Estas observaciones se relacionan con el modelo obtenido tras el ajuste no lineal, así pues hasta 1 equivalente de Hg^{2+} añadido se forma una única especie, como así indica

el punto isobéptico, que es diferente a la que se forma al seguir añadiendo ión, hasta que se satura el sistema, 2º punto isobéptico.

El método de detección resultó ser eficaz incluso en distintos medios en los que se variaba el pH; en todos ellos el ajuste se correspondía con un complejo 2:1, obteniéndose las constantes más altas para la disolución a pH neutro.

pH	4.15	7.40	8.25
Log K₁	2.39±0.05	2.66±0.06	2.39±0.04
Log K₂	4.15±0.05	5.73±0.06	4.99±0.04

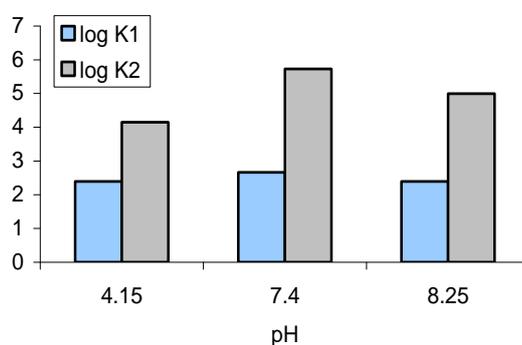


Figura 27: Cálculo de las constantes de formación para modelo 2:1, de una disolución EtOH:tampón HEPES (1:1) a distintos valores de pH.

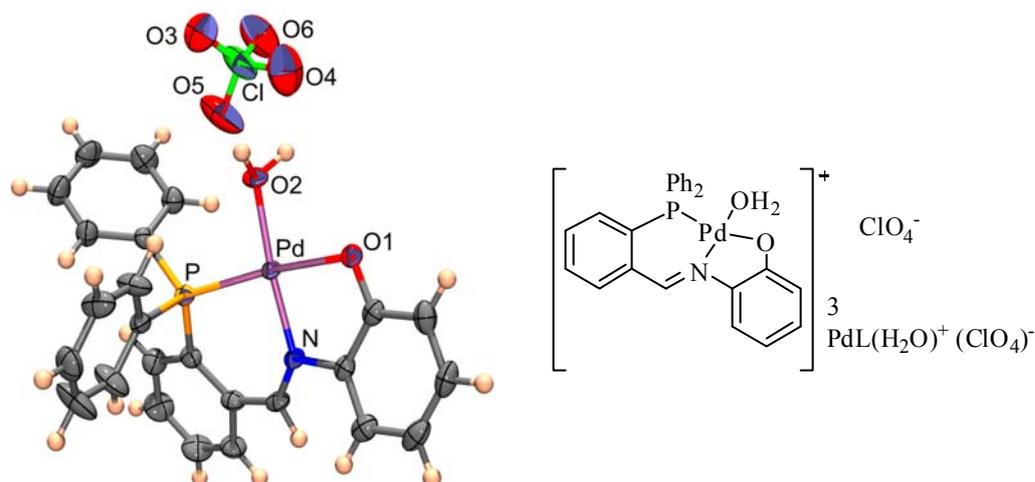
El límite de detección de catión Hg^{2+} , de una disolución 10^{-5} M en EtOH:H₂O 1:1 de **2b**, calculado por el método de la variabilidad del blanco²⁵ fue de 3.16×10^{-7} M.

Por otra parte, experimentos de valoración similares, utilizando una disolución 10^4 M del producto **1b** en MeCN o EtOH mostraron variaciones de la banda principal de absorción y aparición de nuevas bandas muy parecidas a los experimentos realizados con **2b**, pero no se pudieron ajustar a ninguno de los modelos utilizados, por lo que no se siguió investigando.

²⁵ D. L. Massart, B. G. M. Vandeginste, L. M. C. Buydens, S. De Jong, v Lewi, J. Smeyers-Verbeke, "Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A", Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 1997, Chapt. 13, 379.

ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DEL PRODUCTO OBTENIDO TRAS LA VALORACIÓN DEL COMPUESTO PdLMe (**2b**) CON Hg²⁺

Para caracterizar la estructura del compuesto final obtenido tras la valoración de la molécula con Hg²⁺, se procedió a su cristalización, preparando una disolución equimolecular de Hg²⁺ y el compuesto **2b** mediante un proceso de difusión lenta en una mezcla Et₂O:MeOH durante 12 días. Tras este periodo de tiempo se obtuvieron unos cristales rojos en forma de agujas. El estudio mediante difracción de rayos X reveló la existencia de una especie catiónica de Paladio(IV)·(H₂O), en la cual el grupo metilo unido al Paladio ha desaparecido y una molécula de agua se encontraba en esa posición. El complejo cristalizó con otras dos moléculas de agua, que no se muestran en la figura, y cuyos enlaces de hidrógeno contribuyeron al empaquetamiento cristalino.



Los espectros de RMN-H¹ y ³¹P-RMN confirmaron la ausencia del grupo metilo en la estructura, el doblete que aparecía a un desplazamiento δ 0.60 en CDCl₃ para **2b**, no aparecía en el RMN-H¹ de la especie cristalizada. Por otro lado, el espectro UV-vis del compuesto cristalizado disuelto en EtOH:H₂O (1:1) fue idéntico al que se obtenía al finalizar las valoraciones con Hg²⁺, con un λ_{max} = 510 nm y sin ninguna banda en λ = 455 nm. Todos estos resultados indicaron que no se formaba un complejo con enlace Pd-Hg, sino que la especie que se formaba finalmente y que daba el color característico era un complejo de Pd⁺ y que el metilo que poseía inicialmente el complejo se separaba de la estructura original. Con el fin de reconocer el posible mecanismo a través del cual el

derivado **2b** era capaz de detectar Hg^{2+} , se realizaron valoraciones mediante RMN- ^1H . Las experiencias se realizaron en los mismos disolventes, en este caso deuterados, utilizados en las valoraciones UV-Vis. En primer lugar se realizó la valoración del derivado PdLMe (**2b**) en CD_3CN :

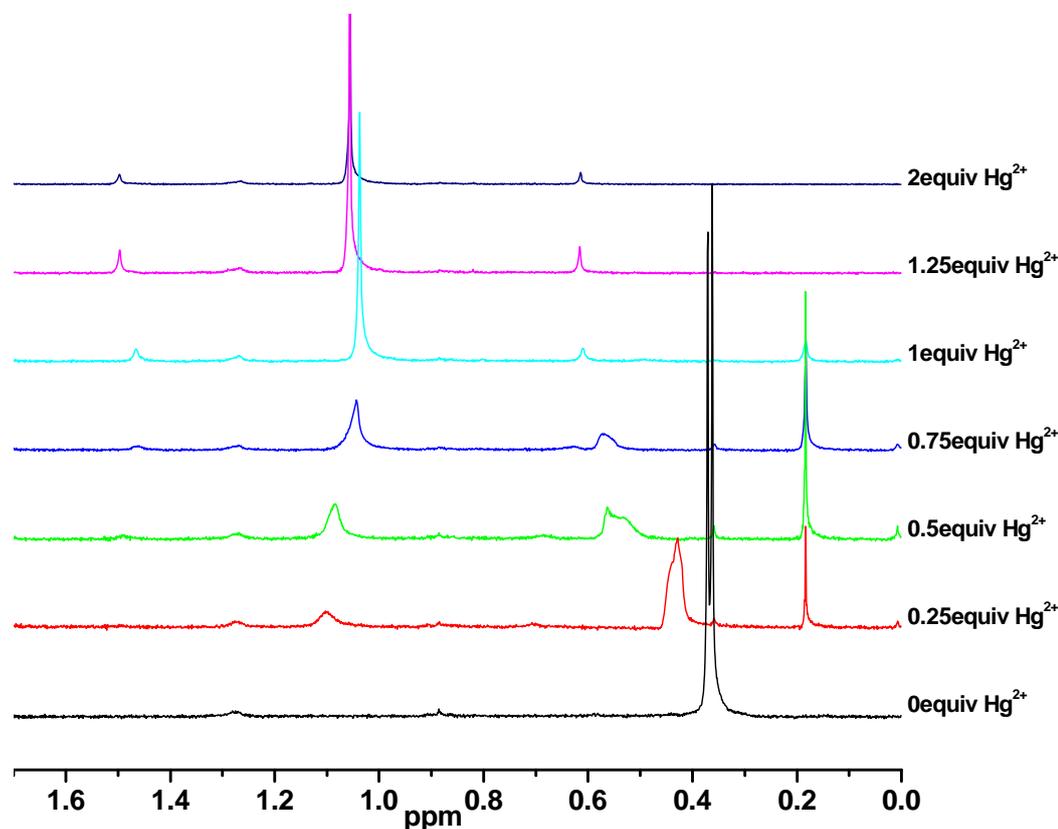


Figura 28: Valoración RMN- ^1H de PdLMe en CD_3CN con disolución de Hg^{2+} en CD_3CN

La figura muestra que, tras la adición de 0.25 hasta 0.75 equivalentes de Hg^{2+} a una disolución de PdLMe, la señal del metilo unido al paladio (doblete, δ 0.39, $^2J(^1\text{H}, ^{31}\text{P}) = 2.7$ Hz) disminuye y aparece una señal correspondiente a Me_2Hg [singlete, δ 0.20, dos satélites, $^2J(^1\text{H}, ^{199}\text{Hg}) = 105$ Hz],²⁶ que está en equilibrio con una señal, que aparece durante la valoración, correspondiente a MeHg^+ [singlete, δ 1.06, dos satélites,

²⁶ RMN-H: Sigma Aldrich Co. Catalog N°: 32808-1

$^2J(^1\text{H}, ^{199}\text{Hg}) = 257 \text{ Hz}$].²⁷ Después de la adición de 1 equivalente de Hg^{2+} la señal correspondiente al Me_2Hg prácticamente desaparece y a altas concentraciones de Hg^{2+} la única señal de metilo que hay en el espectro corresponde a la señal de MeHg^+ . Al seguir añadiendo Hg^{2+} el sistema ya no varía.

Después se realizó la valoración del derivado PdLMe (**2b**) en CD_3OD :

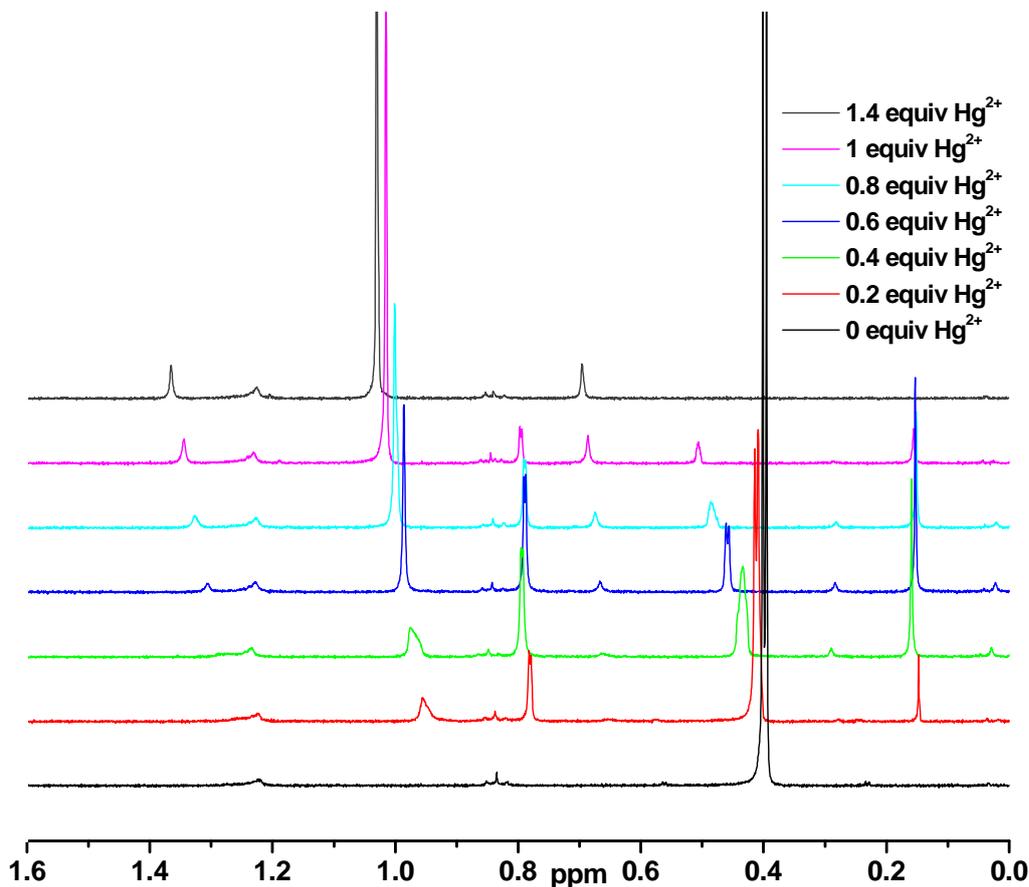


Figura 29: Valoración mediante ^1H NMR con Hg^{2+} en CD_3OD

La figura muestra que en CD_3OD se observa el mismo patrón de señales, además de una nueva señal correspondiente a Me-Pd a δ 0.80 que es un valor muy cercano al valor de δ 0.71 del grupo Me-Pd en **1b**. Por tanto la señal debe

²⁷ D. A. Rabenstein, M. C. Tourangeau, C. A. Evans, *Can. J. Chem.*, **1976**, *54*, 2517-2525.

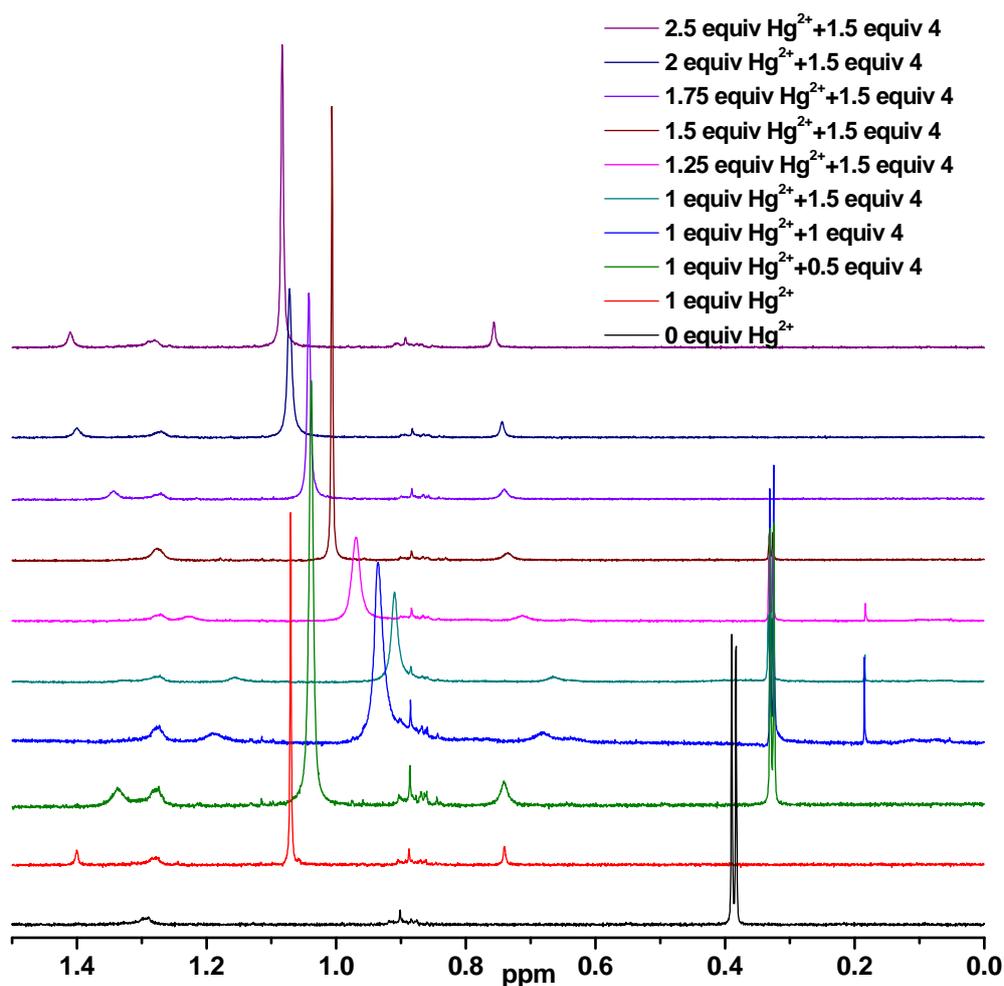
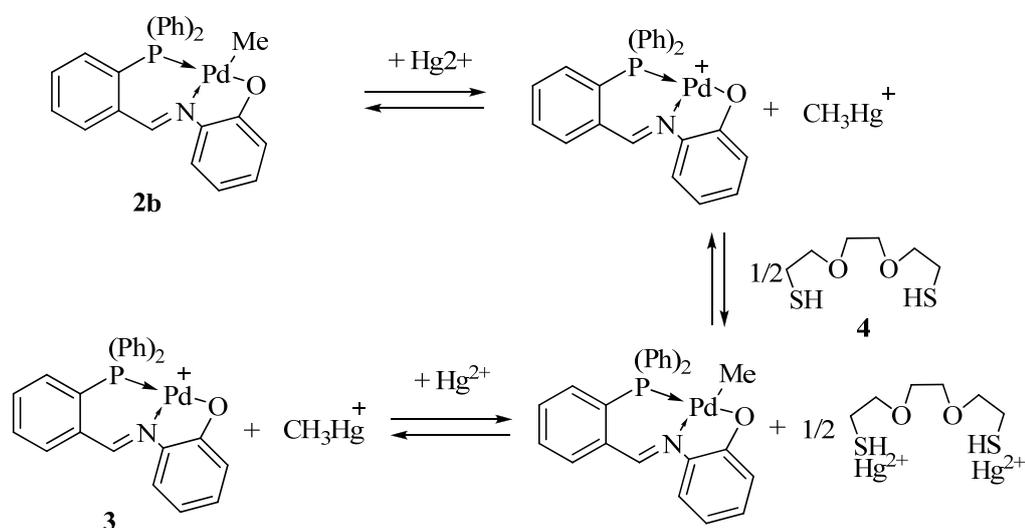


Figura 30: Valoración en RMN ^1H de $2\text{b}/\text{Hg}^{2+}/4$ y Hg^{2+} en CD_3CN

El primer espectro corresponde al derivado **2b**, donde se aprecia claramente la señal correspondiente al grupo metilo del complejo de Paladio (doblete, δ 0.32). Sobre éste se añade 1 equivalente de Hg^{2+} , y se realiza el espectro segundo, mostrado en rojo. Se aprecia la conversión total del sistema al desaparecer la señal del Me-Pd y formarse la que se identifica como MeHg^+ (1.08 ppm) con sus satélites característicos. Cuando se añaden 0.25 equivalentes de 3,6-dioxa-1,8-octanoditiol (**4**) (espectro en verde) puede comprobarse que además de la señal del MeHg^+ aparece de nuevo el doblete que corresponde al grupo metilo original unido al Paladio, todas la señales se desplazan hacia la derecha del

espectro por efecto de apantallamiento debido la presencia de **4**. Cuando se continúan añadiendo cantidades crecientes de **4**, se confirma la desaparición de la señal correspondiente al MeHg^+ , y la restauración de la del metilo inicial. Esto indica que la adición de **4** revierte el sistema al estado inicial. Por último se vuelve a valorar el sistema con Hg^{2+} con el fin de comprobar si los resultados son semejantes a los de una valoración directa. Efectivamente al aumentar la cantidad de Hg^{2+} en el sistema se regeneran las señales correspondientes a la formación del Me_2Hg al inicio y posteriormente la del MeHg^+ . Los procesos observados durante esta valoración quedan reflejados en el esquema siguiente:



Esquema 11: Mecanismo propuesto para el proceso reversible.

Esta reversibilidad confirma las pruebas cualitativas explicadas en el capítulo anterior.

Análogamente, si se realizan pruebas similares de valoración en RMN ^1H pero cambiando el disolvente por metanol deuterado puede verse (Figura 31) que los patrones de modificación de señales son los mismos, pero esta vez complicados por el hecho de que en disolventes próticos existen formas abiertas del complejo de paladio, aquellas en que el enlace paladio-oxígeno se ha roto y por tanto aparecen señales correspondientes a los grupos metilo en cada complejo existente.

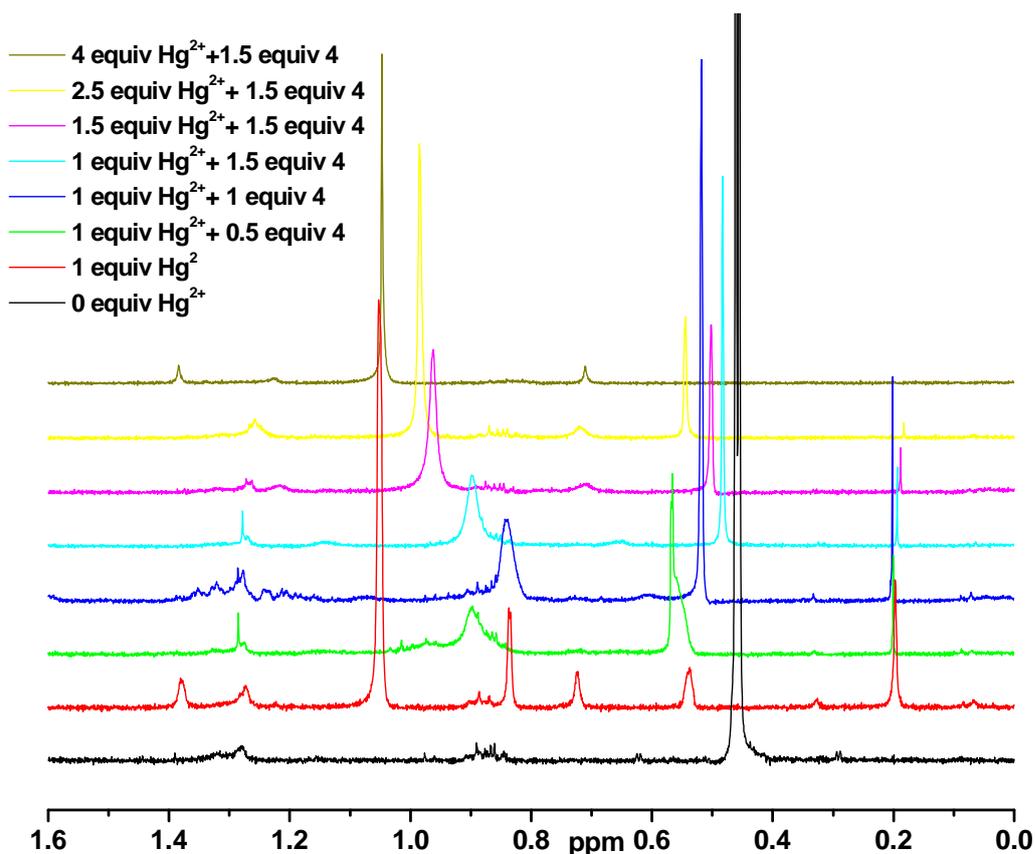


Figura 31: Pruebas de valoración en RMN ^1H de $2\text{b}/\text{Hg}^{2+}/4$ y Hg^{2+} en CD_3OD .

La señal del grupo metilo inicial sirve de referencia (espectro en negro). La señal del grupo metilo después de la adición de 1 equivalente de Hg^{2+} , que corresponde principalmente a MeHg^+ se muestra en rojo. Después de la adición de 0.5 a 1.5 equivalentes de **4** a la disolución anterior, una señal correspondiente a Me-Pd aparece de nuevo, junto a una señal ancha a δ 0.8-0.9 que no tiene satélites, y que se asigna a una señal Me-Pd de la forma abierta. Una pequeña señal correspondiente a Me_2Hg (δ 0.2) también puede verse. Después de la adición de Hg^{2+} solo se ve una señal de MeHg^+ . El sistema es por tanto reversible, independientemente del disolvente escogido.

EXPERIMENTOS DE DETECCIÓN Y VALORACIÓN DE CATION METILMERCURIO(II):

Dado que es posible modificar el equilibrio de la reacción, se han buscado las posibles aplicaciones prácticas del desplazamiento del equilibrio para la detección de MeHg^+ . Para este propósito se ha realizado la valoración de una disolución equimolecular de **3** $[\text{PdL}(\text{H}_2\text{O})]\text{ClO}_4$ (obtenido por difusión lenta de **2b** (PdLMe) y $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$ en éter/acetonitrilo durante 10 días) y MeHgCl , disuelto en acetonitrilo. La adición de MeHg^+ a una disolución 10^{-4} M del complejo **3** en MeCN hasta que se obtenía una disolución equimolecular no mostró cambios en el espectro UV-visible ($\lambda_{\text{max}} = 510$ nm). La mezcla era similar a la obtenida a partir de la valoración del complejo **2b** en MeCN con Hg^{2+} . Esta mezcla se valoró con **4**, dando unas curvas de valoración que se ajustaron a un modelo 1:1 (Figura 32, representado hasta 1.1 equivalentes de ditiol), a partir del cual se obtuvo la constante de valoración: $\log K = 5.68 \pm 0.14$.

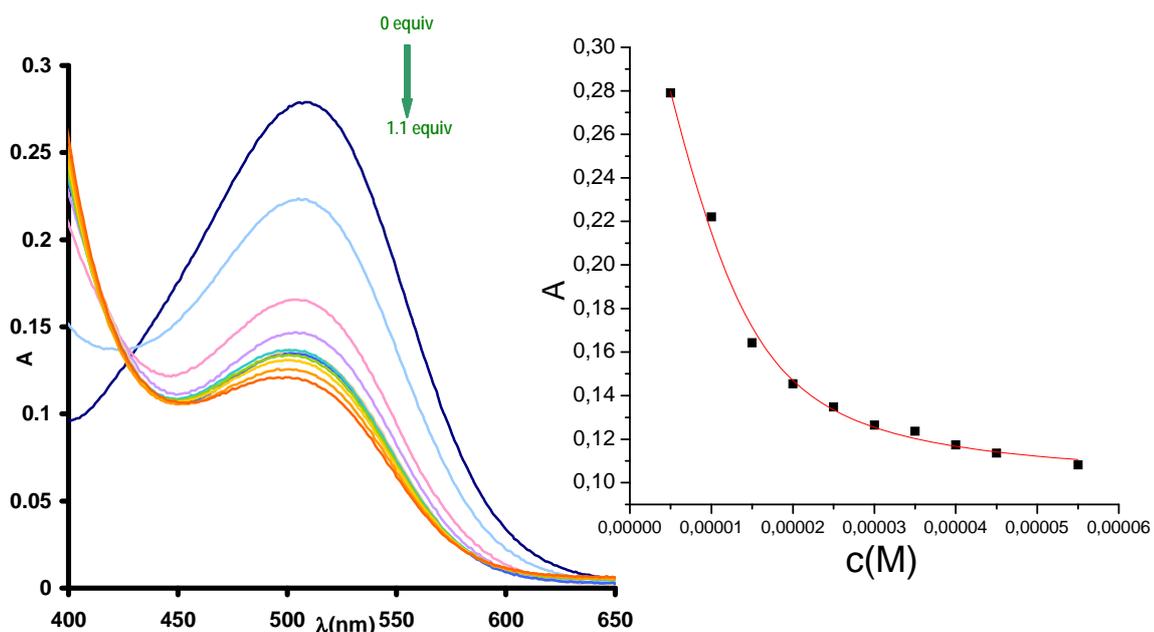


Figura 32: Curvas de valoración y ajuste de la valoración de una disolución 10^{-4} M de acuapaladio **3 y MeHg^+ en MeCN con **4**.**

La aplicación práctica de la detección de catión metilmercurio(II) es más adecuada cuando se realiza en disolventes acuosos o mixtos por lo que se probó a realizar una experiencia parecida a la anterior, pero esta vez en una mezcla 1:1 de EtOH/H₂O. Así, se realizó la valoración de una disolución equimolecular del acuapaladio **3** en EtOH/H₂O (1:1) y MeHgCl con ditiol. La adición de MeHgCl en acetonitrilo a una disolución 10⁻⁴ M del complejo acuapaladio en EtOH/H₂O (1:1) mostró solo una pequeña disminución ($A_0 - A = 0.04$) en la intensidad de la banda de absorción a 485 nm por la adición de 0.1 equivalentes de MeHgCl, pero después no hubo más cambios por adición sucesiva de MeHgCl hasta obtener una disolución equimolecular. La modificación de la absorbancia se justifica por la activación del equilibrio entre la forma abierta y la cerrada del complejo de paladio debida a la presencia de agua y del catión ácido MeHg⁺. La mezcla equimolecular del complejo acuapaladio y MeHg⁺ fue después valorada con **4**, dando curvas de valoración más complejas que en el caso anterior.

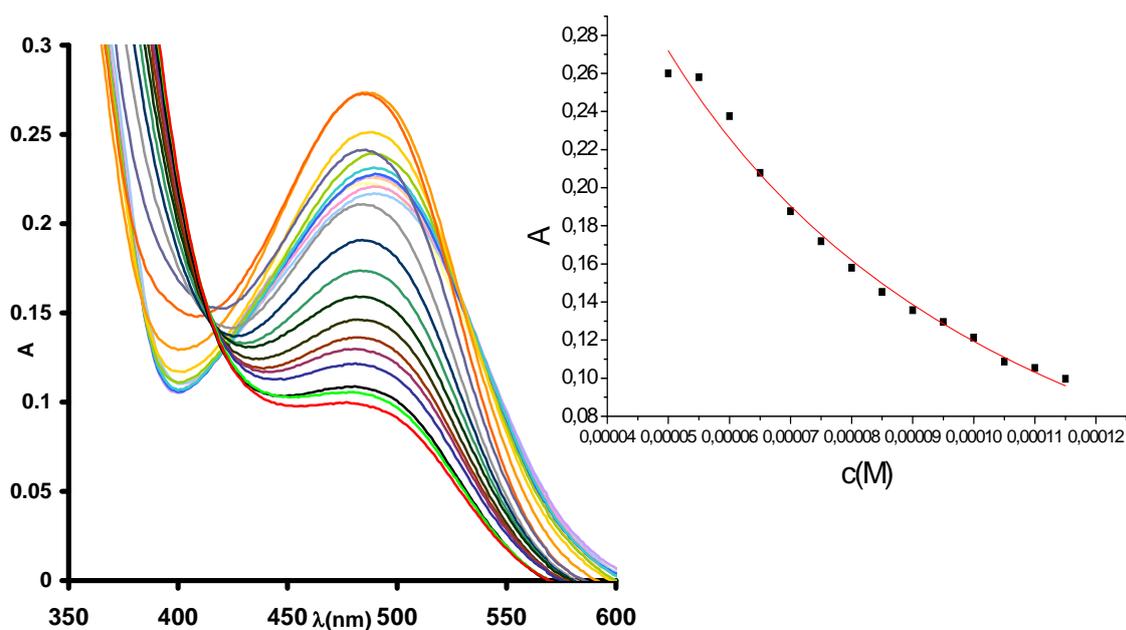


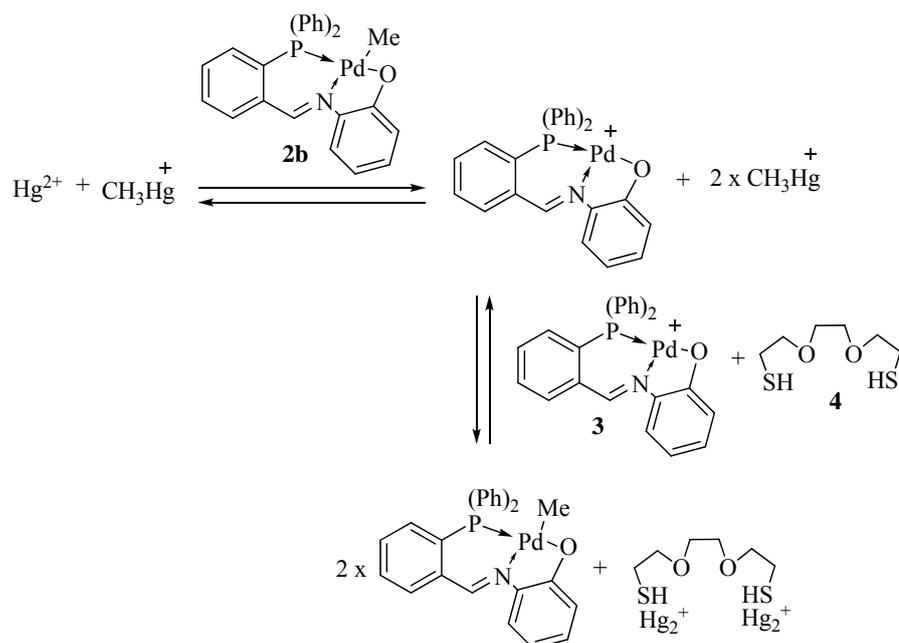
Figura 33: Espectros de absorción para la valoración de PdL⁺ (5×10^{-4} M en EtOH:H₂O) + 1 equivalente de MeHg⁺ con 3,6-dioxa-1,8-octanoditiol y ajustea a un modelo 1:1 ($\lambda_{\text{máxima}} = 476$ nm) considerado a partir del primer equivalente de ditiol añadido.

Esta vez la presencia de más de un equilibrio se evidenciaba por la necesidad de añadir hasta dos equivalentes de **4** para saturar el sistema. A partir de las curvas de valoración, se consideró que el primer equivalente de **4** fue necesario para equilibrar los diferentes complejos de paladio, y se realizó la representación del perfil de valoración a partir de la adición del primer equivalente de **4**. Se realizó un ajuste a un modelo 1:1, a partir del que se obtuvo una constante: $\log K = 4.67 \pm 0.21$. Como conclusión, se puede decir que el equilibrio estudiado es capaz de detectar y valorar efectivamente catión metilmercurio[II] mediante la valoración inversa con 3,6-dioxa-1,8-octanoditiol, aunque el proceso es mucho más sencillo en disolventes apróticos que en disolventes próticos.

El límite de detección de cation metilmercurio(II) con el complejo acupaladio **3**, a la concentración de 10^{-5} M en EtOH:H₂O (1:1), calculado por el método de la variabilidad del blanco, dio un valor de $2.28 \cdot 10^{-7}$ M.

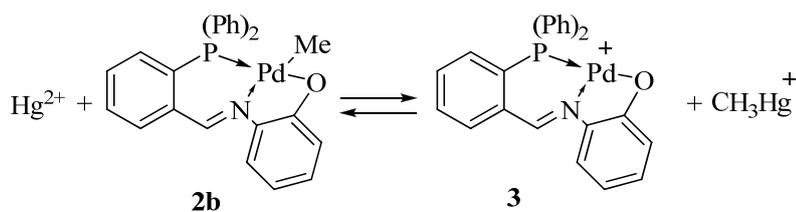
EXPERIMENTO DE VALORACIÓN DE UNA MEZCLA DE CATION METILMERCURIO(II) Y CATION MERCURIO(II)

Con el fin de poner de manifiesto el alcance del método para la diferenciación de compuestos de mercurio presentes en una disolución, se realizó un experimento de valoración simultánea de una mezcla equimolecular de MeHg²⁺ y Hg²⁺. Es posible pensar que, a través de los distintos sistemas en equilibrio propuestos en párrafos anteriores, podría plantearse un método para la especiación de Hg²⁺ y MeHg⁺ mediante técnicas espectroscópicas UV-Vis, con las cuales podría determinarse la presencia de cada analito y además cuantificar la cantidad de cada uno de los compuestos presentes en una mezcla de ambos. El procedimiento se resume en el esquema siguiente.



Esquema 12

En primer lugar se preparó una mezcla equimolecular de Hg^{2+} y MeHg^+ en $\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}$ (1:1), disolución 10^{-4} M en MeCN. Esta muestra fue valorada con cantidades crecientes del complejo **2b** ($5 \cdot 10^{-3}$ M en MeCN). Siguiendo el esquema anterior, la disolución inicialmente incolora pasó a un color rosáceo característico debido a la semirreacción de formación del complejo acuapaladio producido en exclusiva por la presencia de Hg^{2+} , Esquema 13:



Esquema 13

La presencia de MeHg^+ no debe interferir en el equilibrio. Tal como puede verse en la figura 34 el cambio de color se completa tras añadir 1 equivalente de complejo **2b**.

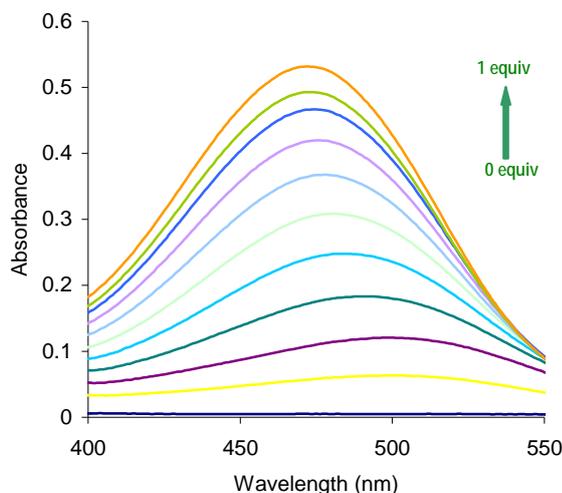
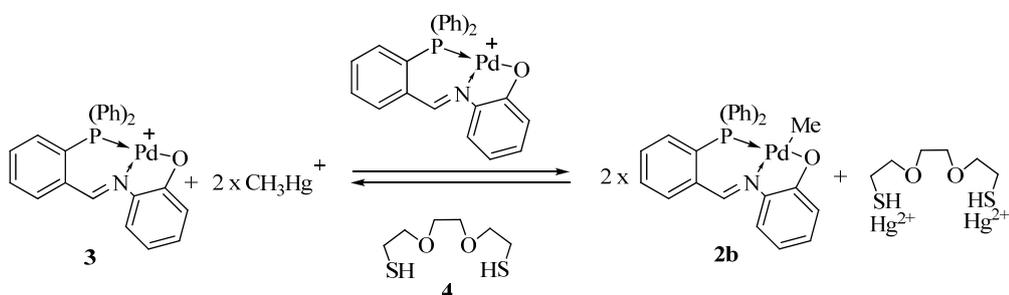


Figura 34: Variación de la banda de absorción en visible al añadir 1 equivalente de PdLMe ($5 \cdot 10^{-3}$ M en MeCN) sobre una disolución equimolecular (10^{-4} M en MeCN) de Hg^{2+} y MeHg^+

Para cuantificar la cantidad de MeHg^+ presente, debe realizarse la valoración de la mezcla anterior con **4** ($5 \cdot 10^{-3}$ M en MeCN), para desplazar el equilibrio a la formación de **2b**, lo que requiere la presencia de cantidad suficiente del complejo acupaladio **3** para desplazar el equilibrio totalmente hacia la derecha.



Esquema 14

Así, se añadió en primer lugar 1 equivalente de complejo acupaladio **3** ($5 \cdot 10^{-3}$ M en MeCN). La adición de este equivalente no modificó la absorbancia de la mezcla, tal como puede verse en la Figura 35.

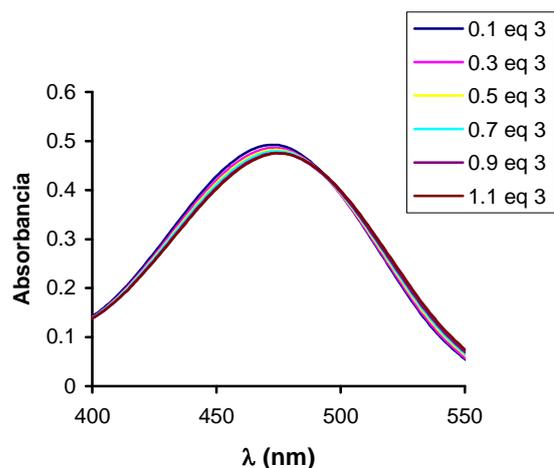


Figura 35: Efecto de la adición de 1 equivalente de complejo acualpaldio **3** sobre la disolución

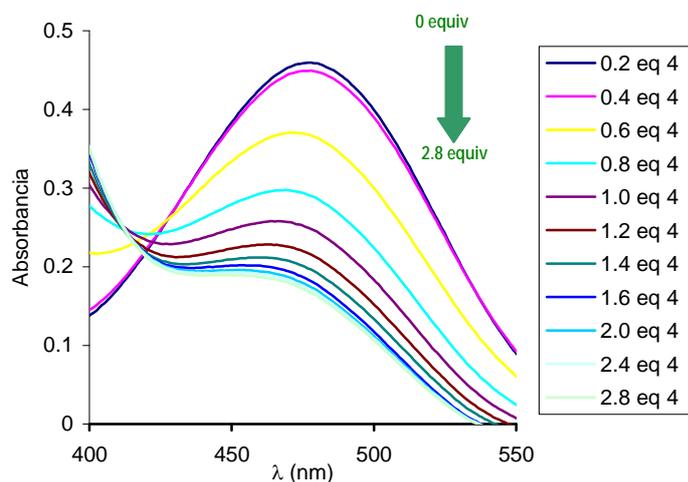


Figura 36: Valoración de la disolución anterior con ditiol

Sobre la mezcla anterior se añadieron sucesivamente cantidades crecientes de una disolución de **4**, Figura 36. De esta manera, todo el MeHg^+ presente se consumía, ya que el compuesto **4** es un coordinante selectivo para el Hg^{2+} , el complejo de acualpaldio **3** desaparecía a medida que se formaba de nuevo el complejo **2b**, y el equilibrio se desplazaba hacia la izquierda observándose la disminución de la banda de absorción característica del complejo **3**. Puede verse que el equilibrio se desplaza totalmente cuando

se añaden 2 equivalentes de **4**, la adición de un exceso de 3,6-dioxa-1,8-octanoditiol. De esta manera, conociendo los equivalentes añadidos de **3** en la primera etapa, se obtiene la concentración de Hg^{2+} en la muestra; en la segunda valoración se calcula la cantidad total de MeHg^+ a partir de los equivalentes añadidos de **4**. Si al total MeHg^+ se le restan los equivalentes formados en la primera etapa, se obtienen los equivalentes iniciales de MeHg^+ . En el ejemplo mostrado sería 1 equivalente de Hg^{2+} y 1 equivalente de MeHg^+ . Aunque el sistema requiere de dos valoraciones es, en principio, capaz de realizar la valoración simultánea de una mezcla de MeHg^+ y Hg^{2+} que están presentes en una disolución.

CONCLUSIONES:

De los resultados experimentales obtenidos en este capítulo se pueden sacar una serie de conclusiones tales como:

Se ha realizado el screening de una serie de complejos de paladio, de los cuales se han estudiado sus características como sensores de cationes, encontrándose que uno de ellos, PdLMe, es especialmente adecuado para esta función presentando una alta selectividad y sensibilidad frente a Hg^{2+} en distintos disolventes.

El estudio de los procesos de detección de mercurio(II) y metilmercurio(II) ha permitido establecer una serie de equilibrios de reacción a partir de los cuales pueden identificarse y cuantificarse las especies de mercurio(II) y metilmercurio(II), e incluso cuantificar ambas en una mezcla conjunta.

Una primera comunicación de estos resultados experimentales ha sido ya publicada.²⁸

²⁸ O. del Campo, A. Carbayo, J. V. Cuevas, A. Muñoz, G. García-Herbosa, D. Moreno, E. Ballesteros, S. Basurto, T. Gómez, T. Torroba, *Chem. Commun.*, **2008**, 38, 4576-4578.

**PARTE II. DESARROLLO DE
UNA SONDA CROMO-FLUORO-
GÉNICA DE COBRE(II).**

El cobre es un elemento traza vital, el tercero más abundante en seres humanos, está presente en niveles bajos en una gran variedad de células y tejidos, siendo muy abundante en el hígado¹. Su concentración en el citoplasma neuronal puede contribuir a la etiología de las enfermedades de Alzheimer² o Parkinson.³ El cobre (II) está implicado en varias respuestas fisiológicas. Las proteínas que contienen iones de cobre en el sitio activo están implicadas generalmente como catalizadores redox en procesos biológicos tales como transferencias de electrones u oxidaciones de varios sustratos orgánicos,⁴ La investigación de la química del sitio activo de las enzimas de cobre que activan oxígeno ha demostrado que especies reactivas de cobre y oxígeno están implicadas en la acción de oxigenasas biológicas.⁵ Sin embargo, la exposición crónica a un exceso de cobre causada por accidentes, peligros ocupacionales o contaminación medioambiental se ha ligado a daño oxidativo, por lo que la detección de Cu²⁺ en agua o muestras fisiológicas es de gran importancia toxicológica y ambiental. Se han desarrollado muchas sondas fluorogénicas y

¹ A. Mathie, G. L. Sutton, C. E. Clarke, E. L. Veale, *Pharm. Ther.* **2006**, *111*, 567-583.

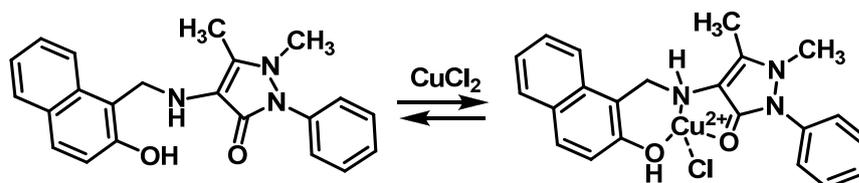
² (a) S. Mare, S. Penugonda, S. M. Robinson, S. Dohgu, W. A. Banks, N. Ercal, *Peptides* **2007**, *28*, 1424-1432. (b) C. Deraeve, C. Boldron, A. Maraval, H. Mazarguil, H. Gornitzka, L. Vendier, M. Pitié, B. Meunier, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 682-696.

³ (a) B.-E. Kim, T. Nevitt, D. J. Thiele, *Nature Chem. Biol.* **2008**, *4*, 176-185. (b) J. C. Lee, H. B. Gray, J. R. Winkler, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 6898.

⁴ I. A. Koval, P. Gamez, C. Belle, K. Selmeçzi, J. Reedijk, *Chem. Soc. Rev.* **2006**, *35*, 814-840.

⁵ D. Maiti, H. R. Lucas, A. A. N. Sarjeant, K. D. Karlin, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 6998-6999.

cromogénicas de Cu^{2+} ; dentro de las sondas cromogénicas existen varios ejemplos, algunos utilizan moléculas sencillas y otros están basados en sistemas más complejos que incluyen nanotubos de carbono o ADN funcionalizados.⁶ Por ejemplo, Wu y col.⁷ han descrito un quimiosensor para la detección selectiva de $\text{Cu}(\text{II})$ en disolución acuosa, basado en un mecanismo de formación de quelatos (Esquema 1).



Esquema 1: Sensor químico para la detección de Cu^{2+} en disolución.

La selectividad para Cu^{2+} se ha podido interpretar en base a diferencias geométricas entre los complejos de Cu^{2+} y otros complejos metal-ligando⁸. En disoluciones acuosas estos iones forman generalmente complejos octaédricos. Debido al efecto de Jahn-Teller, las interacciones de las posiciones ecuatoriales son más fuertes que los de las posiciones axiales restantes.⁹ Por lo tanto, los complejos tetracoordinados de Cu^{2+} están generalmente caracterizados por una geometría plano-cuadrada. El catión $\text{Cu}(\text{II})$ exhibe afinidades muy altas para varios ligandos poli-aza, como *ciclen*,¹⁰ aunque otros iones metálicos de transición también pueden presentar afinidades similares.

También existen sistemas sensores que combinan las técnicas de colorimetría y fluorimetría, permitiendo detectar selectivamente distintos iones; por ejemplo, Schmittel y Lin¹¹ han desarrollado un complejo de rutenio con varios sitios activos, que permite detectar la presencia de cationes según sus respuestas de fluorescencia y absorbancia. La

⁶ (a) S. Basurto, O. Riant, D. Moreno, J. Rojo, T. Torroba, *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 4673-4688. (b) J. Liu, Y. Lu, *Chem. Commun.* **2007**, 4872-4874. (c) S. J. Lee, S. S. Lee, J. Y. Lee, J. H. Jung, *Chem. Mater.* **2006**, 18, 4713-4715.

⁷ J.-S. Wu, P.-F. Wang, X.-H. Zhang, S.-K. Wu, *Spectrochim. Acta Part A*, **2006**, 65, 749-752.

⁸ S. Otto, J. B. F. N. Engberts, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 6798-6806.

⁹ A. E. Martell, R. D. Hancock, *Metal Complexes in Aqueous Solutions*, Plenum Press, New York, **1996**.

¹⁰ K. Mutsuo, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1975**, 326.

¹¹ M. Schmittel, H.-W. Lin, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, 46, 893-896.

mayoría de los sensores fluorimétricos¹² para Cu^{2+} son del tipo ON-OFF debido al carácter paramagnético de catión, que actúa como un desactivador de la fluorescencia. Así, Zeng y colaboradores¹³ sintetizaron un polímero funcionalizado con grupos imidazol, que es altamente fluorescente y que, en presencia de Cu^{2+} , pierde la fluorescencia, que a su vez vuelve a recuperarse en presencia de CN^- (Figura 1).

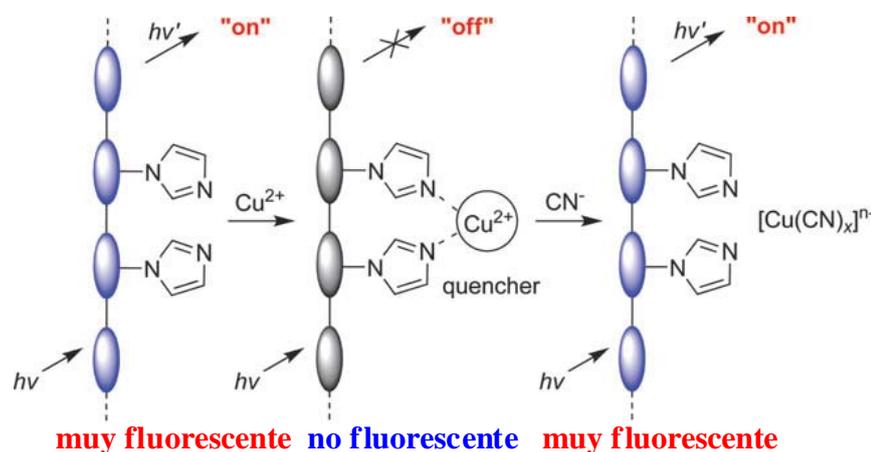


Figura 1

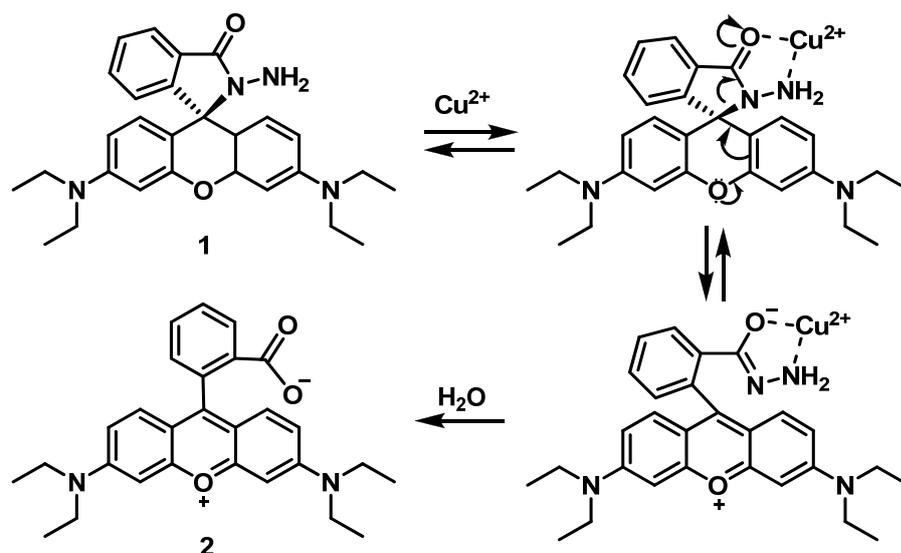
Los ejemplos en los que el proceso de detección ocurre a través de un incremento de la fluorescencia son menos comunes, aunque entre ellos se encuentran algunas de las sondas OFF-ON más interesantes. Se sabe que el Cu(II) promueve la hidrólisis de los ésteres de los α -aminoácidos,¹⁴ lo que ha servido para el diseño de la hidrazina de la rodamina B (**1**). La adición de Cu(II) a una disolución incolora de la hidrazina da lugar a la aparición de la fluorescencia característica de la rodamina B (**2**) como consecuencia de la hidrólisis redox del compuesto de partida (Esquema 2).¹⁵

¹² (a) J. Xie, M. Ménand, S. Maisonneuve, R. Métivier, *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 5980-5985. (b) S. M. Park, M. H. Kim, J.-I. Choe, K. T. No, S.-K. Chang, *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 3550-3553. (c) Z. Guo, W. Zhu, L. Shen, H. Tian, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, 46, 5549-5553. (d) S. J. Lee, S. S. Lee, M. S. Lah, J.-M. Hong, J. H. Jung, *Chem. Commun.* **2006**, 4539-4541. (e) S. H. Kim, J. S. Kim, S. M. Park, S.-K. Chang, *Org. Lett.* **2006**, 8, 371-374.

¹³ Q. Zeng, P. Cai, Z. Li, J. Qin, B. Z. Tang, *Chem. Commun.* **2008**, 1094-1096.

¹⁴ (a) H. Kroll, *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, 74, 2034; (b) M. L. Bender, B. W. Turnquist, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, 79, 1889.

¹⁵ V. Dujols, F. Ford, A. W. Czarnik, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 7386-7387.



Esquema 2: Sensor de Cu(II) basado en la hidrazina de la Rhodamina B.

En cambio, el compuesto **3** (Figura 2) es un quimiosensor fluorescente específico para Cu⁺, aun en presencia de Cu²⁺, y permite la detección de este catión en medios biológicos, por lo que puede constituir una importante herramienta en el estudio de la oxidación biológica del cobre en sistemas vivos.¹⁶

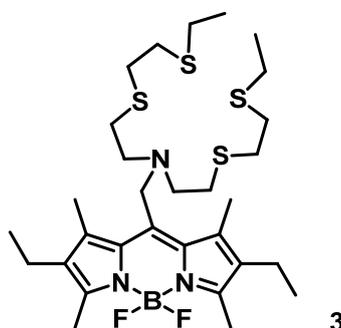
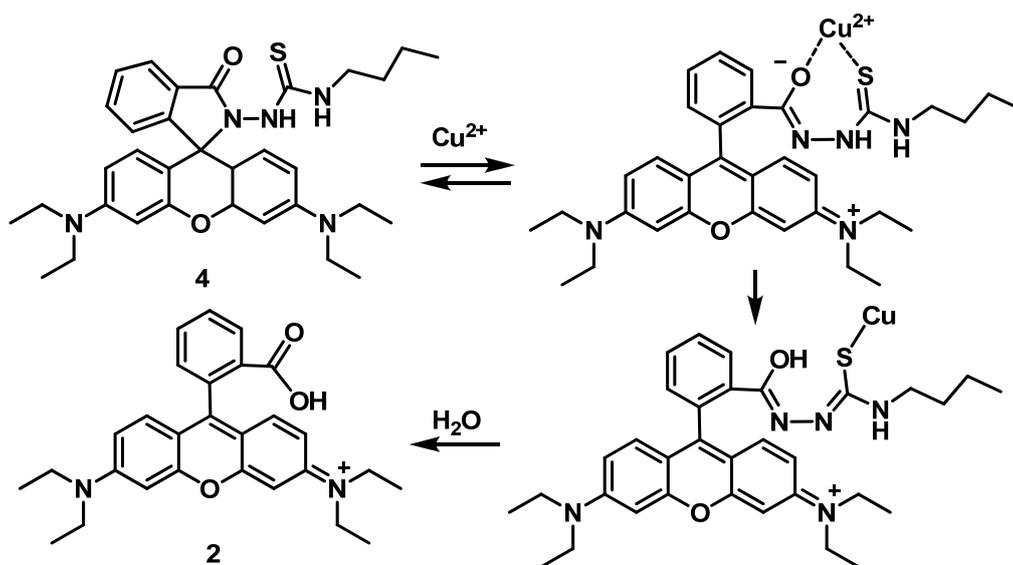


Figura 2: Sensor cromogénico fluorescente para la detección de Cu(I).

¹⁶ L. Zeng, E. W. Millar, A. Pralle, E. Y. Isacoff, C. J. Chang, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 10-11.

Yu y col.¹⁷ sintetizaron una sonda derivada de la rodamina B (4), que contiene un grupo tiourea altamente rico en electrones, que es capaz de detectar Cu²⁺ en medios acuosos con sensibilidad alta. En este caso, el ión Cu²⁺ promueve la ruptura del anillo mediante coordinación inicial, seguida de una reacción de reducción y una hidrólisis posterior para formar el producto final, la rodamina B fluorescente (2) (Esquema 3).



En otro ejemplo, P. Molina y col.¹⁸ utilizaron un azadieno selectivo de Cu²⁺ (5) que es capaz de dar respuesta colorimétrica y fluorimétrica (Figura 3).

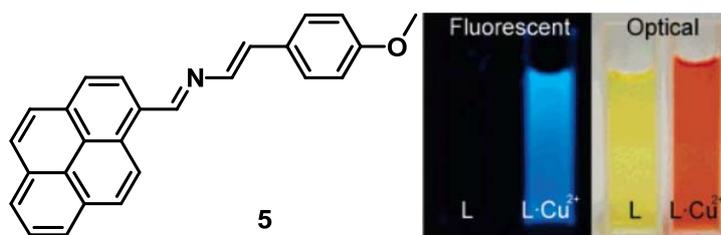


Figura 3

¹⁷ M. Yu, M. Shi, Z. Chen, F. Li, X. Li, Y. Gao, J. Xu, H. Yang, Z. Zhou, T. Yi, C. Huang, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 6892-6900.

¹⁸ R. Martínez, F. Zapata, A. Caballero, A. Espinosa, A. Tárraga, P. Molina, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 3235-3238.

RESULTADOS EXPERIMENTALES:

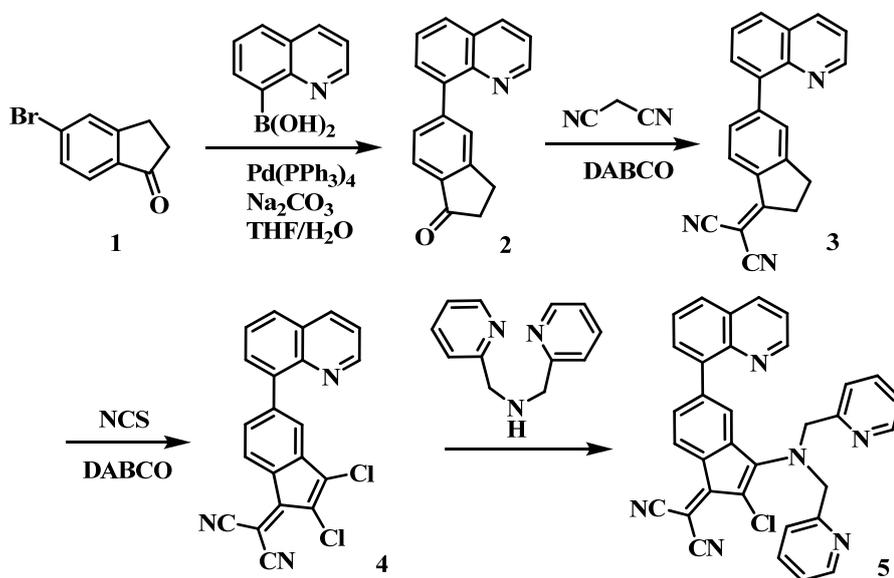
En todos los casos descritos en la bibliografía precedente, los principales problemas son las interferencias con otros metales y la reducción de la eficacia en presencia de agua, por lo que la preparación de nuevas sondas fluorogénicas para catión cobre(II) es necesaria si se quiere alcanzar selectividad en la detección. Previamente, el grupo de trabajo ha estudiado la reactividad del 5-bromo-1-(dicianometilen)-2,3-dicloroindeno, así como la obtención, a partir de dicho compuesto, de nuevos derivados que presentan comportamiento como sensores químicos¹⁹. Además de buscar una buena selectividad frente aniones y cationes en disolventes orgánicos apróticos, como MeCN ó DMSO, y en disolventes próticos como el metanol o etanol, también se necesita una buena selectividad y sensibilidad en medios acuosos o parcialmente acuosos, por lo que en este caso se han utilizado los conocimientos previos para la obtención de una sonda específica de cobre(II). Así, se ha diseñado y sintetizado un dicianometileno-indeno que incluye en su estructura un grupo quinolina y un grupo 2,2'-dipicolilamina en que la coordinación del ión metálico puede tener gran incidencia en la conjugación del cromóforo potencialmente fluorescente. Esto es debido a que el cromóforo posee una estructura con grupos donadores y aceptores de electrones que están conjugados entre sí.

Siguiendo el diseño indicado, se ha sintetizado el derivado de dicianometileno indeno con la estructura de 2,3-dicloro-1-dicianometilen-5-(8-quinolinil)indeno **5**, a partir de una reacción de acoplamiento tipo Suzuki²⁰ entre la 5-bromoindanona **1** y el ácido quinolin-8-ilborónico, obteniéndose la cetona **2** con un rendimiento del 98%. Posteriormente, la condensación de Knoevenagel de **2** con malononitrilo y DABCO en benzeno dio lugar al indeno **3** (66%). Después se realizó la cloración en las posiciones 2 y 3 con *N*-clorosuccinimida y diazabicyclo[2.2.2]octano (DABCO) en diclorometano para obtener el dicloroindeno **4** que se hizo reaccionar con 2,2'-dipicolilamina en

¹⁹ S. Basurto, D. Miguel, D. Moreno, A. G. Neo, R. Quesada, T. Torroba. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 552-558

²⁰ (a) N. Miyaura, A. Suzuki. *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 2457-2483. (b) A. Suzuki. *J. Organomet. Chem.* **1999**, 147-168.

diclorometano a través de una reacción de sustitución nucleófila²¹ selectiva sobre la posición 3 del compuesto diclorado, obteniéndose así el compuesto deseado **5** (Esquema 4). Todos los compuestos obtenidos han sido caracterizados mediante las técnicas espectroscópicas y analíticas más usuales.



Esquema 4

ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES DE **5** COMO SENSOR QUÍMICO.

El compuesto obtenido **5** posee una subunidad aceptora de electrones (CN) y otra donadora de electrones (NR₂) en su estructura. Estos sistemas, que poseen un grupo electrón aceptor y un grupo electrón dador conjugados a través de un sistema electrónico π , se caracterizan generalmente porque, tras la excitación electrónica, presentan una banda de transferencia de carga (PCT), desde la amina (grupo dador), hasta el grupo dicianometileno (grupo aceptor).

Una disolución de concentración 10⁻⁴ M del compuesto **5** en MeCN presenta un intenso color púrpura ($\lambda_{\max} = 545 \text{ nm}$, $\varepsilon = 5893 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y $\lambda_{\max} = 393 \text{ nm}$, $\varepsilon = 12700 \text{ M}^{-1}$

²¹ J.P. Wolfe, S. Wagaw, J.F. Marcoux, S.L. Buchwald, *Acc. Chem. Res.*, **1998**, *31*, 805-818.

cm⁻¹), adecuada para su estudio como sensor químico. Se realizó un estudio cualitativo con una serie de cationes comunes sobre una disolución 10⁻⁴ M de **5** en agua-acetonitrilo 1:1, comprobándose que se producía un cambio selectivo al añadir 2 equivalentes de Cu²⁺ frente el resto.



5 Ag⁺ Ni²⁺ Sn²⁺ Cd²⁺ Zn²⁺ Pb²⁺ Cu²⁺ Fe³⁺ Sc³⁺ Al³⁺ Hg²⁺

Figura 4: Respuesta de una disolución 10⁻⁴M del ligando **5** en CH₃CN:H₂O 1:1 + 2equivalentes de cada catión. De izquierda a derecha: ref, Ag⁺, Ni²⁺, Sn²⁺, Cd²⁺, Zn²⁺, Pb²⁺, Cu²⁺, Fe³⁺, Sc³⁺, Al³⁺ y Hg²⁺

Al añadirse más de 5 equivalentes de cada uno de los cationes se apreció una ligera pérdida de color en aquellos que contienen Fe³⁺ y Hg²⁺, si bien, en estos casos, no se apreciaba un cambio en la fluorescencia. Las pruebas de interferencia realizadas indicaron un comportamiento muy selectivo de la sonda estudiada, según los resultados la presencia de otros analitos en la disolución no afectaba a la detección de Cu²⁺ (Figura 5).



Figura 5: Izquierda: 1: Referencia **5**, 10⁻⁴ M in MeCN/H₂O 1:1, 2: Ref. **5** + 1 eq Cu²⁺, 3: Ref. **5** + Ag⁺, Ni²⁺, Sn²⁺, Cd²⁺, Zn²⁺, Pb²⁺, Sc³⁺ y Al³⁺, 4: **3** + Fe³⁺, 5: **4** + Hg²⁺, 6: **5** + Hg²⁺. **Derecha:** 1: Referencia **5** de la figura izquierda. 2: Ref. **5** + 1 eq Cu²⁺. 3, 4, 5, 6: Son, respectivamente, los correspondientes a la figura izquierda + 1 eq Cu²⁺.

Se realizaron valoraciones tanto en UV-vis como en fluorescencia añadiendo Cu²⁺ (en H₂O) sobre una disolución de ligando **5** 10⁻⁴ M MeCN/H₂O 1:1. En la valoración a través de medidas UV-Vis se observó una disminución de la λ_{max} de absorción centrada en

550 nm a medida que se añade Cu^{2+} , formándose al mismo tiempo un punto isobéptico a 490 nm:

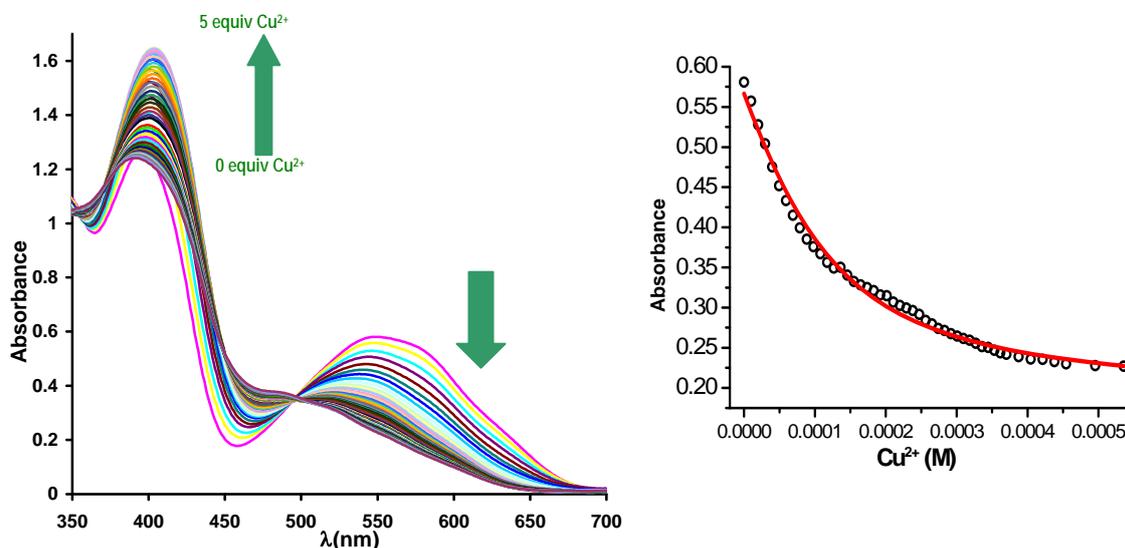


Figura 6: Izquierda: Espectros de absorción para la valoración del ligando **5** (10^{-4} M en MeCN/H₂O 1:1) con Cu^{2+} (en H₂O). Derecha: Ajustes para el cálculo de la constante de formación 1:1 ($\lambda_{\text{máxima absorción}} = 550$ nm) con Cu^{2+} .

El ajuste obtenido indica que el modelo de coordinación se corresponde con uno del tipo 1:1, con un valor para la constante de asociación: $\text{Log } K = 4.23 \pm 0.04$

El análisis de Job's Plot llevado a cabo con medidas en espectroscopía de absorción confirmó el modelo propuesto ya que los resultados presentaron un máximo de la curva al 50% de fracción molar. Por otra parte, se calculó el límite de detección de una disolución 10^{-4} M en MeCN/H₂O 1:1 de **5** que, calculado por el método de la variabilidad del blanco,²² fue de $4.17 \cdot 10^{-7}$ M.

²² D. L. Massart, B. G. M. Vandeginste, L. M. C. Buydens, S. De Jong, P. J. Lewi, J. Smeyers-Verbeke, "Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A", Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 1997, Chapt. 13, 379.

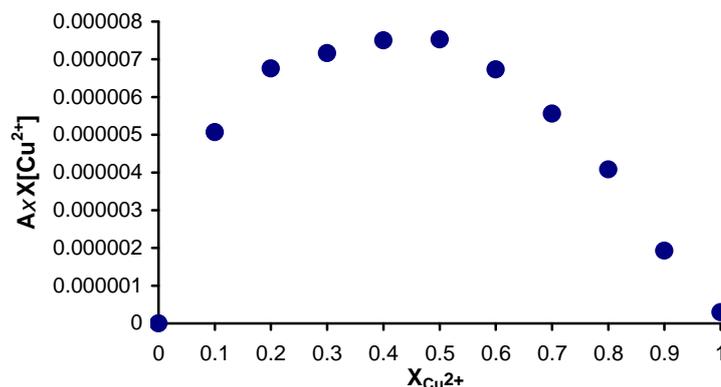


Figura 7: Análisis de Job's Plot del producto **5** (10^{-4} M en MeCN/H₂O 1:1) con Cu²⁺ (en H₂O).
 $(\lambda_{\text{máxima absorción}} = 550 \text{ nm})$

Se completó el estudio de las medidas en UV-visible realizando valoraciones en otras condiciones, por ejemplo en un medio con menor proporción de agua: MeCN/H₂O 7:3:

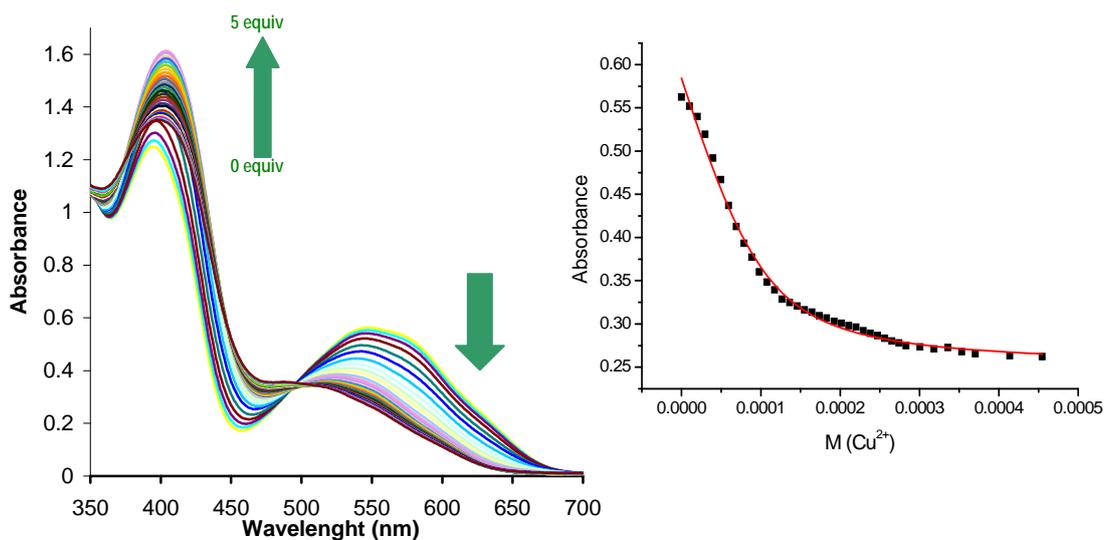


Figura 8: Izquierda: Espectro de absorción para la valoración del ligando **5** (10^{-4} M en MeCN/H₂O 7:3) con Cu²⁺ (H₂O). **Derecha:** Ajustes para el cálculo de las constantes de formación 1:1
 $(\lambda_{\text{máxima absorción}} = 550 \text{ nm})$ con Cu²⁺

El ajuste obtenido indica que el modelo de coordinación corresponde con uno del tipo 1:1, con un valor para la constante de asociación: $\text{Log } K = 4.73 \pm 0.04$

Como pudo apreciarse en las pruebas cuantitativas realizadas, la presencia de otros analitos en la disolución no afectaba de un modo significativo a la sensibilidad de 5 por Cu^{2+} , en la valoración realizada con una disolución de 5 (10^{-4}M en $\text{MeCN}/\text{H}_2\text{O}$ 1:1) con 2 equivalentes de cada uno del resto de cationes:

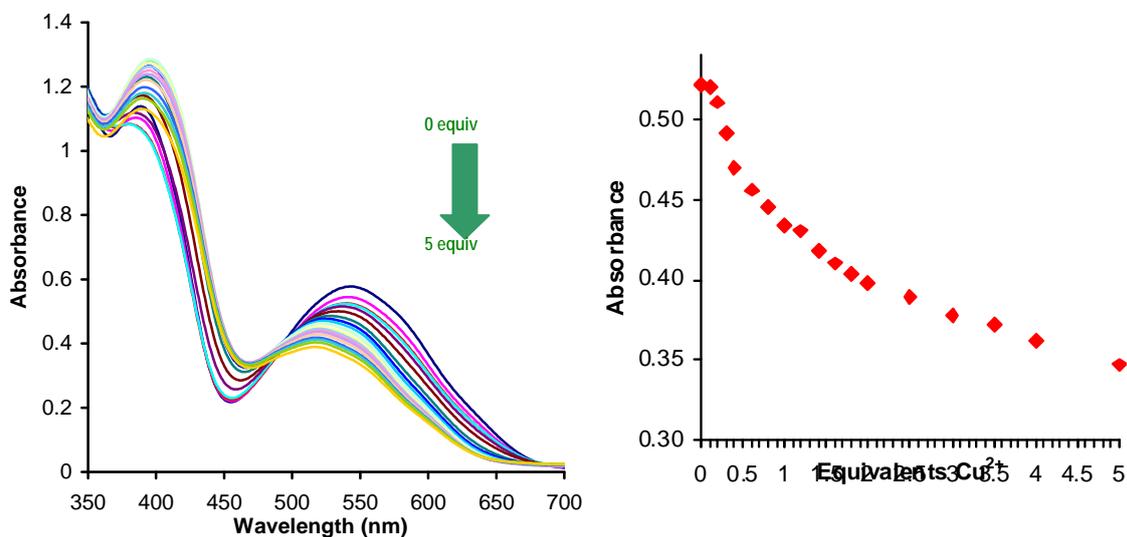


Figura 9: Izquierda: Espectro de absorción para la valoración del ligando 5 (10^{-4}M en $\text{MeCN}/\text{H}_2\text{O}$ 1:1 + Ag^+ , Ni^{2+} , Sn^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} , Sc^{3+} y Al^{3+}) con Cu^{2+} (en H_2O). **Derecha:** Representación de la disminución de absorbancia a lo largo de la valoración ($\lambda_{\text{máxima absorción}} = 545\text{ nm}$) con Cu^{2+}

Existen dos casos en los que sí que se observaba una disminución del color de la disolución original, esto se producía en presencia de Fe^{3+} y Hg^{2+} , las valoraciones con ambos cationes y los posteriores ajustes ofrecieron valores inferiores a los que se obtenían en cualquiera de los casos con Cu^{2+} .

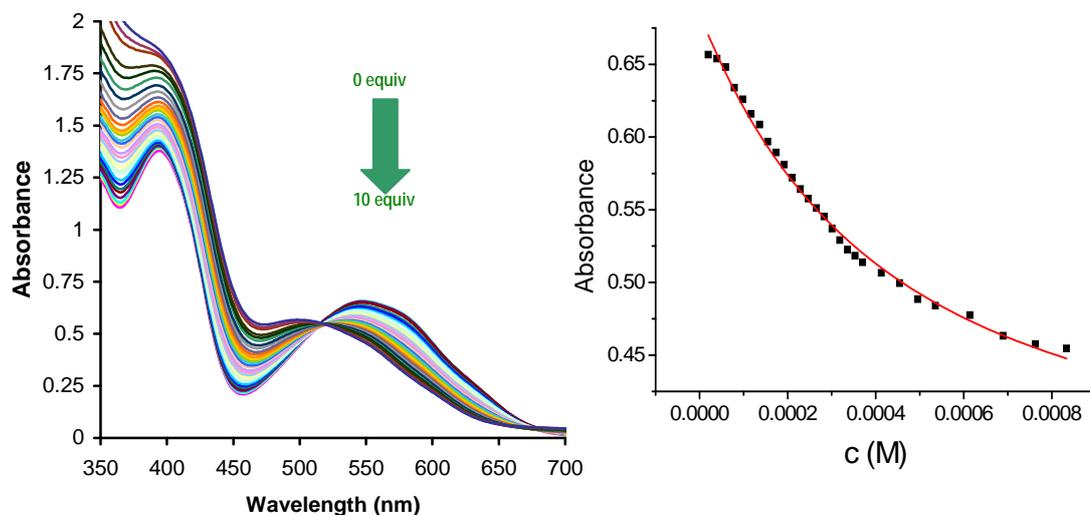


Figura 10: **Izquierda:** Espectro de absorción para la valoración del ligando **5** (10⁻⁴ M en MeCN/H₂O 1:1) con Fe³⁺ (H₂O). **Derecha:** Ajustes para el cálculo de la constantes de formación 1:1 ($\lambda_{\text{máxima absorción}} = 550 \text{ nm}$) con Fe³⁺

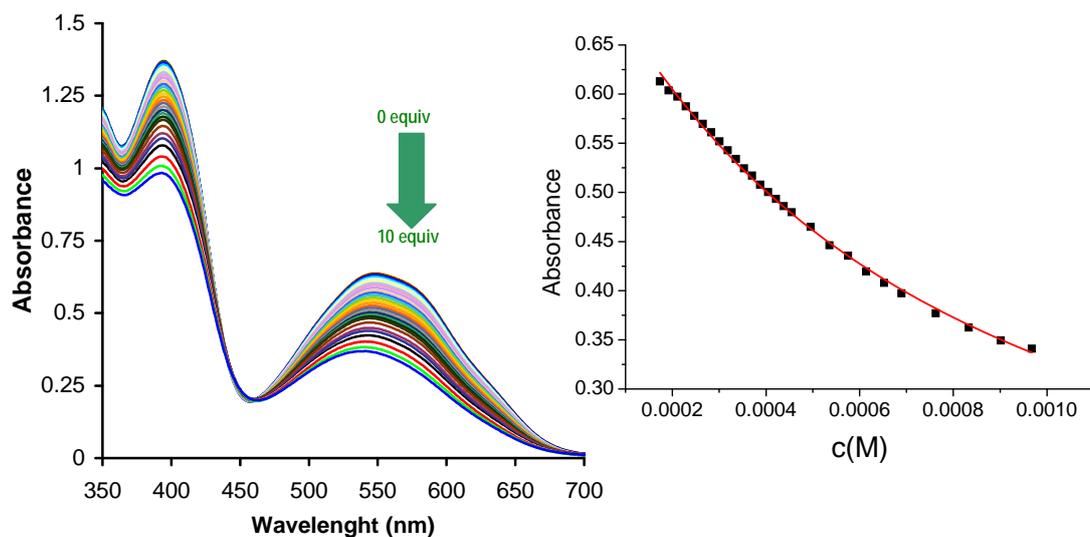


Figura 11: **Izquierda:** Espectro de absorción para la valoración del ligando **5** (10⁻⁴ M en MeCN/H₂O 1:1) con Hg²⁺ (H₂O). **Derecha:** Ajustes para el cálculo de la constantes de formación 1:1 ($\lambda_{\text{máxima absorción}} = 550 \text{ nm}$) con Hg²⁺

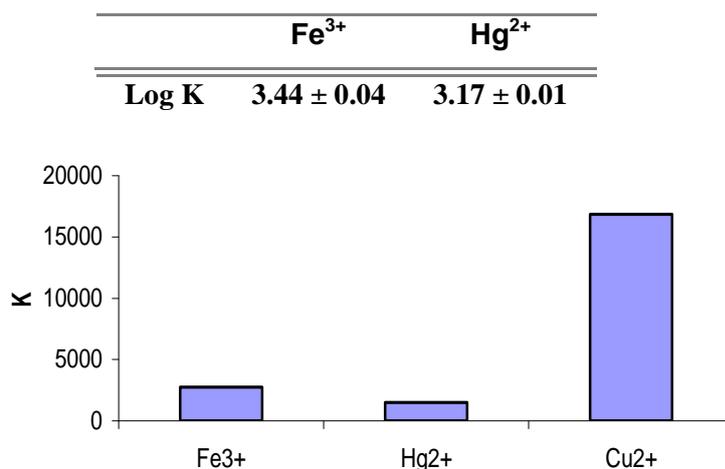


Figura 12: Constantes de formación (1:1) de las valoraciones de **5** (10^{-4} M en MeCN/ H_2O 1:1) con Cu^{2+} , Fe^{3+} , Hg^{2+} .

ESTUDIO CUANTITATIVO MEDIANTE FLUORESCENCIA.

Tal como se explicó, al añadir dos equivalentes de Cu^{2+} sobre una disolución de **5** (10^{-4} M en MeCN/ H_2O 1:1) se observó que se producía un cambio en el color de la disolución original, pasando la misma de morado a naranja. Al colocar esa misma disolución bajo una lámpara ultravioleta a la $\lambda_{\text{exc}} = 366$ nm, se observó un aumento de la fluorescencia en la disolución que contenía Cu^{2+} . Se observó también que el aumento era mayor si el ensayo se realizaba con una disolución de **5** (10^{-4} M en MeCN) en ausencia de agua.

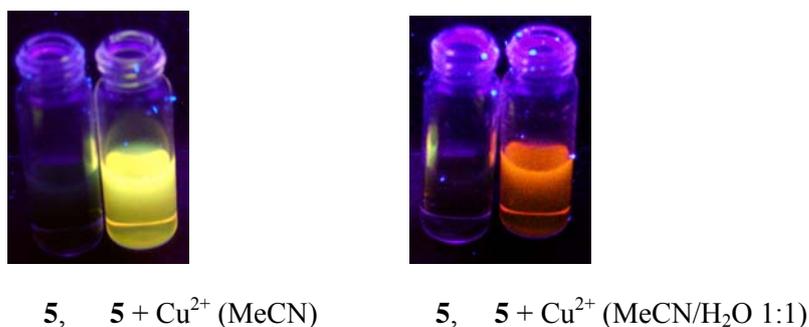


Figura 13: Cambios de fluorescencia de una disolución de **5** (10^{-4} M en MeCN) (izquierda) y (10^{-4} M en MeCN/ H_2O 1:1) (derecha) al añadir 2 equivalentes de Cu^{2+} ($\lambda_{\text{exc}} = 366$ nm)

VALORACIONES FLUORIMÉTRICAS

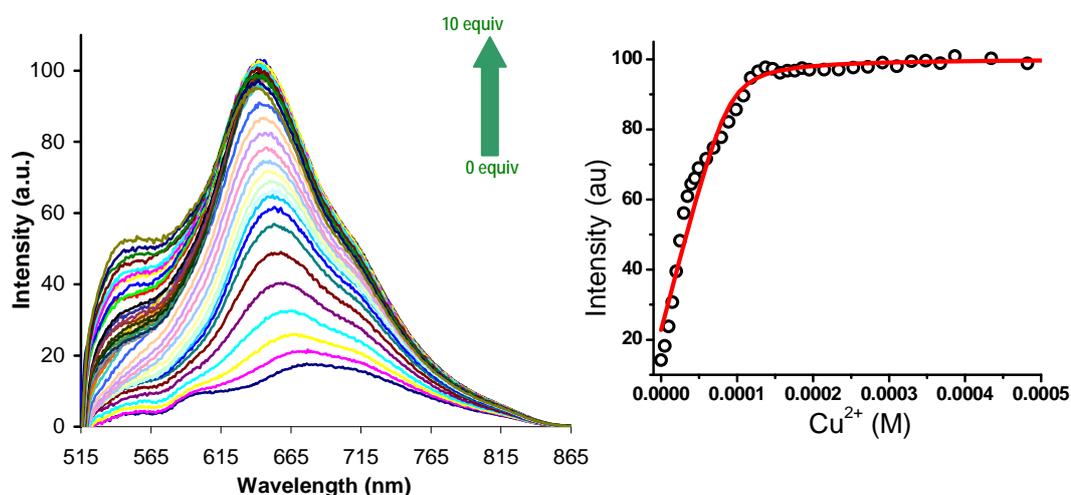


Figura 14: *Izquierda:* Espectros de emisión para la valoración fluorimétrica del ligando **5** (10^{-4} M en MeCN) con Cu^{2+} (MeCN) ($\lambda_{\text{excitación}} = 490$ nm). *Derecha:* Ajustes para el cálculo de la constante de formación complejo 1:1 ($\lambda_{\text{máxima}} = 650$ nm)

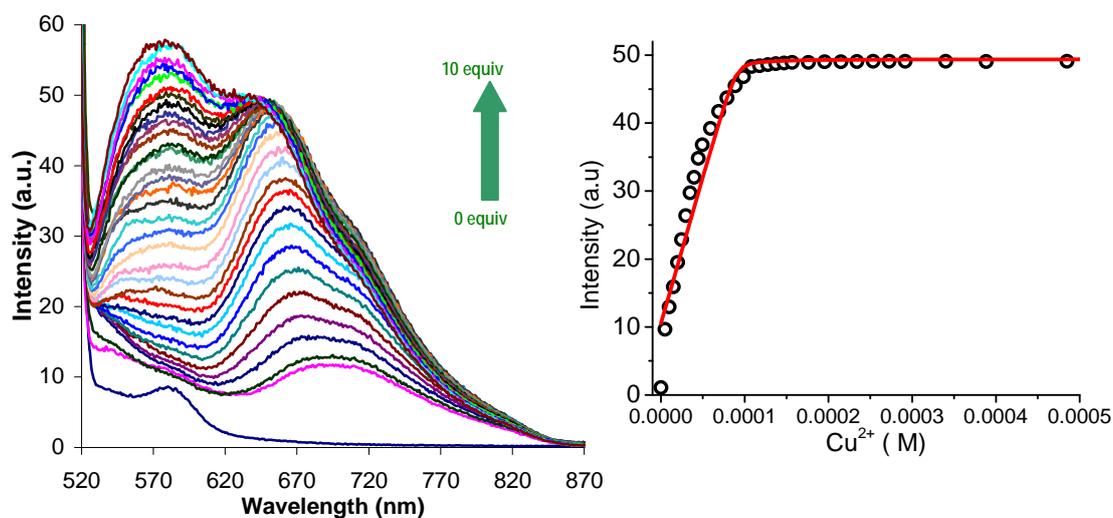


Figura 15: *Izquierda:* Espectro de emisión para la valoración fluorimétrica del ligando **5** (10^{-4} M en MeCN/H₂O 1:1) con Cu^{2+} (MeCN) ($\lambda_{\text{excitación}} = 495$ nm). *Derecha:* Ajustes para el cálculo de la constante de formación complejo 1:1 ($\lambda_{\text{máxima}} = 650$ nm)

Las valoraciones fluorimétricas realizadas mostraron un aumento de la banda de emisión correspondiente al color final observado ($\lambda_{\text{máxima}} = 650 \text{ nm}$), y los ajustes realizados a modelos no lineales dieron como resultado ajustes tipo 1:1 en ambos casos:

	5 + Cu²⁺	5 + Cu²⁺
	(MeCN)	(MeCN/H₂O 1:1)
Log K	5.48 ± 0.15	6.48 ± 0.48

Las constantes de asociación calculadas para cada caso son las mostradas en la tabla anterior, resultando ser más alta en el caso en el que la valoración se realiza en presencia de agua. El límite de detección en fluorescencia de una disolución 10^{-4} M en MeCN/H₂O 1:1 de **5**, calculado por el método de la variabilidad del blanco, dio un valor de $4.08 \cdot 10^{-8} \text{ M}$. A su vez, el rendimiento cuántico para el complejo formado en MeCN dio un valor de $\Phi = 0.034$.

VALORACIONES EN RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE PROTÓN

Con el fin de averiguar qué grupos se ven más afectados por la coordinación del catión, se llevaron a cabo dos valoraciones del compuesto **5** con Cu²⁺ mediante RMN ¹H, una en CD₃CN y otra en CD₃CN:D₂O (9:1).

El espectro inicial presenta un singlete a 5.2 ppm, correspondiente a los grupos metilenos de la picolina. En la zona aromática, se distingue la señal del protón más próximo al nitrógeno quinolínico, a 8.7 ppm, y los protones más cercanos al nitrógeno piridínico, a 8.5 ppm. Los demás protones aromáticos, tanto los de la quinolina, como los de las piridinas se encuentran entre 7 y 8 ppm.

El resultado de la valoración del compuesto **5** con Cu²⁺ en CD₃CN, se muestra en la siguiente figura.

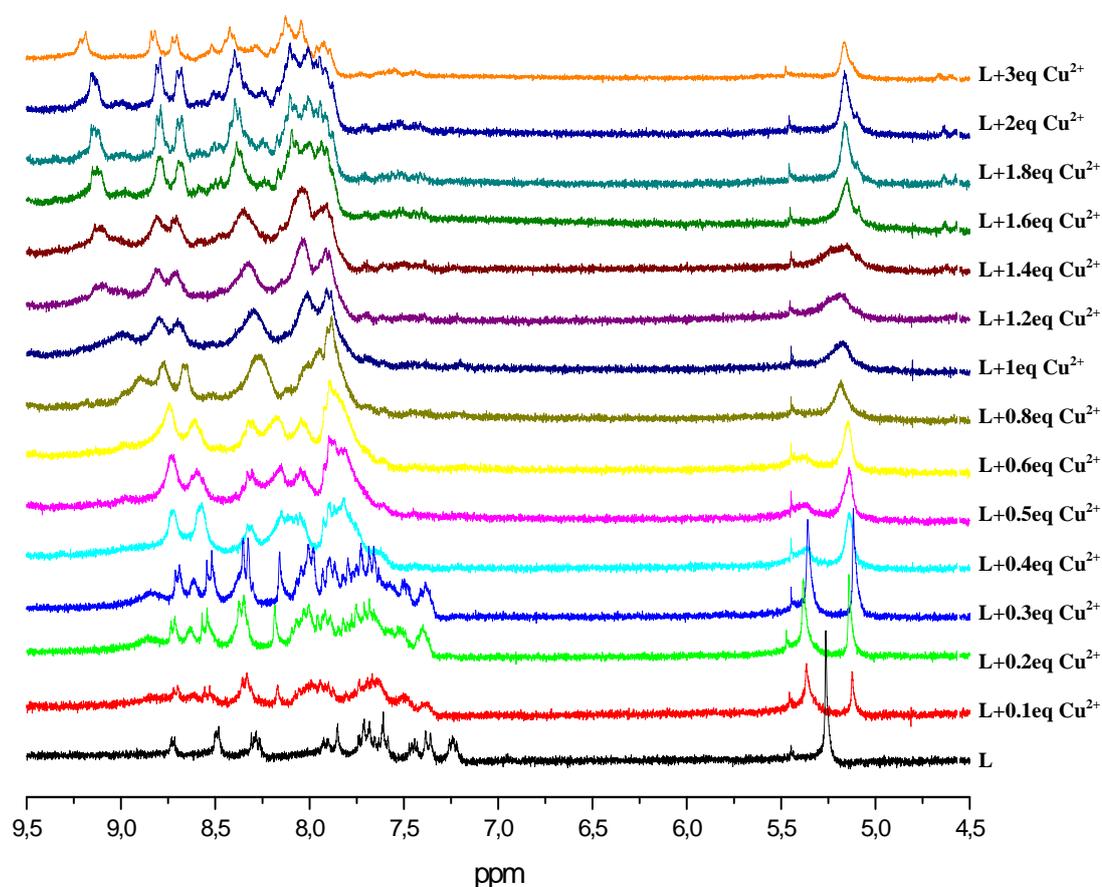


Figura 16: Evolución del espectro de RMN ^1H , (CD_3CN , 25°C) del compuesto **5** frente a cantidades crecientes de Cu^{2+}

En presencia de cantidades crecientes del ión se observa claramente que, al añadir 0.1 equivalentes de Cu^{2+} , la señal a 5.2 ppm, correspondiente a los grupos metileno de la picolina, se desdobra en dos señales, la primera a 5.3 ppm y la segunda a 5.1 ppm, que a medida que se va añadiendo más Cu^{2+} , la primera señal formada acaba desapareciendo cuando se han añadido 0.6 equivalentes, quedando únicamente la segunda señal formada. Esto parece indicar que la complejación con el cobre se realiza a través de los nitrógenos de la picolina y no por el nitrógeno de la quinolina. Asimismo las señales aromáticas se desplazan hacia campos más bajos (hacia la izquierda), es decir, los protones aromáticos, tanto los de la quinolina como los de las piridinas, están menos apantallados a medida que

aumenta la cantidad de Cu^{2+} . Desde 0.4 equivalentes de Cu^{2+} hasta 1.4 equivalentes todas las señales se ensanchan mucho, no distinguiéndose las diferentes multiplicidades; a partir de 1.4 equivalentes las señales se van estrechando y se van apreciando las nuevas señales creadas al formarse el complejo. Esto parece indicar que desde 0.1 equivalentes de cobre añadidos hasta 0.6 equivalentes, en el sistema existen dos especies en equilibrio, puesto que existen las dos señales en la zona 5-5.5 ppm. A partir de 0.6 equivalentes, solo existe una especie en el sistema.

Los resultados de la segunda valoración, con compuesto **5** disuelto en $\text{CD}_3\text{CN}:\text{D}_2\text{O}$ (9:1), se muestran a continuación.

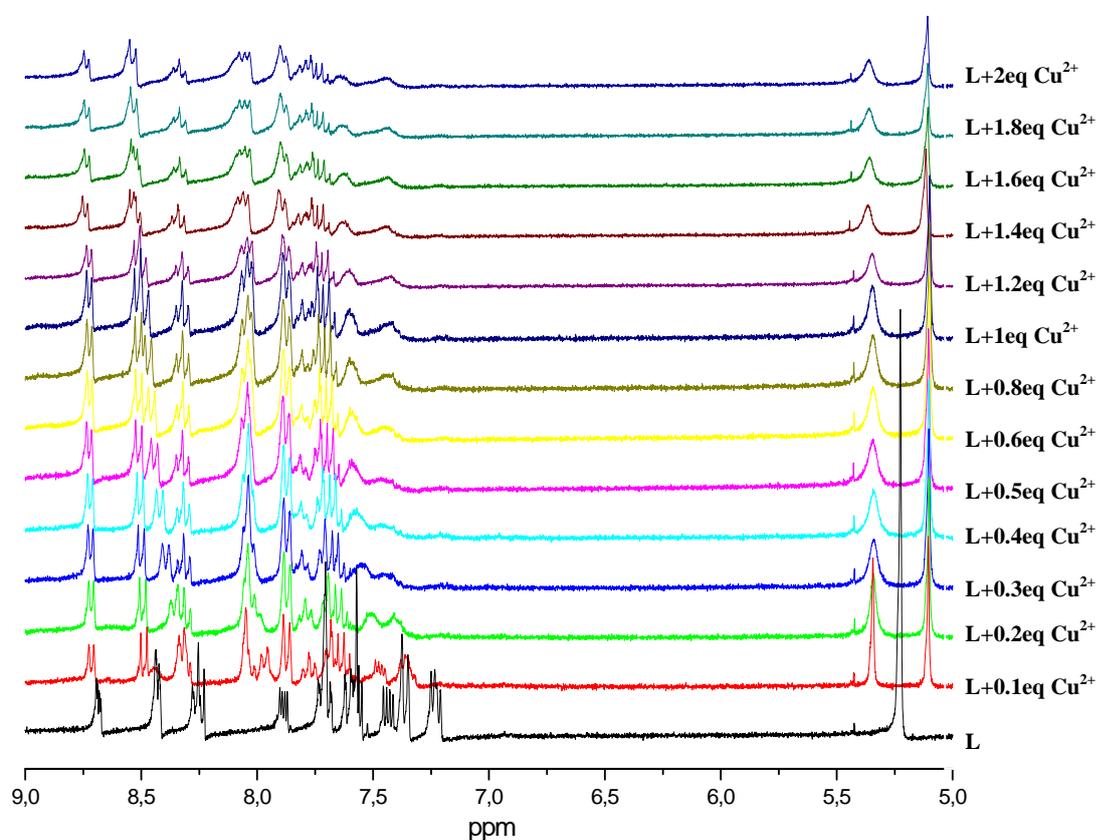


Figura 17: Evolución del espectro de RMN ^1H , [$\text{CD}_3\text{CN}:\text{D}_2\text{O}$ (9:1), 25°C] del compuesto **5** frente a cantidades crecientes de Cu^{2+}

Al igual que en la valoración anterior, la señal correspondiente a los metilenos de la picolina a 5.2 ppm se desdobra en dos señales al añadir 0.1 equivalentes de cobre, una a 5.1 ppm y otra a 5.3 ppm, pero a diferencia de la anterior, esas dos señales se mantienen durante toda la valoración. En cuanto a la zona aromática, todas las señales se desplazan levemente hacia la derecha (campos más bajos o protones menos apantallados). Como en el caso anterior, la complejación se establece por los nitrógenos piridínicos, aunque en este caso no se llega a una única señal en la zona de 5-5.5 ppm, como ocurría en la valoración anterior. En general, los resultados mostrados mediante valoración en RMN de protón son compatibles con los resultados obtenidos mediante UV-Vis y fluorescencia, especialmente en los efectos de la ausencia o presencia de agua en el medio. Los resultados indican que, probablemente, se forma un complejo 1:1 en que el Cu^{2+} interrumpe la conjugación de los grupos ciano y amina, causando un desplazamiento hipsocrómico de la absorción de la banda principal y, al mismo tiempo, inhibiendo el amortiguamiento de la fluorescencia debido al grupo amino, dando lugar a la aparición de fluorescencia de la parte no complejada de la molécula. De hecho, el compuesto **3** es un sólido fluorescente amarillo bajo la lámpara ultravioleta de 366 nm. La figura 18 muestra el complejo formado y la parte de la estructura implicada en la emisión de fluorescencia.

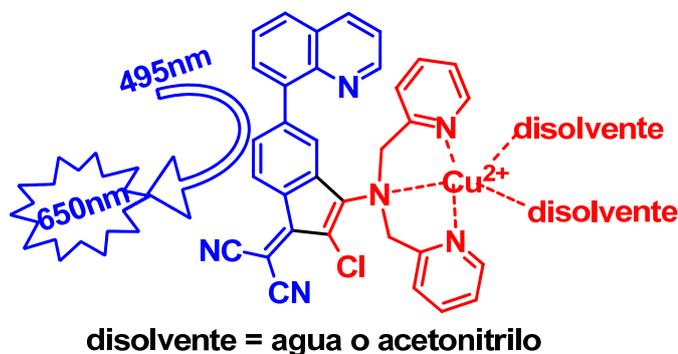


Figura 18

Para comprobar que el catión cobre no puede complejarse con la quinolina se han realizado algunos modelos moleculares sencillos mediante el programa HyperChem. El complejo más estable, que muestra menos tensiones de enlace, se muestra en la figura siguiente. En dicho complejo puede verse que el catión cobre(II) complejado en la unidad de

dipicolilamina no tiene posibilidad de cercanía con la unidad de quinolina, por lo que no tiene posibilidad de perturbar la fluorescencia debida al anillo de quinolina.

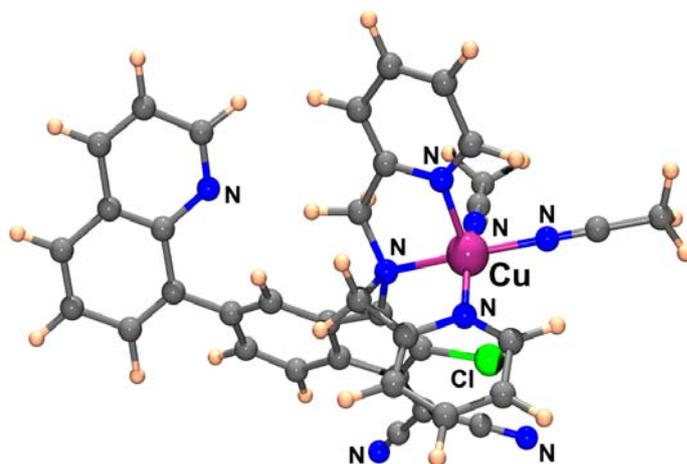


Figura 19

CONCLUSIONES:

De los resultados experimentales obtenidos en este capítulo se pueden sacar una serie de conclusiones tales como:

Se ha puesto a punto una nueva sonda cromogénica y fluorogénica OFF-ON para la detección a simple vista de catión cobre(II) en mezclas de acetonitrilo-agua, en condiciones de selectividad completa y sensibilidad nanomolar.

Esta sonda puede ser útil para la detección de cobre(II) en muestras de origen medioambiental en el rango de las cantidades traza ($\mu\text{g l}^{-1}$), requeridas por los organismos vivos, mediante espectroscopía de ultravioleta-visible y fluorescencia.

Una primera comunicación de estos resultados experimentales ha sido ya publicada.²³

²³ E. Ballesteros, D. Moreno, T. Gómez, T. Rodríguez, J. Rojo, M. García-Valverde, T. Torroba, *Org. Lett.*, **2009**, *11*, 1269-1272.

**PARTE III. PREPARACIÓN DE
SONDAS FLUOROGÉNICAS
PARA LA DETECCIÓN DE
AMINOÁCIDOS Y SUS
METABOLITOS**

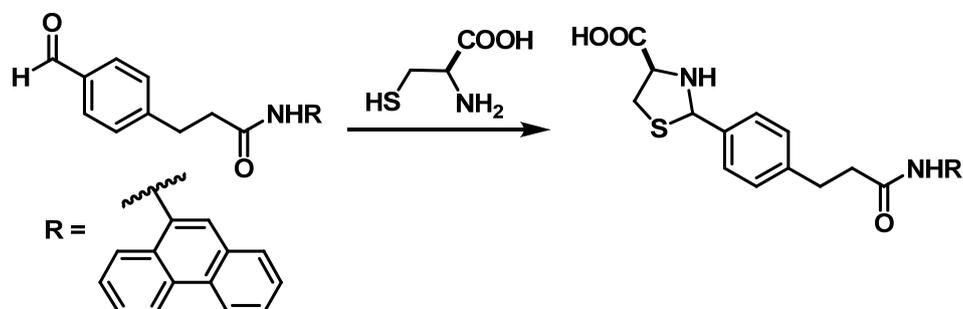
INTRODUCCIÓN Y DISEÑO DE SONDAS FLUOROGÉNICAS

Dentro de los llamados sensores químicos ópticos son poco abundantes los ejemplos que pueden encontrarse de sondas fluorogénicas para el reconocimiento selectivo de aminoácidos y especies neutras, en la mayoría de los casos la detección de este tipo de compuestos va asociada a sistemas más complejos que requieren equipamientos, preparación de muestras y tiempos de espera largos.¹ Una de las familias de aminoácidos más estudiadas es la de aquellos que contienen grupos tiol en su estructura², como por ejemplo la cisteína, si bien es cierto que la mayoría de ejemplos existentes están basados en procesos que incluyen reacciones químicas, como adiciones de Michael o ciclaciones, que generan variaciones en las propiedades fluorescentes de los

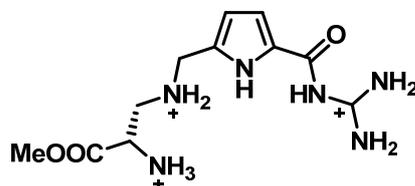
¹ a) L. Pu, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 1687-1716; Lysine: b) D. M. Bailey, A. Hennig, V. D. Uzunova, W. M. Nau, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 6069-6077; c) C. P. Mandl, B. König, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 670-674; Glutamate: d) M. Riskin, R. Tel-Vered, M. Frasconi, N. Yavo, I. Willner, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 7114-7120. e) M. Bonizzoni, L. Fabbrizzi, G. Piovani, A. Taglietti, *Tetrahedron* **2004**, *60*, 11159-11162; Tryptophan: f) L. Yang, S. Qin, X. Su, F. Yang, J. You, C. Hu, R. Xie, J. Lan, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 339-348; g) M. Hariharan, S. C. Karunakaran, D. Ramaiah, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 417-420. h) Y. Ling, W. Wang, A. E. Kaifer, *Chem. Commun.* **2007**, 610-612; Histidine: i) Z. Li, X. Lou, Z. Li, J. Qin, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2009**, *1*, 232-234.

² X. Chen, Y. Zhou, X. Peng, J. Yoon, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 2120-213. Otros ejemplos: b) H.-Y. Shiu, H.-C. Chong, Y.-C. Leung, M.-K. Wong, C.-M. Che, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 3308-3313; c) C. Zhao, K. Qu, Y. Song, C. Xu, J. Ren, X. Qu, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 8147-8154; d) N. Shao, J. Jin, H. Wang, J. Zheng, R. Yang, W. Chan, Z. Abliz, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 725-736; e) M. Zhang, M. Yu, F. Li, M. Zhu, M. Li, Y. Gao, L. Li, Z. Liu, J. Zhang, D. Zhang, T. Yi, C. Huang, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 10322-10323; f) Y. Fu, H. Li, W. Hu, D. Zhu, *Chem. Commun.* **2005**, 3189-3191.

reactivos. Tanaka, Barbas y col. sintetizaron un aldehído fluorogénico³ capaz de reaccionar con cisteína a pH neutro, generando un incremento en la fluorescencia (Esquema 1).



La mezcla de este reactivo con una amplia serie de aminoácidos y otros tioles simples solo presenta actividad cuando se encuentra en contacto con cisteína, formándose la correspondiente tiazolidina fluorescente. En cuanto al resto de aminoácidos, existen algunos ejemplos de sensores específicos de algunos de ellos, como por ejemplo el sistema sintetizado por C. Schmuck y L. Geiger⁴, que se trata de un compuesto tris catiónico capaz de diferenciar entre aspartato y glutamato (Figura 1)



El compuesto tris catiónico se coordina con el glutamato formando un complejo 2:1 estable en disoluciones DMSO:H₂O. En el complejo formado, las interacciones estéricas y electrostáticas generadas al coordinarse con el aspartato son desfavorables debido a la longitud de la cadena alquílica, dando lugar a la selectividad en la detección (Figura 2).

³ F. Tanaka, N. Mase, C. F. Barbas, III, *Chem. Commun.*, **2004**, 1762–1763.

⁴ C. Schmuck, L. Geiger *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10486-10487.

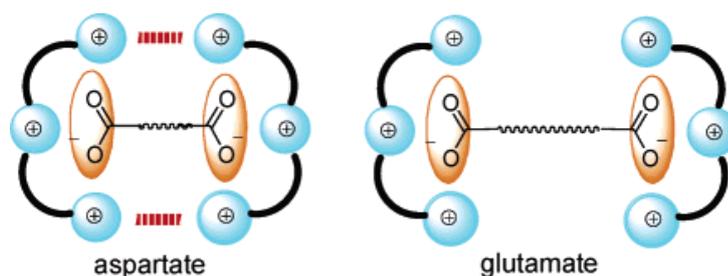


Figura 2

H. Wang, W.-H. Chan y A. W. M. Lee han diseñado estructuras del tipo amidotiureas⁵ sobre estructuras de ácido cítrico, sintetizando esqueletos aptos para el reconocimiento supramolecular (Figura 3 superior). De este modo se han obtenido una serie de productos con interesantes propiedades fluorescentes, capaces de proporcionar múltiples puntos de interacción a través de enlaces de hidrógeno con aminoácidos trifuncionales con grupos ácidos, como la serina, lisina, treonina y tirosina, presentando una gran estereoselectividad (Figura 3 inferior).

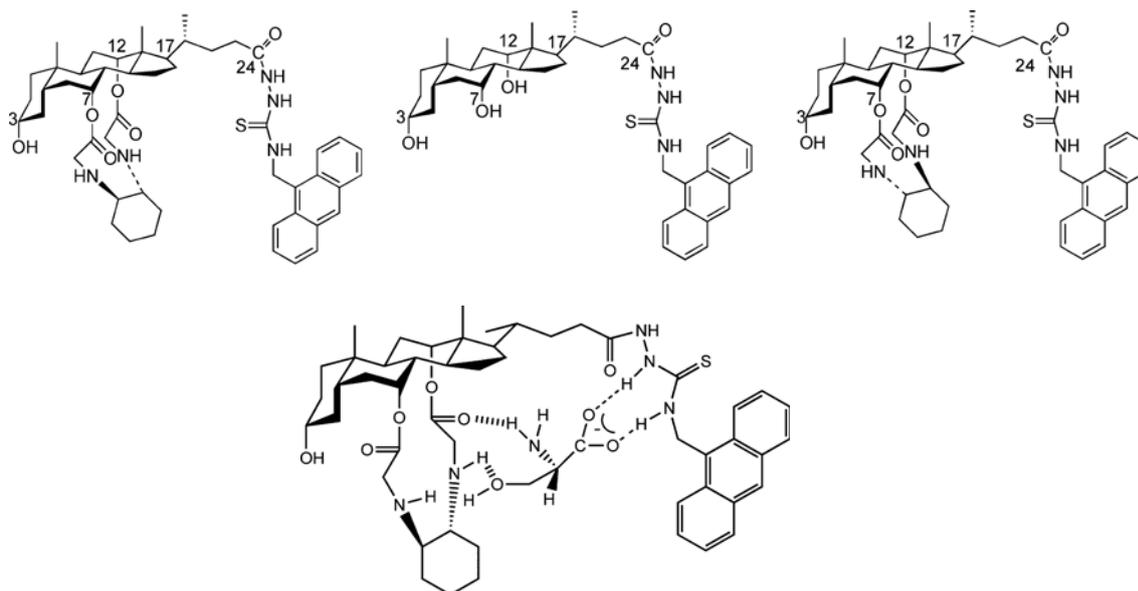


Figura 3: Arriba: Sensores amidotiureas. Abajo: esquema de reconocimiento molecular.

⁵ H. Wang, W.-H. Chan, A. W. M. Lee, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 929–934

El concepto de regla molecular ha sido muy utilizado en biología, tanto para medir las distancias entre grupos de moléculas en procesos dinámicos, como el control de los procesos de transformación de hélice doble a sencilla de las cadenas de ADN⁶, o medir la actividad de la enzima nucleasa⁷. Se han utilizado también reglas moleculares para estudiar las interacciones entre proteínas⁸ y entre los intercalantes de la doble capa lipídica celular.⁹ Sin embargo la utilización en química de materiales ha sido más reducida; algunos casos de reglas moleculares basadas en polímeros han sido utilizadas para investigar la relación entre la distancia y la emisión fluorescente de diversos fluoróforos.¹⁰ Existen algunos ejemplos de moléculas que funcionan como reglas moleculares. M. J. Crossley, P. Thordarson sintetizaron estructuras que han sido utilizadas para asignar de forma inequívoca dos estereoisómeros de bis-porfirinas rígidas de dizinc(II) a través del estudio de las constantes de complejación obtenidas por interacción con α,ω -diaminoalkanes (Figura 4).¹¹

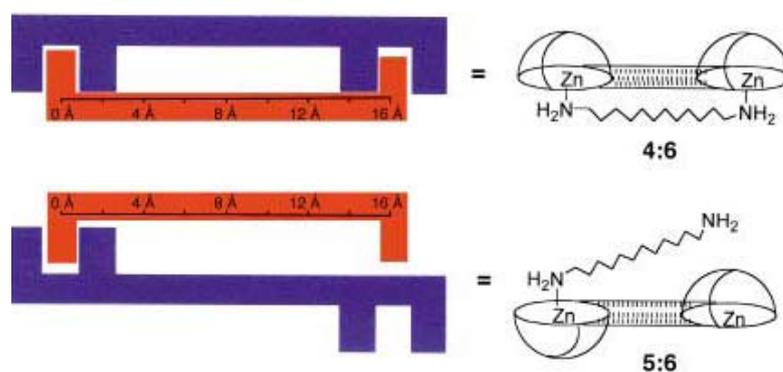


Figura 4: Un ejemplo de regla molecular.

⁶ C. Sönnichsen, B. M. Reinhard, J. Liphardt, A. P. Alivisatos, *Nature Biotech.* **2005**, *23*, 741-745.

⁷ G. L. Liu, Y. Yin, S. Kunchakarra, B. Mukherjee, D. Gerion, S. D. Jett, D. G. Bear, J. W. Gray, A. P. Alivisatos, L. P. Lee, F. F. Chen, *Nature Nanotech.* **2006**, *1*, 47-52.

⁸ a) K. J. Walters, X. Chen, *EMBO J.* **2009**, *28*, 2307-2308; b) R. Sarkar, A. K. Shaw, S. S. Narayanan, F. Dias, A. Monkman, S. K. Pal, *Biophys. Chem.* **2006**, *123*, 40-48.

⁹ Y. Cohen, M. Afri, A. A. Frimer, *Chem. Phys. Lipids* **2008**, *155*, 114-119.

¹⁰ Y. S. Chi, H. R. Byon, B. S. Lee, B. Kong, H. C. Choi, I. S. Choi, *Adv. Funct. Mater.* **2008**, *18*, 3395-3402.

¹¹ M. J. Crossley, P. Thordarson, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1709-1712.

Así, el concepto de regla molecular, en que un receptor clásico se conecta a unidades de indicadores fluorescentes altamente solvatocrómicos, puede ser una aproximación de interés para conseguir la interacción con aminoácidos proteinogénicos, así como con aminoácidos no proteinogénicos, a través de medidas de fluorescencia, buscando la diferenciación entre los distintos aminoácidos y sus metabolitos.

De entre las distintas aproximaciones que se pueden emplear para el diseño de quimiosensores haremos uso de la aproximación de sondas intrínsecas de la que se ha hecho mención en la introducción. Para llevar a cabo un diseño racional de los ligandos es preciso establecer con claridad cuales son las unidades señalizadoras y las unidades complejantes de mayor interés para conseguir una complejación fuerte y selectiva y una transducción eficaz y fácil de detectar.

Teniendo en cuenta estas premisas el primer punto a establecer es cuales son los analitos a estudiar ya que en función de sus características se llevará a cabo la elección de las unidades complejantes de mayor interés. Entre todos las posibles moléculas biológicas de interés, nuestra atención se ha centrado en la detección de aminoácidos, de entre ellos especialmente alfa aminoácidos con grupos amina y amida terminales, beta aminoácidos y ω -aminoácidos terminales de cadena larga que tienen importancia en algunos procesos fisiológicos. Con estos objetivos, las unidades complejantes que se incluirán en los quimiosensores serán ureas y amidas para el reconocimiento de carboxilatos. Las unidades de urea han sido muy estudiadas en el reconocimiento colorimétrico selectivo de aniones carboxilato y fosfato, especialmente, aunque también se conocen receptores que contienen en su estructura varias unidades de urea, que han resultado especialmente útiles en la detección de ión cloruro.¹² También se han utilizado ampliamente en la detección

¹² a) V. Amendola, L. Fabbrizzi, L. Mosca, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 3889–3915. b) B. P. Hay, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 3700–3708.

fluorogénica de esos mismos aniones.¹³ Los grupos diamida o poliamida, a su vez, han sido utilizados en receptores de aniones, aunque en menos extensión que los grupos urea.¹⁴

La segunda subunidad imprescindible en el diseño del quimiosensor es la unidad señalizadora que debe experimentar un cambio en alguna de sus propiedades para señalar el reconocimiento. De las distintas propiedades que se pueden estudiar nuestro interés se ha dirigido a la fluorescencia por la facilidad de instrumentación y la elevada sensibilidad de estas técnicas¹⁵ Para llevar a cabo una adecuada elección de la subunidad señalizadora es necesario que el mecanismo de transducción se produzca de una forma eficaz. Entre los posibles mecanismos de actuación uno de los más interesantes es aquel en el que la complejación de sistema objeto de estudio origina una modificación de las propiedades electrónicas del cromóforo. Los cromóforos más adecuados son los que absorben a longitudes de onda en la zona de 450 nm. Un segundo requisito de interés es que la presencia del sustrato induzca un incremento en la emisión de fluorescencia mejor que un amortiguamiento ya que la sensibilidad del método se ve muy aumentada¹⁶. Estos requisitos se deben cumplir a partir de algunos de los compuestos a estudiar en la preparación de los potenciales sensores.

Otro posible mecanismo de transducción está relacionado con cambios conformacionales inducidos en el ligando por la propia complejación. Entre los sistemas basados en cambios conformacionales destacan: (a) aquellos en los que el cambio conformacional modifica la disposición espacial de los fluoróforos originando excímeros¹⁷ (b) los que dan lugar a procesos de fluorescencia con transferencia resonante de energía

¹³ a) A.-F. Li, J.-H. Wang, F. Wang, Y.-B. Jiang, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 3729–3745. b) R. M. Duke, E. B. Veale, F. M. Pfeffer, P. E. Kruger, T. Gunnlaugsson, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 3936–3953.

¹⁴ P. A. Gale, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 3746–3771.

¹⁵ A. P. de Silva, H. Q. N. Gunaratne, T. Gunnlaugsson, A. J. M. Huxley, C. P. McCoy, J. T. Rademacher, T. E. Rice, *Chem. Rev.* **1997**, 97, 1515-1566. J. F. Callan, A. P. de Silva, D. C. Magri, *Tetrahedron* **2005**, 61, 8551-8588.

¹⁶ A. B. Descalzo, K. Rurack, H. Weisshoff, R. Martínez-Mañez, M. D. Marcos, P. Amorós, K. Hoffmann, J. Soto, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 184-200.

¹⁷ A. M. Costero, M. Colera, P. Gaviña, S. Gil, *Chem Commun.* **2006**, 761-763.

(fluorescence resonance energy transfer, FRET)¹⁸ y (c) aquellos en los que lo que se produce es una modificación de los sistemas conjugados presentes en la unidad señalizadora.¹⁹ En esta parte de la Tesis Doctoral se va a estudiar el desarrollo de quimiosensores para aminoácidos basados en variaciones de la densidad electrónica de la unidad señalizadora o en cambios conformacionales. Así, se llevará a cabo la preparación de ligandos adecuados para la complejación y detección de carboxilatos y grupos amonio, especialmente orientado a la detección de aminoácidos. Los compuestos que aparecen en la figura 5 están diseñados de tal modo que la formación del complejo con los correspondientes aniones conduce a una clara modificación de la densidad electrónica en el sistema señalizador lo que originará variaciones claras de las propiedades fotofísicas de dichos compuestos. Es importante hacer notar que las unidades señalizadoras utilizadas son compuestos sintetizados *de novo* durante el desarrollo del trabajo experimental. Estos compuestos presentan distintos puntos de sustitución tanto en la estructura indénica como en el propio sustituyente fenilo, lo que permite la obtención de una batería de ligandos con diferentes distancias entre los grupos receptores de aniones. Por otra parte, los anillos bencénicos presentes en estos compuestos permiten también incluir sustituyentes adicionales que modulan las propiedades de los mismos. El análisis retrosintético que aparece reflejado en el esquema 1 muestra, a título de ejemplo, la viabilidad de la síntesis de alguno de estos compuestos a partir de productos accesibles y reacciones previamente optimizadas.

¹⁸ R. Pohl, D. Aldakov, P. Kubát, K. Jursíková, M. Marquez, P. Anzenbacher, *Chem. Commun.*, **2004**, 1282-1283.

¹⁹ A. M. Costero, M. J. Bañuls, M. J. Aurell, M. D. Ward, S. Argent, *Tetrahedron*, **2004**, *60*, 9471-9478.

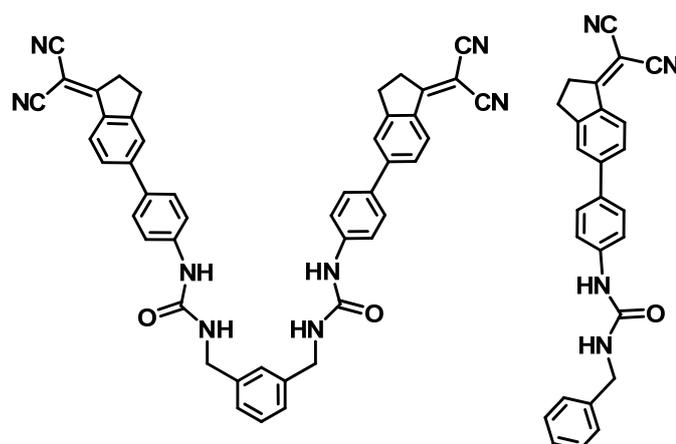
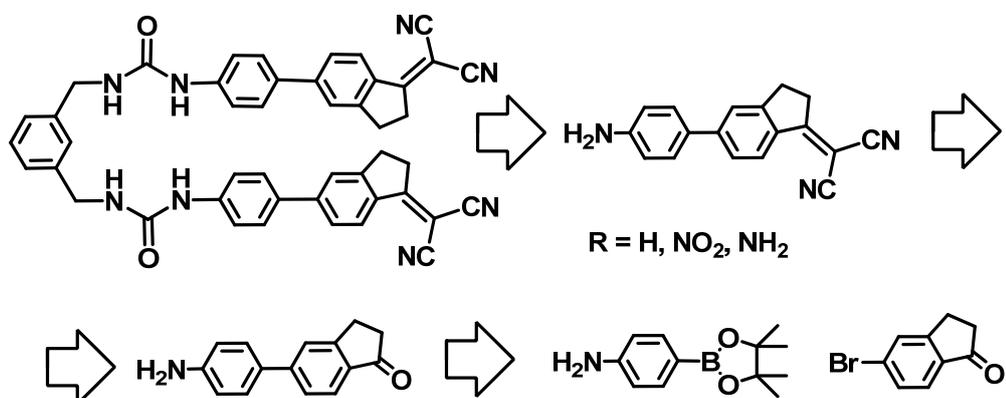


Figura 5: Sondas fluorogénicas para el reconocimiento de carboxilatos basados en la modificación de la densidad electrónica de la unidad señalizadora



Esquema 1: Ejemplo de análisis retrosintético para los potenciales quimiosensores.

Por lo respecta a los compuestos de la figura 6 siguiente, el mecanismo de transducción es algo diferente y aunque también está relacionado con cambios conformacionales, en este tipo de sistemas cada una de las unidades coordinantes se encuentra unida a una estructura aromática, por lo que se medirán las variaciones fotofísicas debidas a la coordinación en presencia de varias series de metabolitos relacionados.

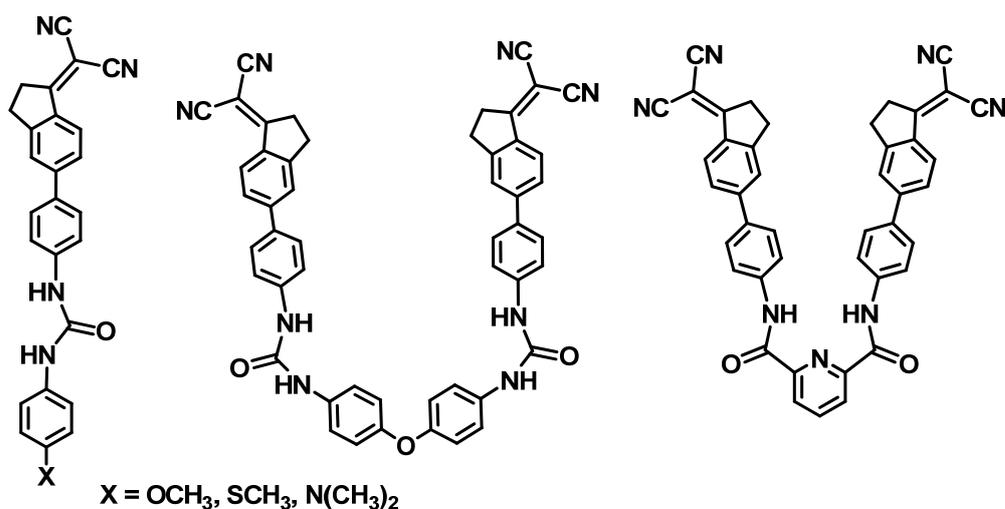


Figura 6: Sondas fluorogénicas de aminoácidos con distintos espaciadores.

En las dos primeras sondas los grupos fluorogénicos están aislados o suficientemente alejados como para actuar de forma independiente con el metabolito correspondiente. En cambio en la tercera sonda los fluoróforos están cercanos debido al puente de hidrógeno entre las amidas. Cuando se produzca la coordinación, los dos fluoróforos se alejarán como consecuencia del cambio conformacional y la excitación se modificará.

Terminada la preparación de los ligandos deseados se llevarán a cabo estudios de reconocimiento con diversos aminoácidos tanto comunes (alfa-aminoácidos) como menos comunes (beta-aminoácidos), así como frente a sus metabolitos de interés (omega-aminoácidos, bis-aminoácidos), especialmente aquellos que sirven como marcadores de procesos fisiológicos anómalos o constituyen aditivos alimentarios o farmacéuticos. Entre los metabolitos que tienen especial interés está el ácido gamma-aminobutírico (GABA) debido a que varios antiepilépticos comerciales, como por ejemplo pregabalina (Lyrica) o gabapentina (Neurontin) se basan precisamente en la estructura de GABA, y su detección puede tener gran interés farmacológico.²⁰ También tiene interés la detección de omega-

²⁰ (GABA) Y. Thielmann, J. Mohrlder, B. W. Koenig, T. Stangler, R. Hartmann, K. Becker, H.-D. Höltje, D. Willbold, *ChemBioChem* **2008**, 9, 1767–1775. (Lyrica, pregabalina) R. B. Silverman, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 3500–3504. (Gabapentina) J. B. Schwarz, S. E.

aminoácidos miméticos de la lisina, 5-aminopentanoico, 6-aminohexanoico y 7-aminopentanoico, que tienen gran importancia fisiológica.²¹ Asimismo, metabolitos como creatina,²² carnitina²³ y carnosina,²⁴ de gran interés farmacológico, y cuya detección tiene gran importancia,²⁵ serán también estudiados. Todos ellos comparten una estructura lineal terminada en un grupo amino. En todos los casos se estudiará la influencia de la longitud de la cadena y el efecto que puedan originar otros grupos funcionales presentes, especialmente un segundo grupo amino presente en los bis-aminoácidos y en los dipéptidos como carnosina.

Por otra parte, se estudiará la detección de las principales aminas biogénicas procedentes de los aminoácidos estudiados. Las aminas biogénicas tienen gran importancia en el campo de las neurociencias ya que han sido implicadas en gran variedad de desórdenes neurológicos y psiquiátricos.²⁶ Así, la serotonina es una sustancia ampliamente distribuida en el organismo humano, posee propiedades vasoconstrictoras y actúa como neurotransmisor participando en gran número de funciones fisiológicas y psicológicas, aunque también interviene en desórdenes nerviosos. Por otra parte, las poliaminas engloban a un grupo de compuestos como la putrescina, cadaverina, espermidina y espermina, que derivan de aminoácidos y su presencia en alimentos, en grandes cantidades, ha sido asociada con su deterioro. Aunque estos compuestos se encuentran de forma natural en los sistemas fisiológicos, pueden producir efectos tóxicos cuando se consumen en grandes cantidades. La histamina en dosis fisiológicas regula funciones vitales, mientras que cuando es producida en reacciones alérgicas puede ser

Gibbons, S. R. Graham, N. L. Colbry, P. R. Guzzo, V.-D. Le, M. G. Vartanian, J. J. Kinsora, S. M. Lotarski, Z. Li, M. R. Dickerson, T.-Z. Su, M. L. Weber, A. El-Kattan, A. J. Thorpe, S. D. Donevan, C. P. Taylor, D. J. Wustrow, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 3026-3035.

²¹ (Análogos de lisina) S. L. Nilsen, M. Prorok, F. J. Castellino, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 22380–22386. (Ácido 7-aminoheptanoico) F. Franěk, I. Fismolová, T. Eckschlager, *Arch. Biochem. Biophys.* **2002**, *398*, 141–146.

²² (Creatina y creatinina) M. Wyss, R. Kaddurah-Daouk, *Physiol. Rev.* **2000**, *80*, 1107-1213.

²³ (Carnitina) F. B. Stephens, D. Constantin-Teodosiu, P. L. Greenhaff, *J. Physiol.* **2007**, *581*, 431-444.

²⁴ (Carnosina) B. S. Szwegold, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *336*, 36-41.

²⁵ H. Bakirci, W. M. Nau, *Adv. Funct. Mater.* **2006**, *16*, 237–242.

²⁶ R. Malik, A. Sangwan, R. Saihgal, D. P. Jindal, P. Piplani, *Curr. Med. Chem.* **2007**, *14*, 123-131.

muy tóxica. La tiramina estimula la actividad cardíaca y consecuentemente aumenta la presión sanguínea central. El nivel de algunos de estos compuestos se ha empleado como índice de calidad de determinados productos alimenticios, como el pescado. La dopamina es un producto natural producido en el organismo que cumple funciones como neurotransmisor y su escasez es uno de los causantes de la enfermedad del Parkinson. La dopamina se libera en experiencias gratificantes, por eso el consumo de ciertas drogas está directamente relacionado con el aumento de la dopamina; así las anfetaminas aumentan la concentración de dopamina en el espacio sináptico y la cocaína actúa como bloqueador de los sistemas de transporte de la dopamina permitiendo un gran incremento de ésta. La efedrina es clasificada como una droga que actúa como estimulante del sistema nervioso central, de esta manera puede reducir la sensación de fatiga e incrementar el estado de alerta. Compuestos derivados de ésta, como las anfetaminas, son también estimulantes del sistema nervioso central, aunque su consumo crónico puede dar lugar a cuadros sicóticos. Así, la 3,4-metilendioxianfetamina, un derivado de la anfetamina, se comercializa como droga de diseño que aumenta el nivel de vigilia y la 3,4-metilendioximetanfetamina, o éxtasis, es una sustancia que incrementa los niveles de serotonina en la sinopsis neuronal, aunque es hepatotóxica.²⁷

Dada la naturaleza de la investigación que se va a llevar a cabo, en cada una de las tareas planteadas, la primera parte del trabajo será la síntesis de los ligandos. La síntesis de aminas fluorescentes para su unión a los receptores se lleva a cabo mediante acoplamientos convencionales de tipo Suzuki catalizados por complejos de paladio comerciales en una estrategia modular que permite una gran flexibilidad sintética. El aumento de la conjugación permite desplazar la emisión de fluorescencia hacia longitudes de onda mayores. La preparación de estos compuestos empleará las técnicas características de la síntesis orgánica y como complemento aquellas técnicas espectroscópicas necesarias para la correcta identificación de los compuestos preparados

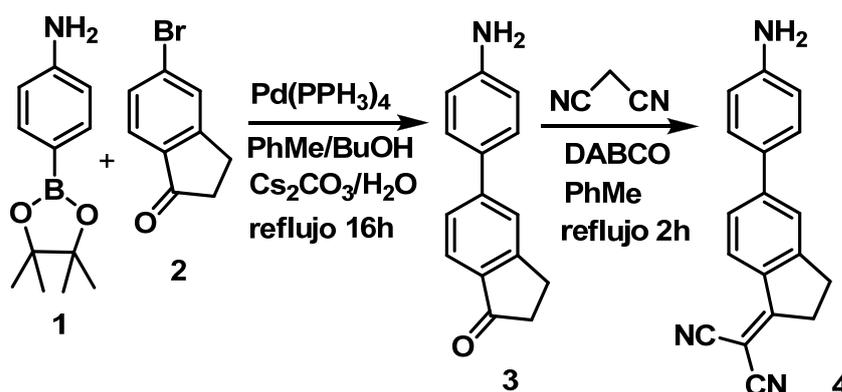
²⁷ (a) M. Carvalho, H. Pontes, F. Remiao, M. L. Bastos, F. Carvalho, *Curr. Pharm. Biotech.* **2010**, *11*, 476-495. (b) E. Turillazzi, I. Riezzo, M. Neri, S. Bello, V. Fineschi, *Curr. Pharm. Biotech.*, **2010**, *11*, 500-509.

así como para la determinación de su grado de pureza. Los analitos serán, siempre que se pueda, comerciales o bien se prepararán a partir de compuestos comerciales.

Una vez preparados los ligandos, el segundo paso en la investigación es comprobar su capacidad complejante y su potencial uso como sensores. La evaluación de las constantes de afinidad se hará mediante experimentos de valoración directa, analizando los resultados mediante ajustes utilizando el software Origin Lab. Los aniones de control se utilizarán en forma de sales de tetrabutilamonio para que en disolución se puedan considerar como pares iónicos disociados. Para la determinación de la capacidad complejante se emplearán técnicas de ^1H RMN, UV-Vis o fluorescencia. Estas técnicas, con el diseño de los experimentos adecuados nos permitirán determinar, por una parte la estequiometría de los complejos y por otra los valores de las constantes de complejación en el disolvente empleado. Las técnicas de RMN son muy potentes y por ellos se emplearán también con el fin de conocer las geometrías de los complejos formados en cada caso. Este aspecto es de una extraordinaria importancia en aquellos ligandos que presentan un mecanismo de transducción basado en cambios conformacionales.

TAREA 1: PREPARACIÓN DE SONDAS FLUOROGÉNICAS PARA LA DETECCIÓN DE AMINOÁCIDOS

RESULTADOS EXPERIMENTALES: La síntesis de la sonda fluorogénica se muestra en el esquema 2. La reacción de Suzuki del arilboronato **1** con 5-bromoindanona **2**, catalizada por $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, en mezcla tolueno/butanol/agua en presencia de CsCO_3 , dio como producto de reacción la aminocetona **3** con un rendimiento del 91%. La reacción de la aminocetona **3** y malononitrilo en presencia de DABCO, en tolueno a reflujo durante 2 horas dio lugar, a través de una reacción de Knoevenagel, a la aminoindanona **4** con un rendimiento del 95%.



Esquema 2

El compuesto **4** tiene un color amarillo pálido, con un máximo de absorbancia $\lambda_{\text{max}}^{\text{abs}} = 398 \text{ nm}$, y un coeficiente de extinción molar $\epsilon = 34500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, en disolución de CH_2Cl_2 .

En cuanto a sus propiedades fluorescentes, tanto su rendimiento cuántico $\Phi = 0.6$ en CH_2Cl_2 como por otro lado el elevado solvatochromismo (varía el máximo de fluorescencia dependiendo del disolvente que se utilice) en fluorescencia, hacen de este compuesto una interesante etiqueta fluorescente (Figuras 7-8).



4 en Hexano, Et₂O, THF, CH₂Cl₂, MeCN, MeOH, DMSO

Figura 7: Color de las disoluciones 10^{-4} M de **4** bajo luz blanca



4 en Hexano, Et₂O, THF, CH₂Cl₂, MeCN, MeOH, DMSO

Figura 8: Fluorescencia de disoluciones 10⁻⁴ M de 4 a $\lambda_{exc} = 366$ nm

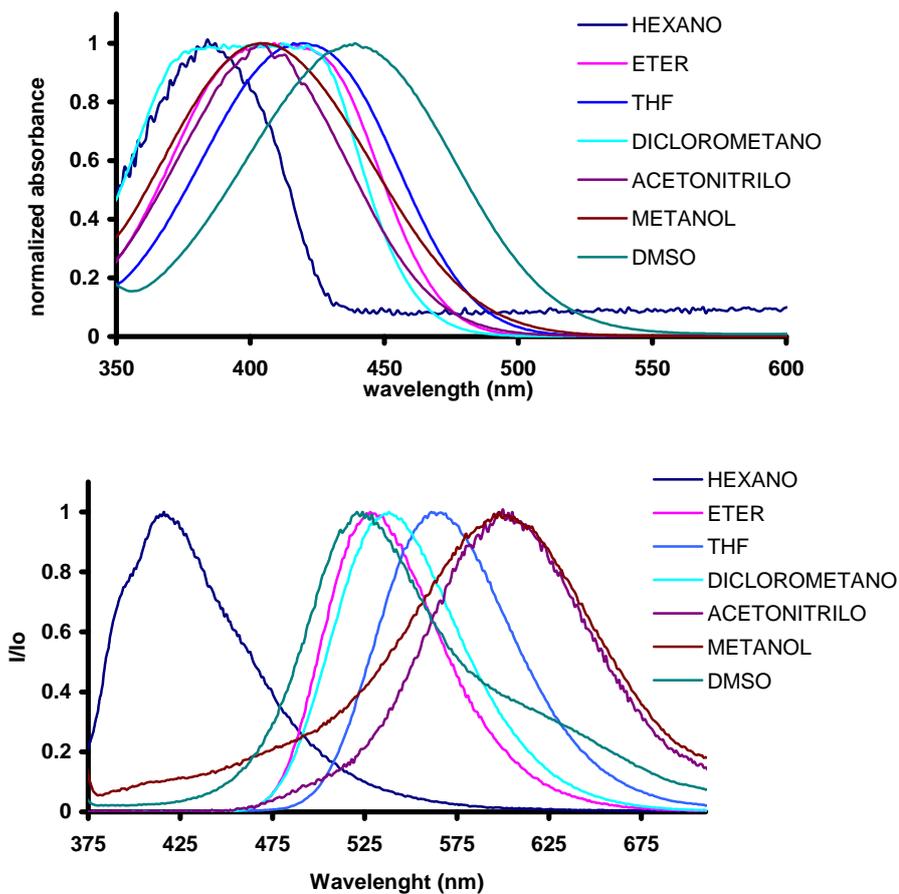
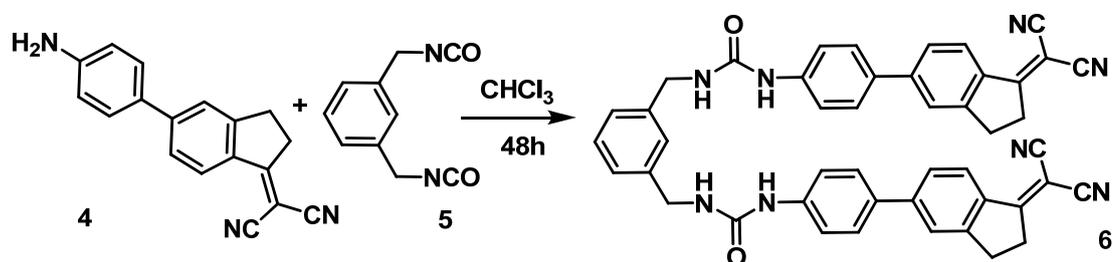


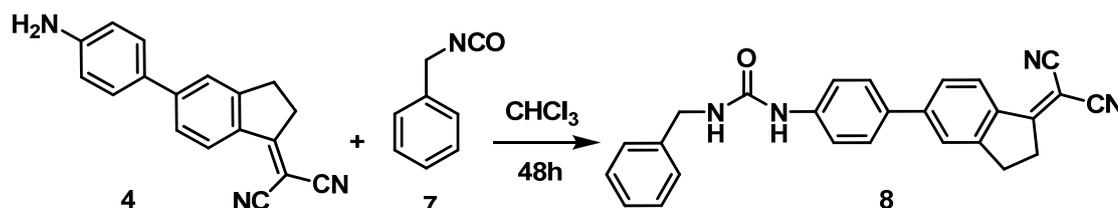
Figura 9: Espectros de absorbancia y fluorescencia normalizados de disoluciones de amina 4 (10⁻⁴ M en los disolventes: hexano, Et₂O, THF, CH₂Cl₂, MeCN, MeOH, DMSO) ($\lambda_{exc} = 366$ nm)

El grupo amino del compuesto **4** permitió una fácil inserción en receptores clásicos. Así la reacción de **4** con el bis-isocianato **5** en cloroformo durante 2 días a temperatura ambiente dio lugar a la bis-urea **6** con un 75% de rendimiento (Esquema 2).



Esquema 3

El compuesto **6** es un compuesto amarillo pálido y fluorescente en disolución con un rendimiento cuántico $\Phi = 0.12$ en THF. Del mismo modo se sintetizó la mono-urea **8** con un rendimiento del 70%, mediante reacción del compuesto **4** con el isocianato **7** en las mismas condiciones (Esquema 3).



Esquema 4

Se realizaron una serie de pruebas de detección con **6** en las condiciones anteriormente empleadas. En primer lugar se comprobó que no se producía ningún cambio en la fluorescencia de **6** en presencia de cationes en DMSO o MeCN, mientras que sí presentaba cambios con los aniones comunes. Estos cambios dependieron del disolvente utilizado. Así, en acetonitrilo puro la disolución inicial 10^{-4} M de **6** aumenta en color amarillo y la fluorescencia disminuye en presencia de los iones F^- , BzO^- , $H_2PO_4^-$, AcO^- y CN^- , un comportamiento común en ureas aromáticas coloreadas.²⁸ En este caso se produce, además, un aumento de la fluorescencia en presencia de ión Cl^- (Figuras 10-11).

²⁸ a) V. Amendola, D. Esteban-Gómez, L. Fabbrizzi, M. Licchelli, *Acc. Chem. Res.* **2006**, *39*, 343-353; b) T. Gunnlaugsson, M. Glynn, G. M. Tocci (née Hussey), P. E. Kruger, F. M. Pfeffer, *Coord. Chem. Rev.* **2006**, *250*, 3094-3117; c) C. Caltagirone, P. A. Gale, *Chem. Soc. Rev.*



Ref F⁻ Cl⁻ Br⁻ I⁻ BzO⁻ NO₃⁻ H₂PO₄⁻ HSO₄⁻ AcO⁻ CN⁻ SCN⁻

Figura 10: Color de cada disolución 10⁻⁴M de 6 en MeCN +2 equivalentes de cada anión a la luz blanca.



Ref F⁻ Cl⁻ Br⁻ I⁻ BzO⁻ NO₃⁻ H₂PO₄⁻ HSO₄⁻ AcO⁻ CN⁻ SCN⁻

Figura 11: Fluorescencia de cada disolución 10⁻⁴M de 6 en MeCN +2 equivalentes de cada anión ($\lambda_{exc} = 366 \text{ nm}$)

Utilizando DMSO como disolvente se pudo comprobar que los cambios que se producían con la serie de aniones estudiada eran diferentes; con aquellos con los que se producía una desaparición del color amarillo en este caso se producía un cambio en la fluorescencia pero hacia el azul. Como se observa en las figuras 12-13 con los aniones F⁻, BzO⁻, H₂PO₄⁻, AcO⁻ y CN⁻ es con los que se producía este cambio.



Ref F⁻ Cl⁻ Br⁻ I⁻ BzO⁻ NO₃⁻ H₂PO₄⁻ HSO₄⁻ AcO⁻ CN⁻ SCN⁻

Figura 12: Color de cada disolución 10⁻⁴ M de 6 en DMSO +2 equiv. de anión (luz blanca).

2009, 38, 520–563; d) T. D. Thangadurai, N. J. Singh, I.-C. Hwang, J. W. Lee, R. P. Chandran, K. S. Kim, *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 5461-5464.



Ref F⁻ Cl⁻ Br⁻ I⁻ BzO⁻ NO₃⁻ H₂PO₄⁻ HSO₄⁻ AcO⁻ CN⁻ SCN⁻

Figura 13: Fluorescencia de cada disolución 10^{-4} M de **6** en DMSO +2 equivalentes de cada anión ($\lambda_{\text{exc}} = 366$ nm).

Los cambios apreciados en disoluciones DMSO/H₂O 9:1 fueron similares, con la única diferencia de que en el caso del anión H₂PO₄⁻ no se produjo ningún cambio. Se realizaron valoraciones fluorimétricas con los distintos aniones tanto en DMSO como en mezclas DMSO/H₂O 9:1, obteniéndose unos resultados que en todos los casos pudieron ajustarse a un modelo de complejo 1:1, tal como se muestra en las figuras siguientes.

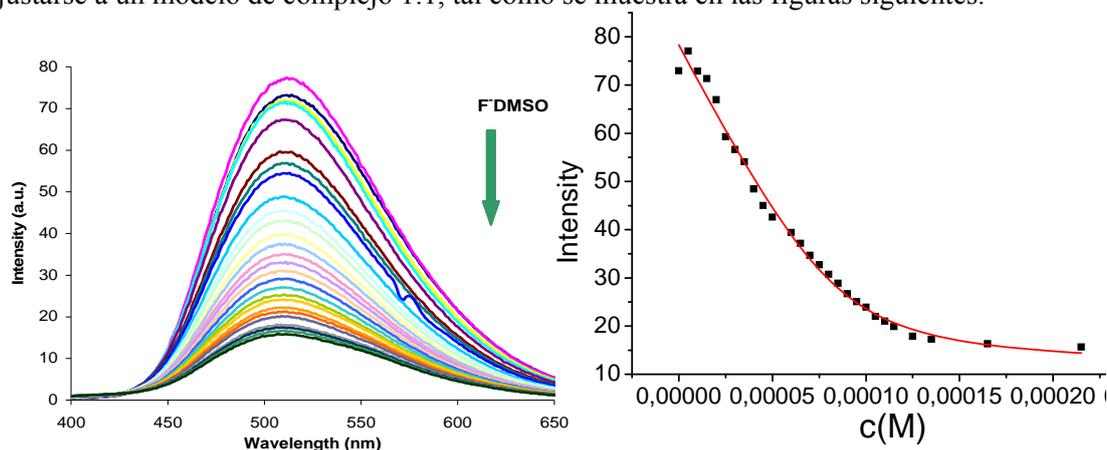


Figura 14: Izquierda: Espectros de emisión para la valoración fluorimétrica de **6** (10^{-4} M en DMSO) con F⁻ ($\lambda_{\text{excitación}} = 290$ nm). **Derecha:** Ajustes para el cálculo de la constante de formación del complejo 1:1 ($\lambda_{\text{máxima}} = 515$ nm) de **6** con F⁻

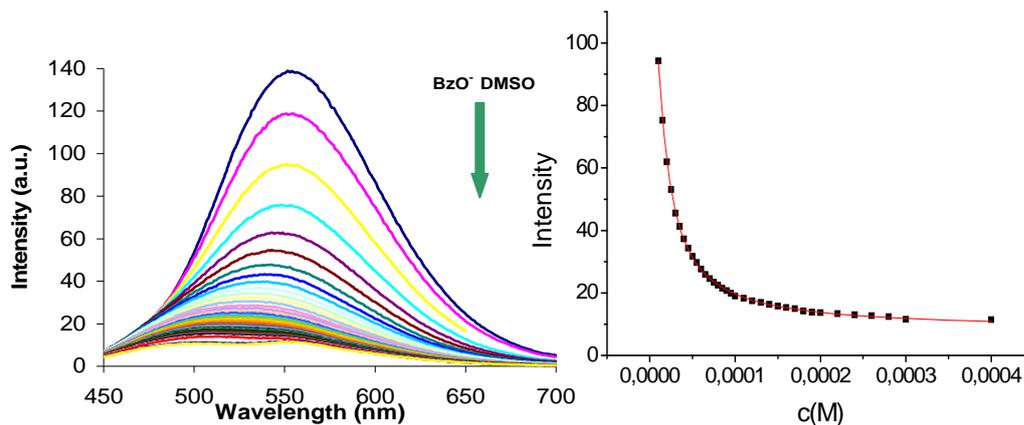


Figura 15: Izquierda: Espectros de emisión para la valoración fluorimétrica de **6** (10^{-4} M en DMSO) con ión BzO^- ($\lambda_{\text{excitación}} = 396$ nm). **Derecha:** Ajustes para el cálculo de la constante de formación del complejo 1:1 ($\lambda_{\text{máxima}} = 555$ nm) de **6** con BzO^-

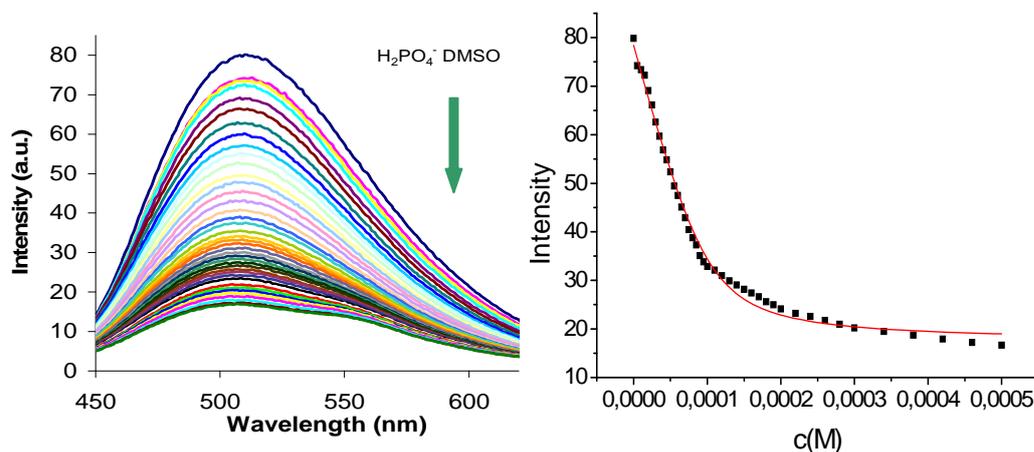


Figura 16: Izquierda: Espectros de emisión para la valoración fluorimétrica de **6** (10^{-4} M en DMSO) con H_2PO_4^- ($\lambda_{\text{excitación}} = 290$ nm). **Derecha:** Ajustes para el cálculo de la constante de formación del complejo 1:1 ($\lambda_{\text{máxima}} = 515$ nm) de **6** con H_2PO_4^-

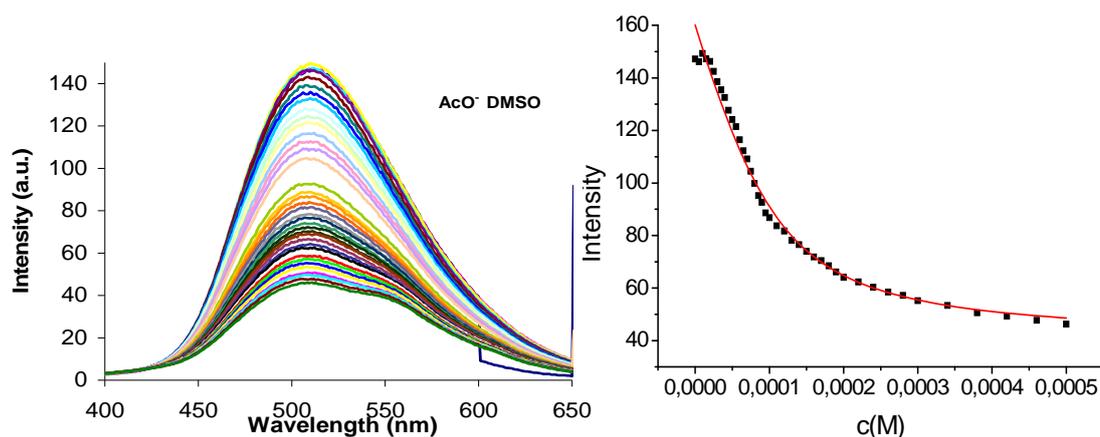


Figura 17: Izquierda: Espectros de emisión para la valoración fluorimétrica de **6** (10^{-4} M en DMSO) con ión AcO^- ($\lambda_{\text{excitación}} = 290$ nm). **Derecha:** Ajustes para el cálculo de la constante de formación del complejo 1:1 ($\lambda_{\text{máxima}} = 515$ nm) de **6** con AcO^-

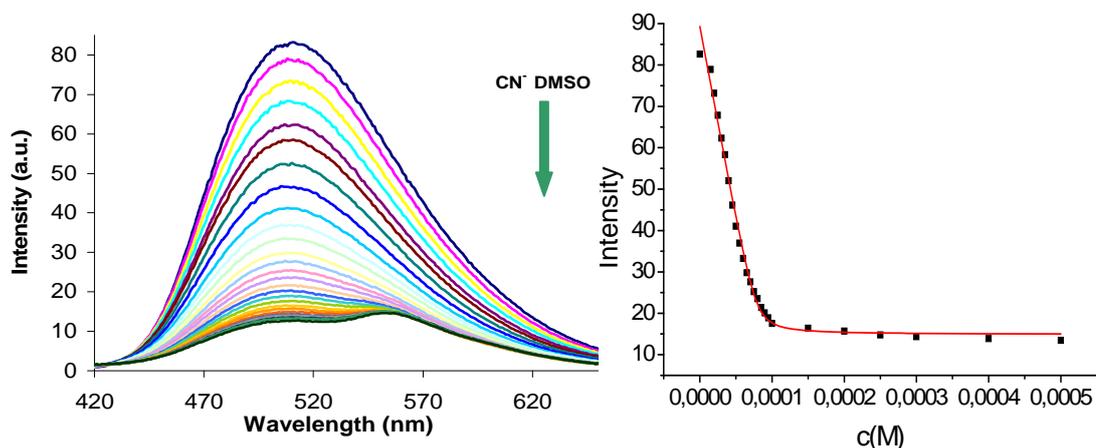


Figura 18: Izquierda: Espectros de emisión para la valoración fluorimétrica de **6** (10^{-4} M en DMSO) con CN^- ($\lambda_{\text{excitación}} = 290$ nm). **Derecha:** Ajustes para el cálculo de la constante de formación del complejo 1:1 ($\lambda_{\text{máxima}} = 515$ nm) de **6** con CN^-

Las constantes de formación de los complejos 1:1 entre **6** y cada uno de los aniones estudiados aparecen reflejadas en la tabla mostrada a continuación.

Aniones	M:L	logK ₁	R ²
BzO ⁻	1:1	5,118±0,006	0,999
AcO ⁻	1:1	4,503±0,023	0,988
CN ⁻	1:1	6,022±0,179	0,992
F ⁻	1:1	5,169±0,158	0,991
H ₂ PO ₄ ⁻	1:1	4,968±0,047	0,994

Tabla 1: Constantes de complejación para el compuesto 6 en DMSO con diversos aniones

A continuación se realizaron las correspondientes valoraciones de 6 con los aniones a los que resultó ser sensible en DMSO/H₂O 9:1, para comprobar cómo se comportan los complejos formados en presencia de agua y la incidencia que tiene la presencia del agua en el medio sobre los valores de las correspondientes constantes de formación.

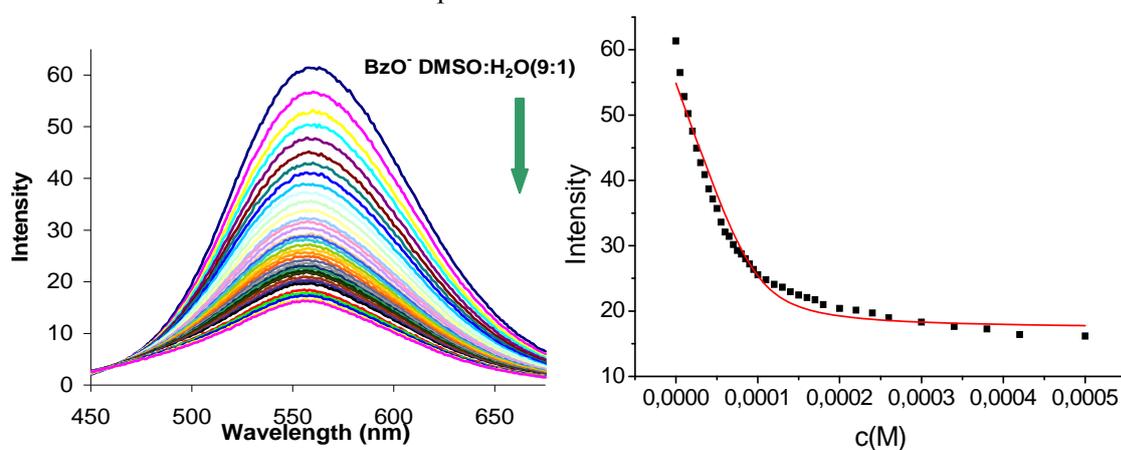


Figura 19: **Izquierda:** Espectros de emisión para la valoración fluorimétrica de 6 (10⁻⁴ M en DMSO/H₂O 9:1) con BzO⁻ (λ_{excitación} = 396 nm). **Derecha:** Ajustes para el cálculo de la constante de formación del complejo 1:1 (λ_{máxima} = 555 nm) de 6 con BzO⁻

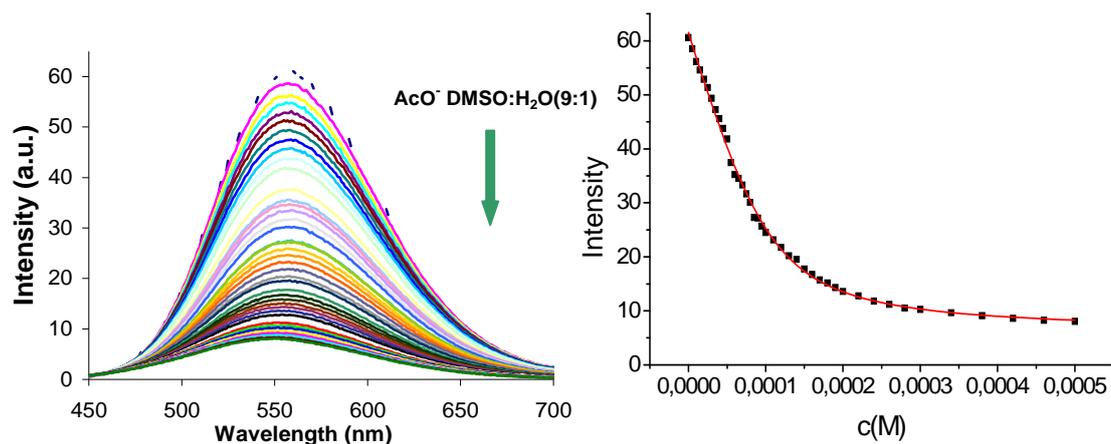


Figura 20: Izquierda: Espectros de emisión para la valoración fluorimétrica de **6** (10^{-4} M en DMSO/H₂O 9:1) con AcO⁻ ($\lambda_{\text{excitación}} = 396$ nm). Derecha: Ajustes para el cálculo de la constante de formación del complejo 1:1 ($\lambda_{\text{máxima}} = 555$ nm) de **6** con AcO⁻

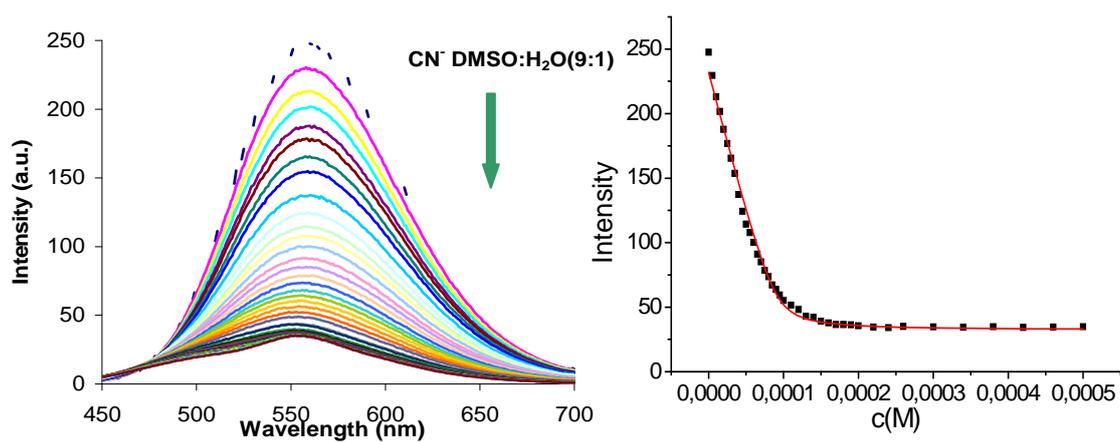


Figura 21: Izquierda: Espectros de emisión para la valoración fluorimétrica de **6** (10^{-4} M en DMSO/H₂O 9:1) con CN⁻ ($\lambda_{\text{excitación}} = 396$ nm). Derecha: Ajustes para el cálculo de la constante de formación del complejo 1:1 ($\lambda_{\text{máxima}} = 555$ nm) de **6** con CN⁻

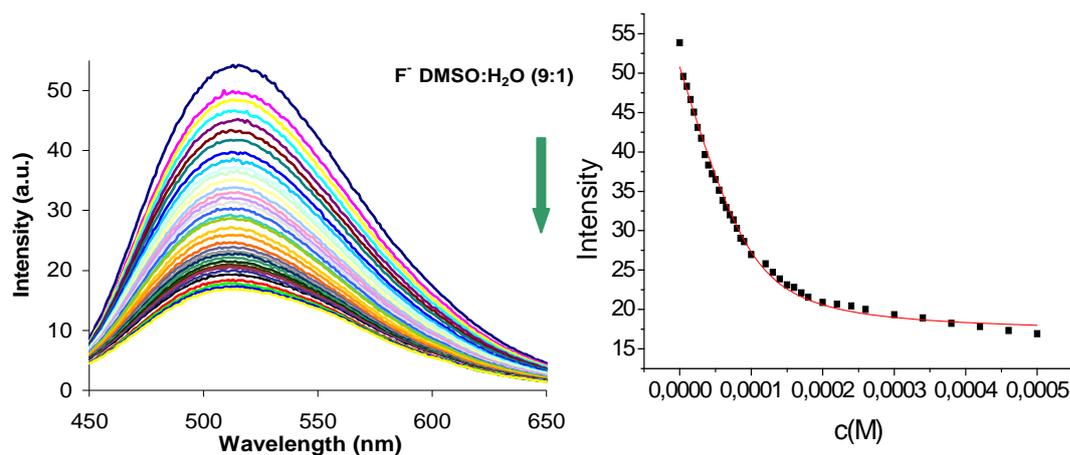


Figura 22: **Izquierda:** Espectros de emisión para la valoración fluorimétrica de **6** (10^{-4} M en DMSO/H₂O 9:1) con F⁻ ($\lambda_{\text{excitación}} = 396$ nm). **Derecha:** Ajustes para el cálculo de la constante de formación del complejo 1:1 ($\lambda_{\text{máxima}} = 555$ nm) de **6** con F⁻

Las constantes de formación de los complejos 1:1 entre **6** y cada uno de los aniones estudiados aparecen reflejadas en la tabla mostrada a continuación.

Aniones	M:L	logK ₁	R ²
BzO ⁻	1:1	5,222±0,123	0,974
AcO ⁻	1:1	4,756±0,048	0,998
CN ⁻	1:1	5,681±0,086	0,992
F ⁻	1:1	4,867±0,049	0,994

Tabla 2: Constantes de complejación del compuesto **6** en DMSO:H₂O (9:1) con diversos aniones

Una vez realizados los estudios mediante ajustes no lineales, obteniendo resultados compatibles con ajustes ML (1:1), se buscó la confirmación de estos a través del método Job's Plot. En este caso, tras realizar las correspondientes medidas de fluorescencia, se representa el valor del producto de la intensidad de la fluorescencia por la concentración del analito, frente a la fracción molar de analito (F⁻), dando un máximo a un 50% de fracción molar lo que confirma que la estequiometría propuesta es correcta.

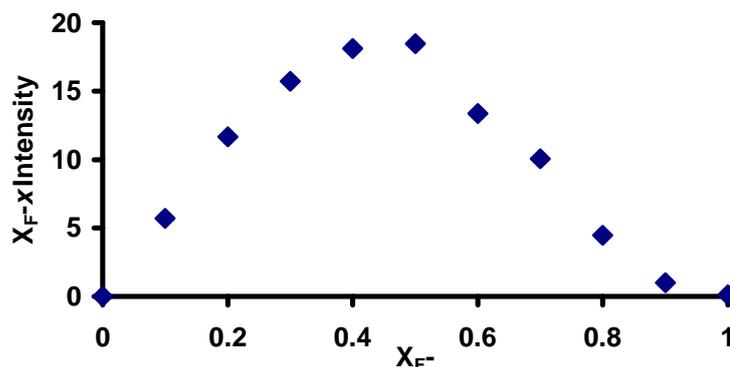
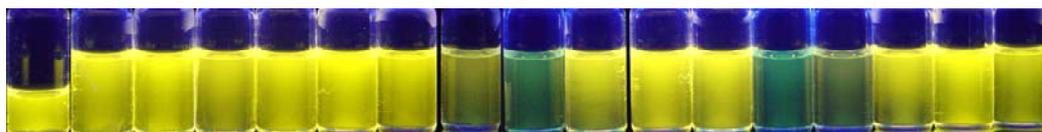


Figura 23: Análisis por el método Job's Plot para las valoraciones en fluorescencia del producto **6** con anión F⁻ en DMSO ($\lambda_{\text{excitación}} = 396 \text{ nm}$) ($\lambda_{\text{emisión}} = 557 \text{ nm}$)

Estudiando los resultados de las constantes se aprecia que para los complejos de formación de **6** con los aniones F⁻ y CN⁻ las constantes disminuyen en las disoluciones que contienen agua, mientras que en el caso de los aniones BzO⁻ y AcO⁻ los valores permanecen prácticamente constantes, lo que es indicativo de la buena condición de este receptor como sonda de carboxilatos en disolventes acuosos, por lo que se han estudiado sus interacciones con aminoácidos y sus metabolitos.

ESTUDIOS DE DETECCIÓN DE AMINOÁCIDOS

Dadas las características de la sonda estudiada y, a la vista de los resultados obtenidos, se decidió realizar un estudio con una serie de 16 α -aminoácidos comunes, con la sonda **6** disuelta en DMSO y los aminoácidos en disolución acuosa. Los resultados obtenidos pueden observarse en la figura siguiente, en la que se aprecia claramente un cambio de fluorescencia, que pasa del amarillo al azul, con la adición de 2 equivalentes de glutamina, lisina, asparagina y arginina. Estos aminoácidos tienen en común la existencia de algún grupo funcional con átomos de nitrógeno en su estructura, en posición opuesta a la del grupo carboxilato. Con el resto de aminoácidos no se produjo ningún cambio aparente, incluso tras la adición de 3 equivalentes de α -aminoácido.



Ref. Leu, Met, Ser, Thr, Cys, Pro, Asn, Gln, Phe, Tyr, Trp, Lys, Arg, His, Asp, Glu

Figura 24: Efecto de la adición de 3 equivalentes de cada α -aminoácido en agua sobre la fluorescencia de una disolución 10^{-4} M de **6** en DMSO: Leu: leucina, Met: metionina, Ser: serina, Thr: treonina, Cys: cisteína, Pro: prolina, Asn: asparagina, Gln: glutamina, Phe: fenilalanina, Tyr: tirosina, Trp: triptófano, Lys: lisina, Arg: arginina, His: histidina, Asp: ácido aspártico, Glu: ácido glutámico.

Las valoraciones fluorimétricas realizadas nos muestran una disminución de la banda de emisión correspondiente al color amarillo inicial observado ($\lambda_{\text{máxima}} = 511$ nm), y los ajustes realizados a modelos no lineales dan como resultado ajustes del tipo 1:1 para todos los α -aminoácidos estudiados.

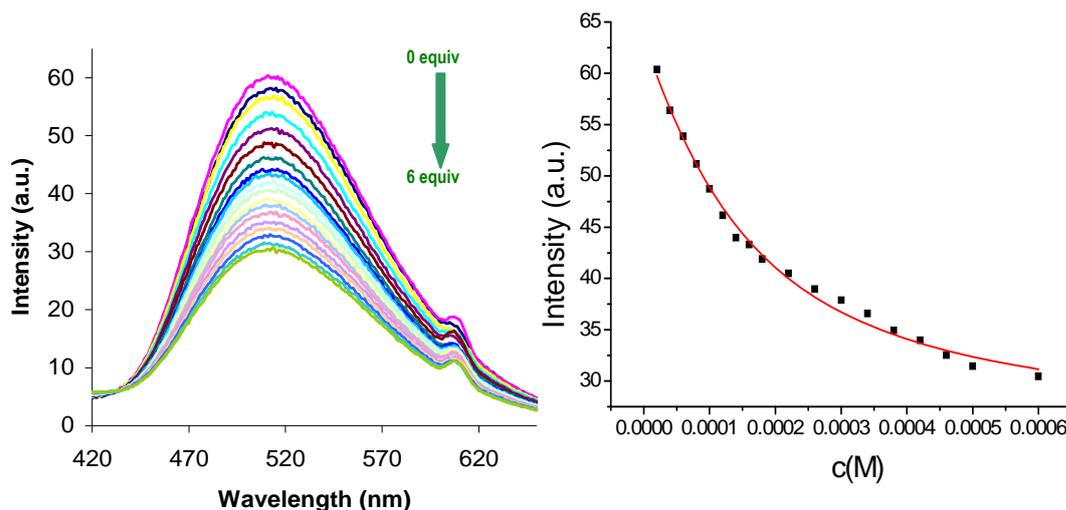


Figura 25: Izquierda: Espectros de emisión para la valoración fluorimétrica de la sonda **6** (10^{-4} M en DMSO) con *L*-arginina (en H₂O) ($\lambda_{\text{excitación}} = 306$ nm). **Derecha:** Ajustes para el cálculo de las constantes de formación del complejo 1:1 ($\lambda_{\text{máxima}} = 511$ nm) de **6** con *L*-arginina

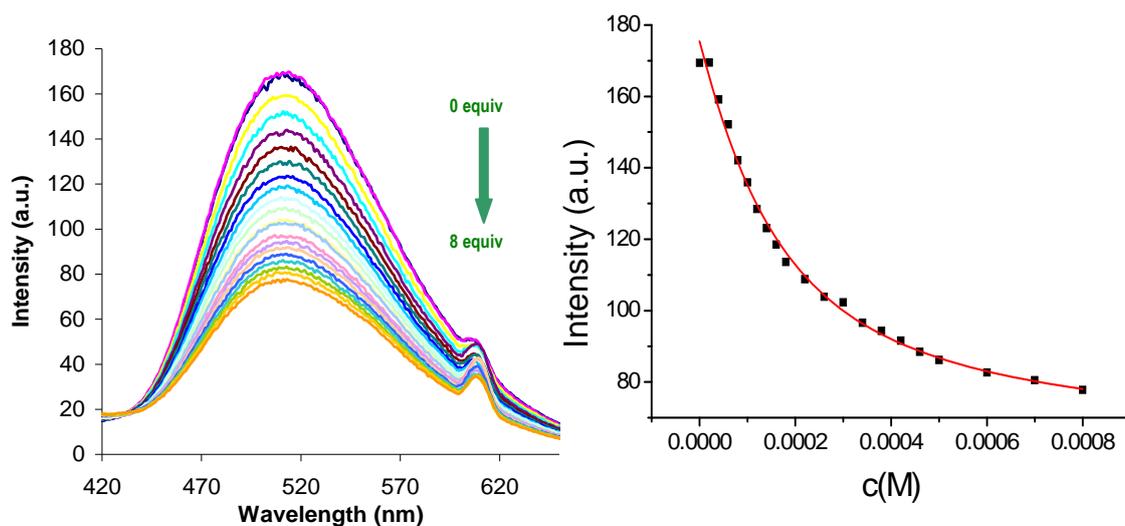


Figura 26: **Izquierda:** Espectros de emisión para la valoración fluorimétrica de la sonda **6** (10^{-4} M en DMSO) con *L*-asparagina (en H_2O) ($\lambda_{excitación} = 306$ nm). **Derecha:** Ajustes para el cálculo de las constantes de formación del complejo 1:1 ($\lambda_{máxima} = 511$ nm) de **6** con *L*-asparagina.

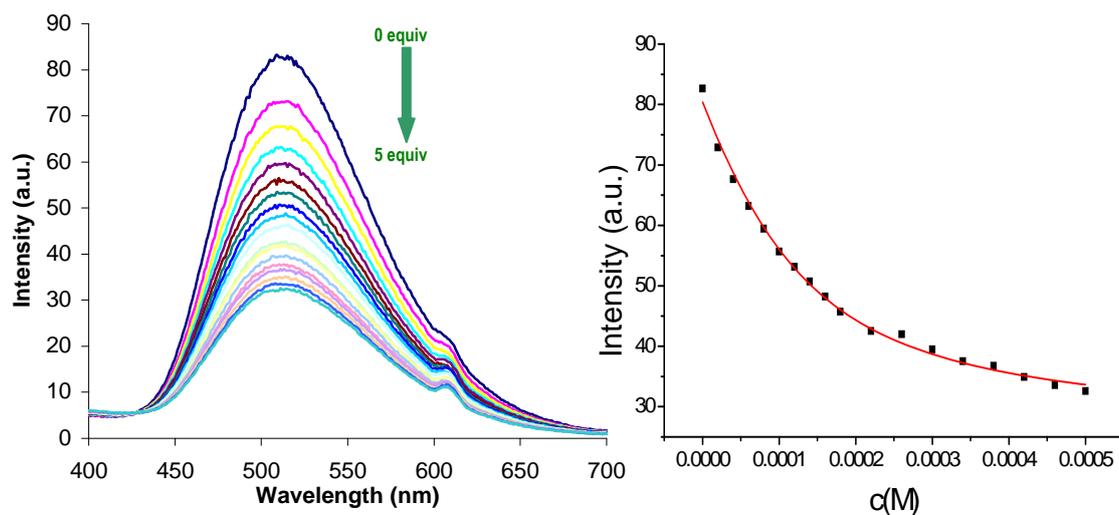


Figura 27: **Izquierda:** Espectros de emisión para la valoración fluorimétrica de la sonda **6** (10^{-4} M en DMSO) con *L*-glutamina (en H_2O) ($\lambda_{excitación} = 306$ nm). **Derecha:** Ajustes para el cálculo de las constantes de formación del complejo 1:1 ($\lambda_{máxima} = 511$ nm) de **6** con *L*-glutamina.

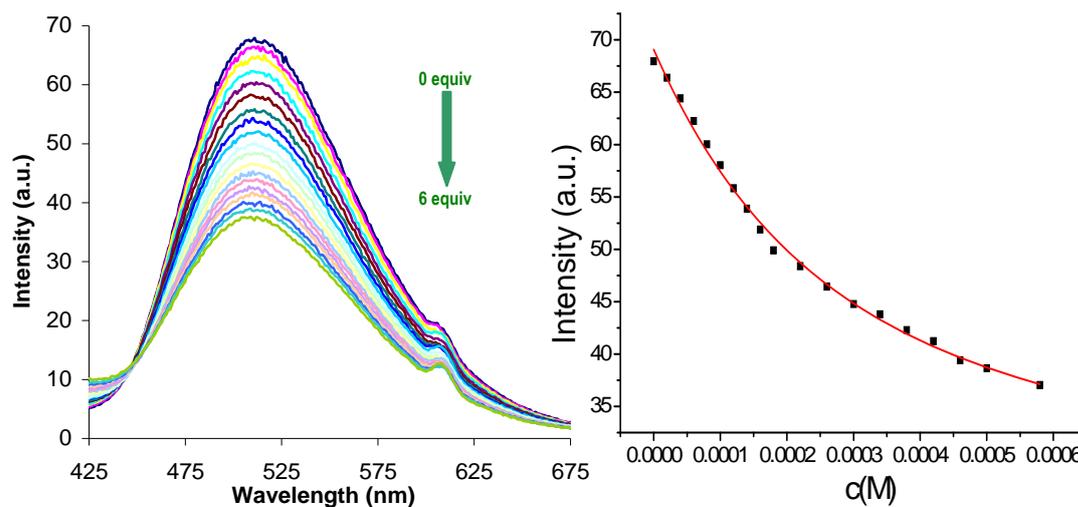


Figura 28: **Izquierda:** Espectros de emisión para la valoración fluorimétrica de de la sonda **6** (10^{-4} M en DMSO) con *L*-lisina (en H₂O) ($\lambda_{\text{excitación}} = 306$ nm). **Derecha:** Ajustes para el cálculo de las constantes de formación del complejo 1:1 ($\lambda_{\text{máxima}} = 511$ nm) de **6** con *L*-lisina.

Las constantes de formación de los complejos 2:1 entre **6** y cada uno de los aminoácidos estudiados aparecen reflejadas en la tabla mostrada a continuación.

6	Arginina	Asparagina	Glutamina	Lisina
Log K₁	3.93 ± 0.05	3.93 ± 0.04	4.17 ± 0.04	3.66 ± 0.04

Tabla 3: Constantes de formación para complejos 1:1 obtenidos a partir de las valoraciones fluorimétricas de una disolución 10^{-4} M de la sonda **6** en DMSO con cada uno de los α -aminoácidos en agua.

Una vez realizados los estudios mediante ajustes no lineales, obteniendo resultados que confirmaban un ajuste ML (1:1), se buscó la confirmación de estos a través del método de Job's Plot. En este caso, tras realizar las correspondientes medidas de fluorescencia, se representa de nuevo el valor del producto de la intensidad de la fluorescencia por la concentración del analito, frente a la fracción molar de analito (*L*-lisina y *L*-asparagina). Los análisis de Job's Plot realizados con estos aminoácidos

confirman que la estequiometría propuesta es la correcta ya que el máximo aparece en cada caso a un 50% de fracción molar.

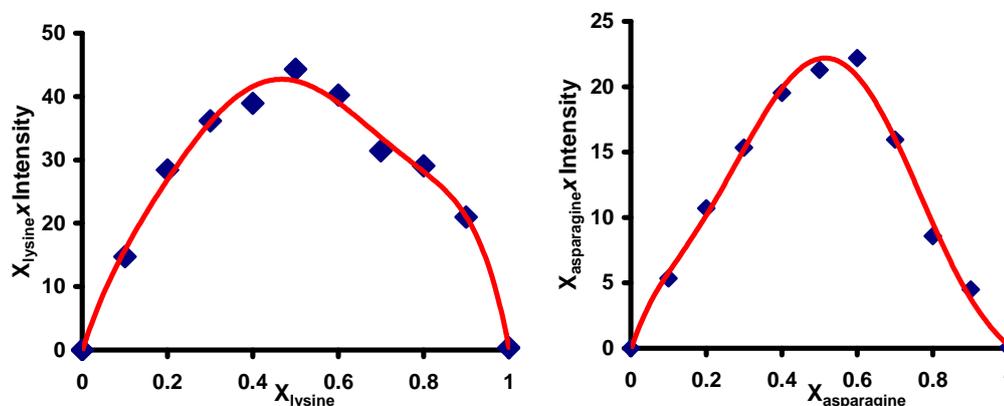


Figura 29: Análisis por el método Job's Plot para las valoraciones en fluorescencia del producto **6** (10^{-4} M en DMSO) con (izquierda) *L*-lisina ($\lambda_{\text{excitación}} = 350$ nm) ($\lambda_{\text{emisión}} = 515$ nm) y (derecha) *L*-asparagina en agua ($\lambda_{\text{excitación}} = 396$ nm) ($\lambda_{\text{emisión}} = 557$ nm)

ESTUDIOS EN PRESENCIA DE ω -AMINOÁCIDOS

Puesto que los aminoácidos a los que la sonda fluorogénica en estudio es sensible tienen todos en común la existencia de un grupo funcional con nitrógenos, el estudio se extendió a la detección de cambios en la fluorescencia de **6** en presencia de ω -aminoácidos y metabolitos que tuvieran en común las mismas características estructurales. De este modo se prepararon, inicialmente, una serie de disoluciones acuosas de ω -aminoácidos de cadena creciente, además de un α -aminoácido como contraste: α -alanina, β -alanina, ácido γ -aminobutyrico (GABA), ácido 5-aminovalérico, ácido 6-aminohexanoico y ácido 7-aminoheptanoico. Estas disoluciones se enfrentaron a su vez a disoluciones en DMSO de la sonda en estudio, **6**. Se observaron cambios en la fluorescencia del color amarillo inicial a fluorescencia azul con todos los ω -aminoácidos, pero no se observaron cambios en presencia de α -alanina, utilizada como referencia, mediante adición de 3 equivalentes de una disolución acuosa de cada uno de ellos sobre una disolución 10^{-4} M de **6** en DMSO.



Ref. Ala, β -ala, GABA, 5-am, 6-am, 7-am

Figura 30: Efecto de la adición de 3 equivalentes de cada uno de los ω -aminoácidos en agua sobre la fluorescencia de una disolución 10^{-4} M de **6** en DMSO: **Ala**: α -alanina, **β -ala**: β -alanina, **GABA**: ácido γ -aminobutyrico, **5-am**: ácido 5-aminovalerico, **6-am**: ácido 6-aminohexanoico, **7-am**: ácido 7-aminoheptanoico.

Se realizaron los estudios de asociación mediante valoraciones fluorimétricas, estudiando la disminución de la intensidad de la banda de emisión centrada en torno a 560 nm, pudiendo ajustarse todas las valoraciones a modelos de complejación del tipo 2:1.

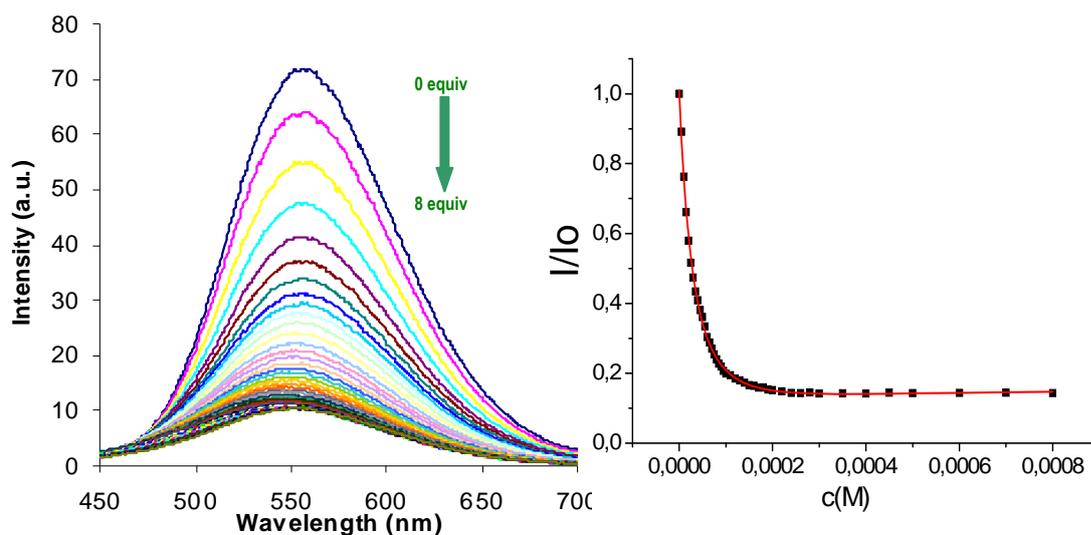


Figura 31: Izquierda: Espectros de emisión para la valoración fluorimétrica de la sonda **6** (10^{-4} M en DMSO) con β -alanina (en H_2O) ($\lambda_{excitación} = 396$ nm). Derecha: Ajustes para el cálculo de las constantes de formación complejo 2:1 ($\lambda_{máxima} = 562$ nm) de **6** con β -alanina

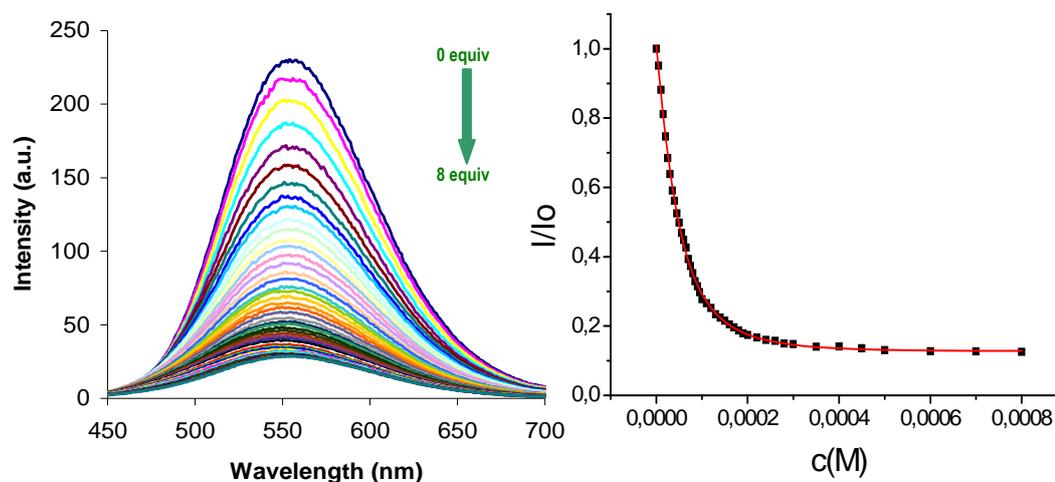


Figura 32: **Izquierda:** Espectros de emisión para la valoración fluorimétrica de la sonda **6** (10⁻⁴ M en DMSO) con ácido γ -aminobutírico (en H₂O) ($\lambda_{\text{excitación}} = 394$ nm). **Derecha:** Ajustes para el cálculo de las constantes de formación del complejo 2:1 ($\lambda_{\text{máxima}} = 562$ nm) de **6** con ácido γ -aminobutírico.

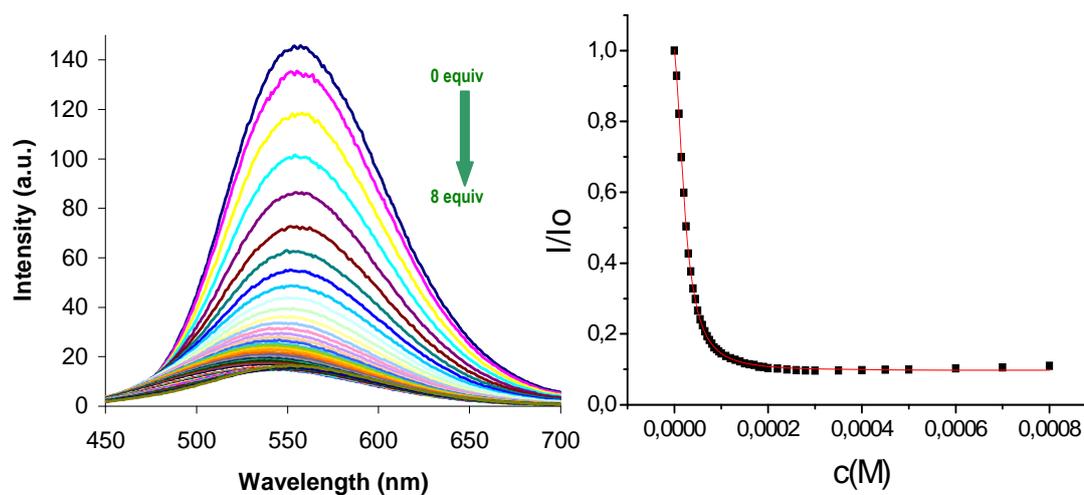


Figura 33: **Izquierda:** Espectros de emisión para la valoración fluorimétrica de la sonda **6** (10⁻⁴ M en DMSO) con ácido 5-aminovalérico (en H₂O) ($\lambda_{\text{excitación}} = 396$ nm). **Derecha:** Ajustes para el cálculo de las constantes de formación del complejo 2:1 ($\lambda_{\text{máxima}} = 562$ nm) de **6** con ácido 5-aminovalérico.

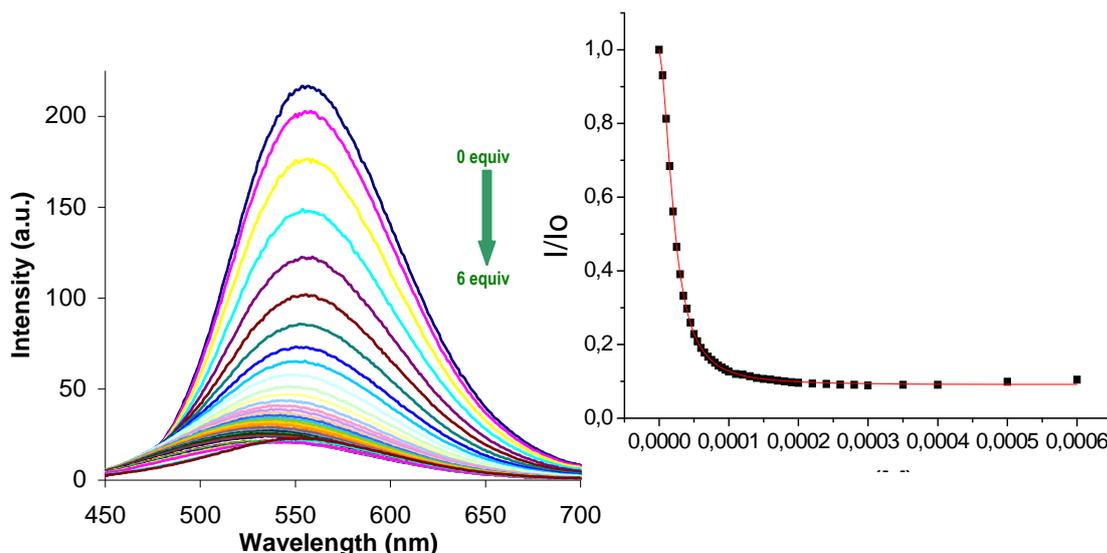


Figura 34: Izquierda: Espectro de emisión para la valoración fluorimétrica de la sonda **6** (10^{-4} M en DMSO) con ácido 6-aminohexanoico (en H_2O) ($\lambda_{excitación} = 396$ nm). Derecha: Ajustes para el cálculo de las constantes de formación del complejo 2:1 ($\lambda_{máxima} = 562$ nm) de **6** con ácido 6-aminohexanoico.

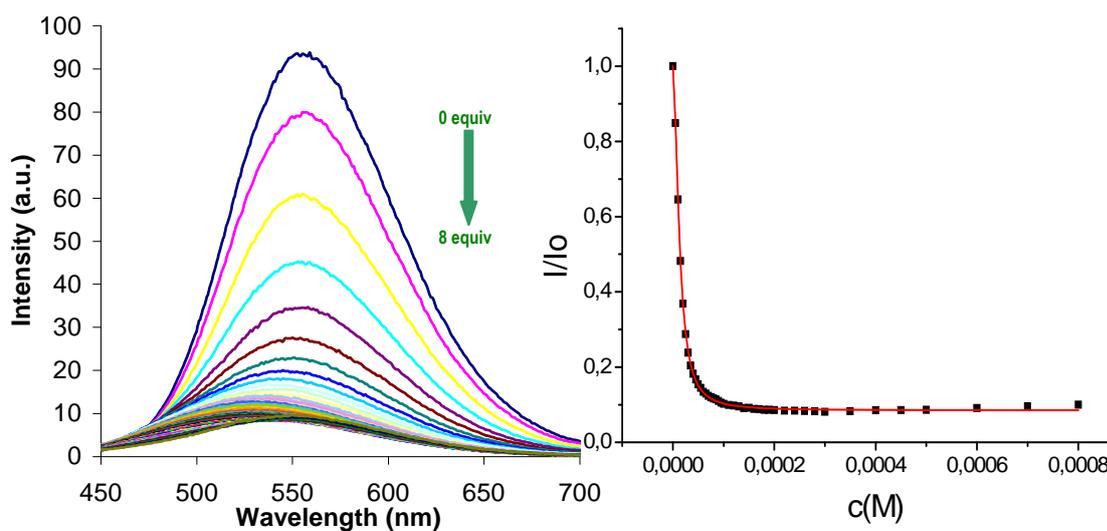


Figura 35: Izquierda: Espectros de emisión para la valoración fluorimétrica de la sonda **6** (10^{-4} M en DMSO) con ácido 7-aminoheptanoico (en H_2O) ($\lambda_{excitación} = 396$ nm). Derecha: Ajustes para el cálculo de las constantes de formación del complejo 2:1 ($\lambda_{máxima} = 562$ nm) de **6** con ácido 7-aminoheptanoico.

Las constantes de formación de los complejos 2:1 entre **6** y cada uno de los ω -aminoácidos estudiados aparecen reflejadas en la tabla mostrada a continuación.

6	β-alanina	GABA	5-amino-valerico	6-amino-hexanoico	7-amino-heptanoico
Log K₁	4.49 \pm 0.02	4.15 \pm 0.02	3.98 \pm 0.04	3.70 \pm 0.06	4.18 \pm 0.05
Log K₂	3.93 \pm 0.09	4.10 \pm 0.07	5.17 \pm 0.05	5.58 \pm 0.07	5.51 \pm 0.06

Tabla 4: Constantes de formación obtenidas de las valoraciones fluorimétricas de **6** en DMSO con ω -aminoácidos en agua.

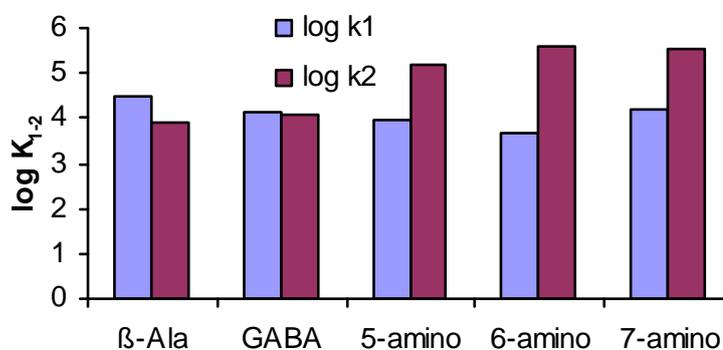


Figura 36: Gráfico de los valores de $\log K_{1-2}$ para los complejos 2:1 formados entre **6** y los ω -aminoácidos.

En la representación gráfica de la figura 29 se aprecia claramente cómo la variación de los valores de $\log K_{1-2}$ presenta una tendencia a lo largo de la serie de ω -aminoácidos estudiada. Así como el valor de la primera constante disminuye desde β -alanina hasta el ácido 6-aminohexanoico y luego aumenta para el ácido 7-aminoheptanoico, la segunda constante aumenta desde la β -alanina hasta el ácido 6-aminohexanoico y posteriormente disminuye para el ácido 7-aminoheptanoico. Estos resultados indican que el ligando **6** actúa como una regla molecular para carboxilatos que contienen un grupo amonio a una distancia creciente del grupo carboxílico, variando las constantes de asociación en función de la distancia entre ambos grupos funcionales.

Una vez realizados los estudios mediante ajustes no lineales, obteniendo resultados que confirmaban un ajuste ML (2:1), se buscó la confirmación de estos a través del método de Job's Plot. En este caso, tras realizar las correspondientes medidas de fluorescencia, se representa de nuevo el valor del producto de la intensidad de la fluorescencia por la concentración del analito, frente a la fracción molar de analito (ácido 5-aminohexanoico). Los análisis de Job's Plot realizados con este aminoácido confirman que la estequiometría propuesta es la correcta ya que el máximo aparece a un 66% de fracción molar.

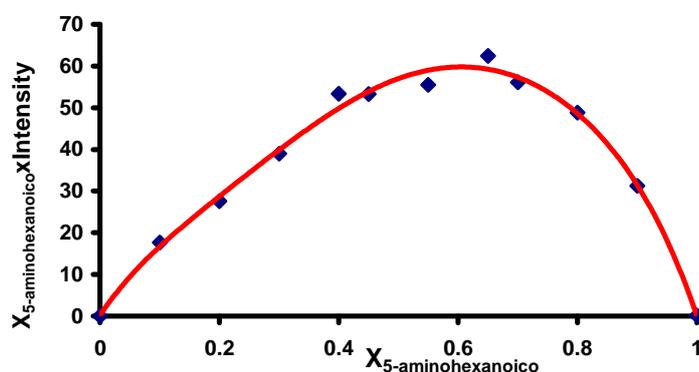
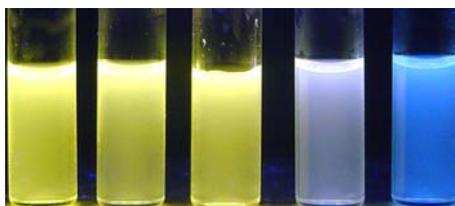


Figura 37: Análisis por el método Job's Plot para la valoración en fluorescencia del producto **6** (10^{-4} M en DMSO) con ácido 5-aminohexanoico ($\lambda_{\text{excitación}} = 350$ nm) ($\lambda_{\text{emisión}} = 515$ nm).

ESTUDIOS CON GABAPENTINA, PREGABALINA Y METABOLITOS

El ácido γ -aminobutírico (GABA) es un metabolito importante, varios fármacos muy utilizados, como pregabalina²⁹ o gabapentina,³⁰ están basados en la estructura del GABA. Debido a esa similitud con el GABA, se ha utilizado la sonda fluorogénica **6** para desarrollar un método de detección selectiva de pregabalina y gabapentina que pueda ser utilizado directamente a partir de sus preparaciones farmacéuticas, así como para su análisis cuantitativo a partir de los valores de las constantes de formación de sus complejos con **6**, obtenidos de las valoraciones fluorimétricas de sus disoluciones acuosas y **6** (10^{-4} M en DMSO). Otros metabolitos de aminoácidos, utilizados normalmente en suplementos nutricionales, como son la carnitina³¹ o la creatina³², también presentan características estructurales similares, que los hacen adecuados para su detección mediante la sonda fluorogénica **6**. Por tanto se han estudiado las interacciones de disoluciones de **6** (10^{-4} M en DMSO) con disoluciones acuosas de todos estos fármacos o metabolitos de aminoácidos. Tras la adición de los metabolitos se produce un cambio de fluorescencia de amarillo a azul en presencia de 2 o más equivalentes de carnitina o creatina, sin embargo no se producen cambios en la fluorescencia en presencia de sarcosina o creatinina.



Ref. Sarc, creatinina, Creat, Carnit

Figura 38: Efecto de la adición de 3 equiv. de cada metabolito en agua a una disolución 10^{-4} M de **6** en DMSO: **Sarc:** sarcosina, **creatinina,** **Creat:** creatina, **Carnit:** L-carnitina

²⁹ a) R. B. Silverman, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 3500–3504. b) O. Bassas, J. Huuskonen, K. Rissanen, A. M. P. Koskinen, *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 1340–1351.

³⁰ a) P. G. Vasudev, S. Chatterjee, N. Shamala, P. Balaram, *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42*, 1628–1639; b) H. Zhao, Z. Guo, *Drug Discov. Today* **2009**, *14*, 516–522.

³¹ H. Bakirci, W. M. Nau, *Adv. Funct. Mater.* **2006**, *16*, 237–242.

³² S. Goswami, S. Jana, A. Hazra, H.-K. Fun, S. Anjum, A.-u. Rahman, *Cryst. Eng. Comm.* **2006**, *8*, 712–718.

Las valoraciones fluorimétricas realizadas sobre pregabalina y gabapentina han permitido ajustar los resultados a modelos no lineales de complejación 2:1.

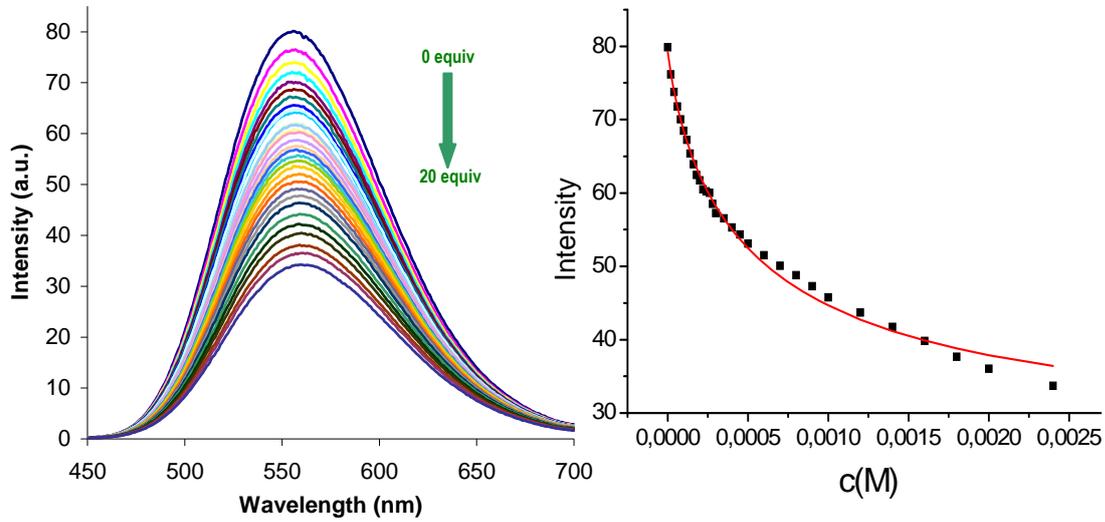


Figura 39: Izquierda: Espectros de emisión para la valoración fluorimétrica de **6** (10^{-4} M en DMSO) con gabapentina (en H_2O) ($\lambda_{excitación} = 428$ nm). **Derecha:** Ajustes para el cálculo de las constantes de formación del complejo 2:1 ($\lambda_{máxima} = 555$ nm) de **6** con gabapentina.

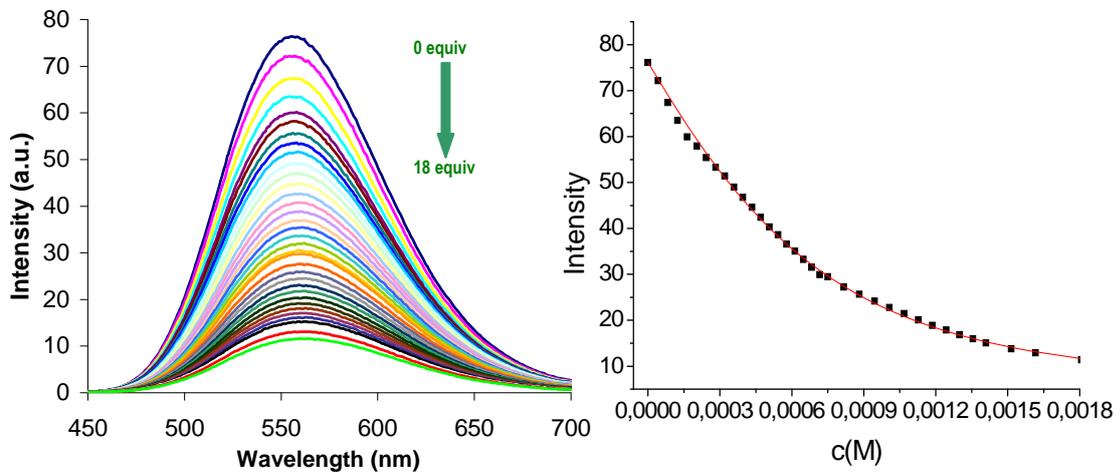


Figura 40: Izquierda: Espectros de emisión para la valoración fluorimétrica de **6** (10^{-4} M en DMSO) con pregabalina (en H_2O) ($\lambda_{excitación} = 426$ nm). **Derecha:** Ajustes para el cálculo de las constantes de formación del complejo 2:1 ($\lambda_{máxima} = 554$ nm) de **6** con pregabalina.

Una vez realizados los estudios mediante ajustes no lineales, obteniendo resultados que confirmaban un ajuste ML (2:1), se buscó la confirmación de estos a través del método de Job's Plot. En este caso, tras realizar las correspondientes medidas de fluorescencia, se representa de nuevo el valor del producto de la intensidad de la fluorescencia por la concentración del analito, frente a la fracción molar de analito (gabapentina). Los análisis de Job's Plot realizados con este aminoácido confirman que la estequiometría propuesta es la correcta ya que el máximo aparece a un 66% de fracción molar.

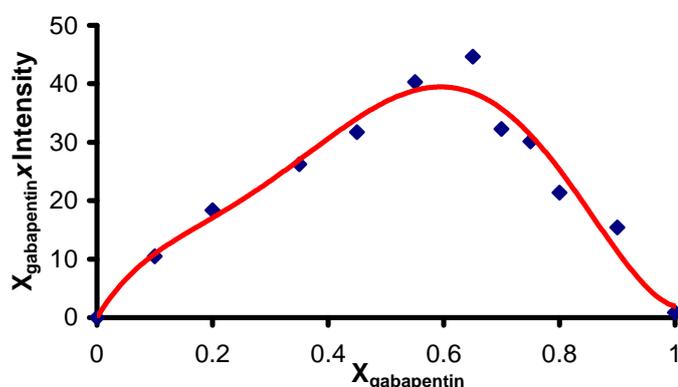


Figura 41: Análisis por el método Job's Plot para la valoración en fluorescencia del producto **6** (10^{-4} M en DMSO) con gabapentina ($\lambda_{\text{excitación}} = 350$ nm) ($\lambda_{\text{emisión}} = 515$ nm).

En el resto de los casos, las valoraciones fluorimétricas realizadas sobre creatina han permitido ajustar los resultados a un modelos no lineal de complejación 1:1 y en el caso de carnitina, a un modelos no lineal de complejación 2:1, (Tabla 5).

6	Gabapentina	Pregabalina	Creatina	Carnitina
Log K_1	3.91 ± 0.29	2.90 ± 0.03	3.33 ± 0.02	4.01 ± 0.13
Log K_2	3.01 ± 0.26	3.06 ± 0.09		3.80 ± 0.06

Tabla 5: Constantes de formación obtenidas de las valoraciones fluorimétricas de **6** en DMSO con fármacos y metabolitos en agua.

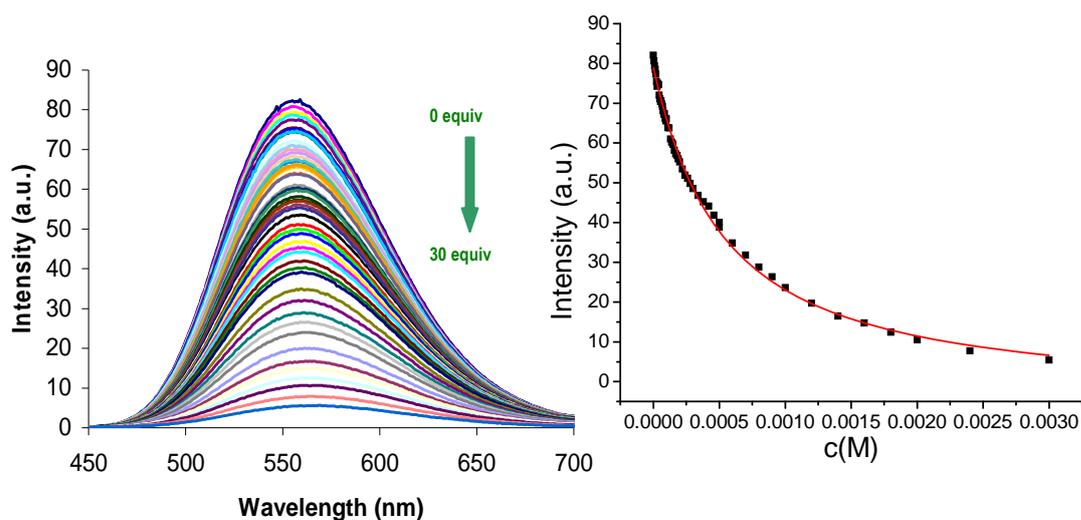


Figura 42: Izquierda: Espectro de emisión para la valoración fluorimétrica de **6** (10^{-4} M en DMSO) con creatina (en H_2O) ($\lambda_{excitación} = 428$ nm). Derecha: Ajustes para el cálculo de las constantes de formación del complejo 1:1 ($\lambda_{máxima} = 557$ nm) de **6** con creatina.

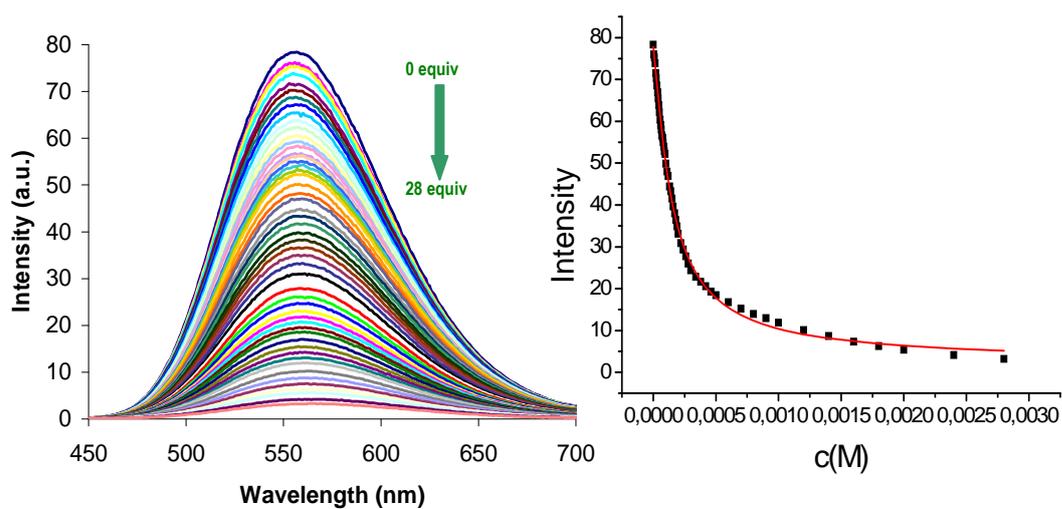


Figura 43: Izquierda: Espectro de emisión para la valoración fluorimétrica de **6** (10^{-4} M en DMSO) con *L*-carnitina (en H_2O) ($\lambda_{excitación} = 426$ nm). Derecha: Ajustes para el cálculo de las constantes de formación complejo 2:1 ($\lambda_{máxima} = 555$ nm) de **6** con *L*-carnitina

Una vez realizados los estudios mediante ajustes no lineales, obteniendo resultados que confirmaban un ajuste ML (2:1), se buscó la confirmación de estos a través del método de Job's Plot. En este caso, tras realizar las correspondientes medidas de fluorescencia, se representa de nuevo el valor del producto de la intensidad de la fluorescencia por la concentración del analito, frente a la fracción molar de analito (*L*-carnitina). El análisis de Job's Plot realizado confirma el modelo 2:1 propuesto, en él puede apreciarse un máximo al 66% de la fracción molar para el complejo con *L*-carnitina.

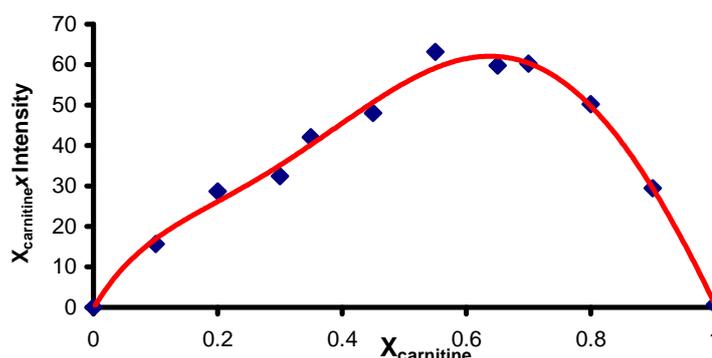


Figura 44: Análisis por el método Job's Plot para las valoraciones en fluorescencia del producto **6** (10^{-4} M en DMSO) con *L*-carnitina en agua ($\lambda_{\text{excitación}} = 350$ nm) ($\lambda_{\text{emisión}} = 515$ nm)

Se han calculado los límites de detección para disoluciones 10^{-4} M de **6** en DMSO a partir de las medidas realizadas en fluorescencia, siguiendo el método de la variabilidad del blanco,³³ obteniéndose los siguientes resultados:

1.93×10^{-7} M para *L*-asparagina.

3.09×10^{-6} M para GABA.

1.38×10^{-6} M para *L*-carnitina.

³³ D. L. Massart, B. G. M. Vandeginste, L. M. C. Buydens, S. De Jong, P. J. Lewi, J. Smeyers-Verbeke, "Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A", Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 1997, Chapt. 13, 379.

ESTUDIO MEDIANTE VALORACIÓN POR RMN-¹H

Con el fin de estudiar las variaciones estructurales que se producen en el proceso de reconocimiento entre la sonda fluorogénica y el analito se llevaron a cabo una serie de estudios mediante resonancia magnética nuclear de protón, utilizando una disolución 10⁻¹ M de **6** en DMSO, y realizando la valoración con β-alanina.

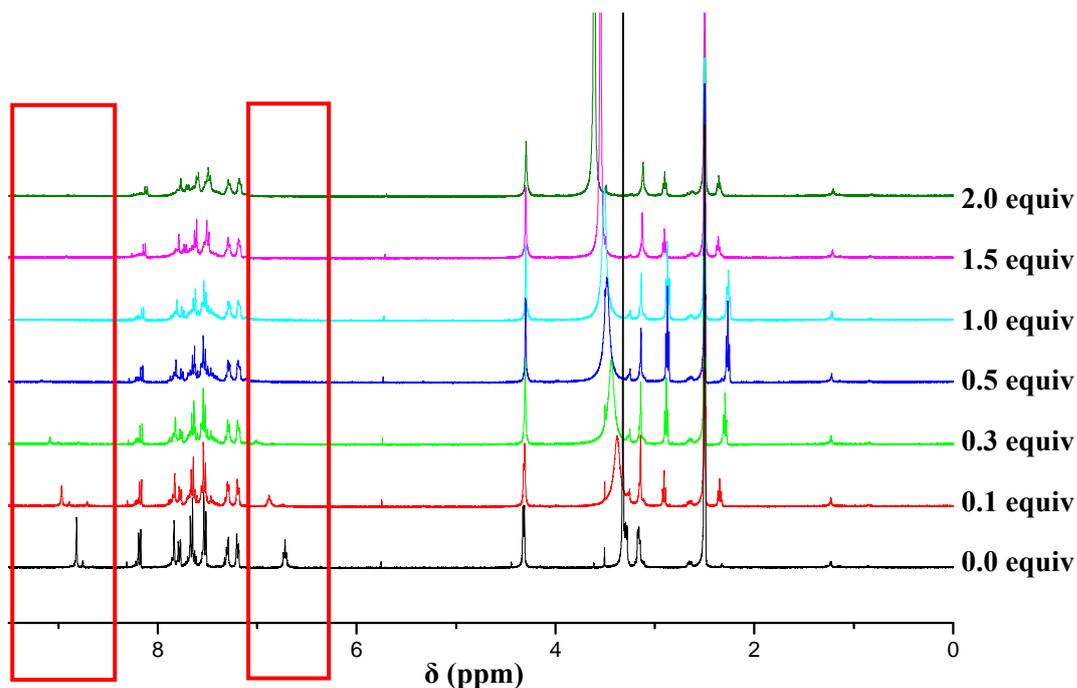


Figura 45: Valoración mediante RMN ¹H de **6** (10⁻¹ M en DMSO-*d*₆) con β-alanina en D₂O.

La adición de cantidades crecientes de β-alanina genera un desplazamiento de las dos señales de los NH de las ureas a δ 8.8 y 6.7 hacia campos más bajos; estas señales van desapareciendo progresivamente a medida que los puentes de hidrógeno se van formando. Las señales aromáticas se vuelven más complicadas de analizar, pero parece que en cualquier caso su desplazamiento no cambia. Aparentemente, la formación primero de la especie 1:1 y posteriormente de la 2:1 afecta directamente a los protones de las ureas mientras que restringe el movimiento de los anillos aromáticos, complicando las señales.

CÁLCULOS MECANOCUÁNTICOS

Se ha realizado un estudio teórico mediante GAUSSIAN 03 de optimización de la geometría del complejo 1:1 entre **6** y GABA con la presencia de 3 moléculas de disolvente DMSO; estas tres moléculas de disolvente son necesarias para estabilizar la estructura zwitteriónica del aminoácido, ya que si se realizan los cálculos sin la presencia de disolvente se llega a estructuras en las que se encuentra un nuevo puente de hidrógeno entre el grupo amonio y el carboxilato, con transferencia de protón entre el grupo amino y el carboxilato. Los cálculos convergen en una estructura con cuatro puentes de hidrógeno entre los protoners NH de las ureas y el grupo carboxilato, resultado que está de acuerdo con los resultados observados en la valoración de RMN-¹H y que da cuenta de las interacciones que dan lugar al efecto de regla molecular, en que el cambio de fluorescencia de amarillo a azul es función de la distancia entre los grupos carbonilo y amino de la molécula.

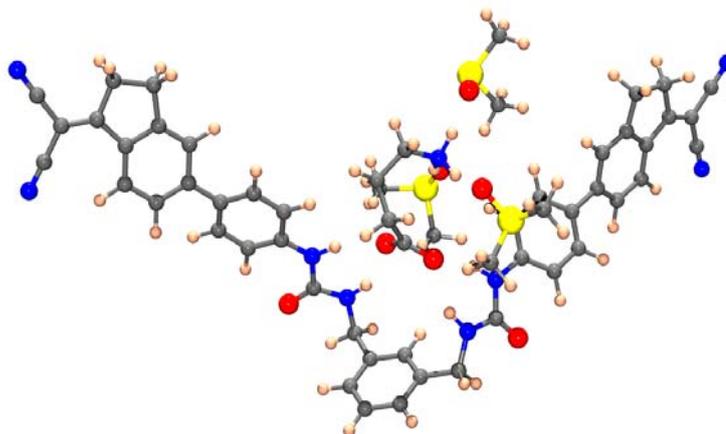


Figura 46a. Geometría optimizada del complejo **6**:GABA:3DMSO obtenida mediante cálculos ONIOM (B3LYP/6-31G*:AM1) en GAUSSIAN 03.

También se ha obtenido, para comparación, la estructura del complejo 1:1 formado por la sonda fluorogénica **6** y el fármaco pregabalina, con tres moléculas de disolvente DMSO, tal como puede verse en la figura siguiente.

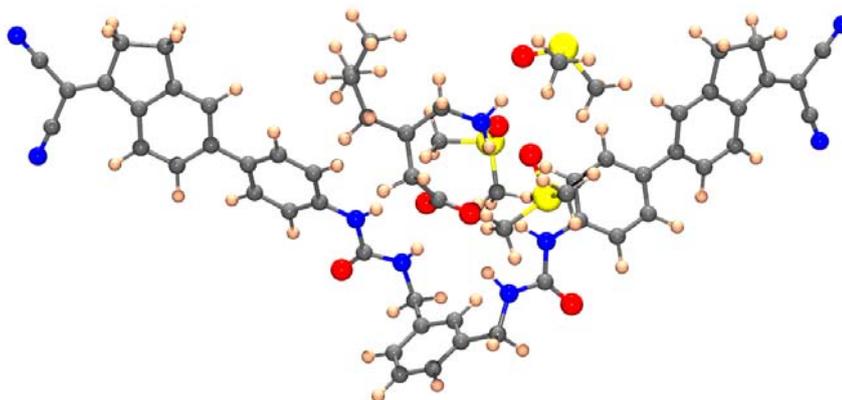


Figura 46b. Geometría optimizada del complejo 6:pregabalina-3DMSO obtenida mediante cálculos ONIOM (B3LYP/6-31G*:AM1) en GAUSSIAN 03.

En conjunto, el proceso podría describirse como una inserción sobre el fluoróforo inicial, con fluorescencia amarilla debida probablemente al excímero formado por las dos unidades fluorogénicas cercanas. Después de la inserción del carboxilato el complejo formado separa los dos grupos fluorogénicos lo que, unido a la perturbación debida a la formación de los puentes de hidrógeno, desplaza la emisión fluorescente hacia el azul, tal como puede verse en la figura siguiente.



Figura 46c: Modelo de detección de carboxilatos de la sonda fluorogénica 6

Como prueba del modelo propuesto existe el hecho de que el compuesto 8 tiene una menor fluorescencia y no muestra ningún tipo de selectividad en la detección de carboxilatos, aunque en presencia de los aniones normales se comporta de forma parecida al compuesto 6.

Todos los cálculos se han realizado con Gaussian 03, utilizando el método ONIOM.³⁴ Las optimizaciones geométricas se han realizado utilizando un procedimiento ONIOM a dos niveles,^{35,36} en que el funcional híbrido B3LYP,^{37,38} junto con el sistema de bases 6-31G+(d,p) ha sido utilizado al nivel más alto de teoría y el modelo semiempírico AM1,³⁹ se ha utilizado al nivel de teoría más bajo. Después de la optimización se realizó el cómputo analítico de la matriz Hessian para localizar el mínimo en la superficie de energía potencial. La distribución de los tipos de cálculo computacional en el sistema ONIOM(MO:MO) de dos capas se muestra en la figura siguiente.

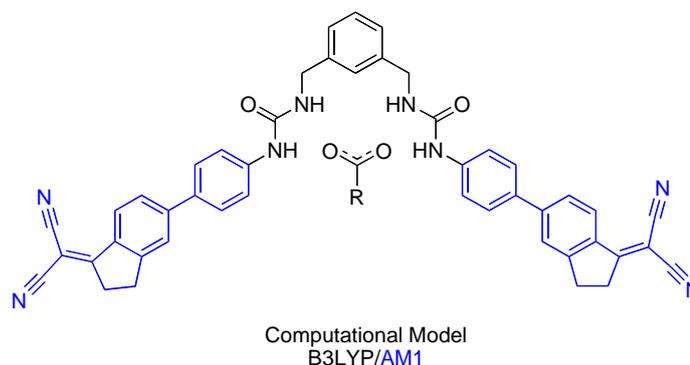


Figura 47 Modelo computacional ONIOM a dos niveles.

³⁴ M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, J. J. A. Montgomery, T. Vreven, K. N. Kudin, J. C. Burant, J. M. Millam, S. S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J. E. Knox, H. P. Hratchian, J. B. Cross, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, P. Y. Ayala, K. Morokuma, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, V. G. Zakrzewski, S. Dapprich, A. D. Daniels, M. C. Strain, O. Farkas, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, Q. Cui, A. G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, C. Gonzalez, J. A. Pople, *Gaussian 03, Revision C.02*, Gaussian, Inc., Wallingford CT, **2004**.

³⁵ S. Humbel, S. Sieber, K. Morokuma, *J. Chem. Phys.* **1996**, *105*, 1959.

³⁶ F. Maseras, K. Morokuma, *J. Comput. Chem.* **1995**, *16*, 1170.

³⁷ A. D. Becke, *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 5648.

³⁸ C. T. Lee, W. T. Yang, R. G. Parr, *Phys. Rev. B* **1988**, *37*, 785.

³⁹ M. J. S. Dewar, E. G. Zoebisch, E. F. Healy, J. J. P. Stewart, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 3902.

Cuando se realiza el seguimiento de la variación de fluorescencia, excitando a 390 nm, se observa experimentalmente la disminución de la banda que corresponde al color amarillo. Por otro lado, si se excita a 366 nm se puede comprobar la emisión de fluorescencia en el rango del azul. Para obtener el espectro de emisión de color azul, se ha realizado una valoración a $\lambda_{exc} = 390$ nm, seguida de una nueva excitación a $\lambda_{exc} = 366$ nm, más un proceso de deconvolución de bandas, con el fin de comprobar en el fluorímetro la existencia de la banda de emisión azul con el máximo en $\lambda_{emisión} = 475$ nm observada después de la adición del analito (Figura 48).

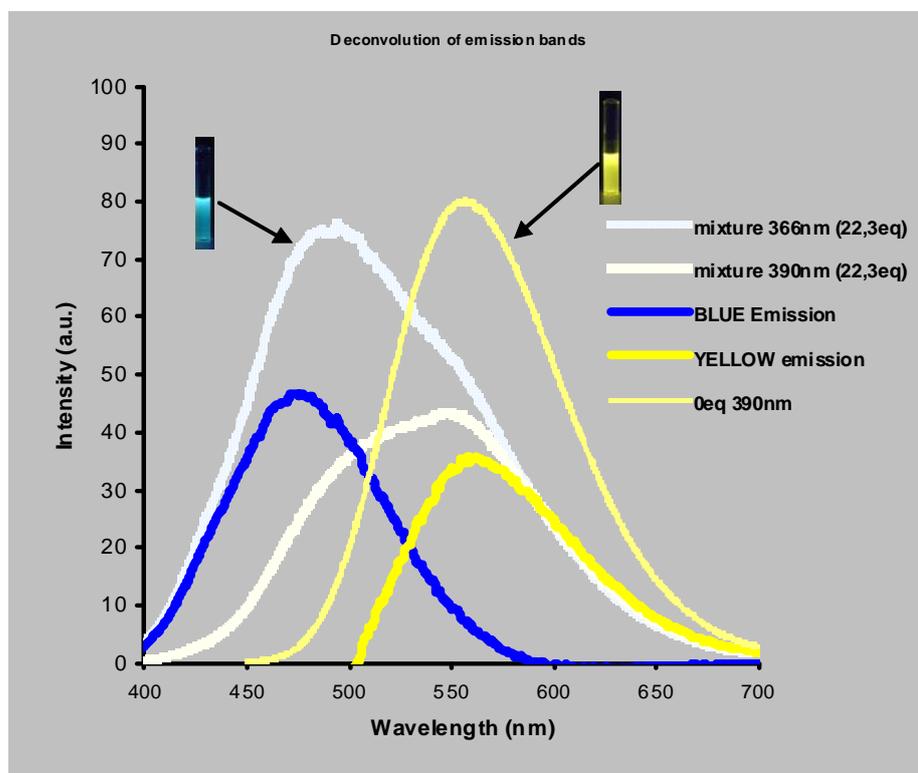


Figura 48: Deconvolución de las bandas de emisión a distintas longitudes de onda de excitación.

0 eq. 390 nm: Espectro original de fluorescencia a $\lambda_{exc} = 390$ nm de **6** (10^{-4} M en DMSO).

Mixture 390 nm (22.3 equiv): Espectro de fluorescencia a $\lambda_{exc} = 390$ nm después de la adición de 22.3 equivalentes de *L*-carnitina a la disolución anterior.

Mixture 366 nm (22.3 equiv): Espectro de fluorescencia a $\lambda_{\text{exc}} = 366$ nm de la misma mezcla usada en la adquisición del espectro anterior.

BLUE Emission: Espectro de fluorescencia de la emisión azul, obtenido por sustracción del espectro de emisión amarilla obtenido a $\lambda_{\text{exc}} = 390$ nm del espectro de emisión azulada obtenido a $\lambda_{\text{exc}} = 366$ nm de la mezcla de **6** y 22.3 equivalentes del analito ($\lambda_{\text{max}} = 475$ nm).

YELLOW Emission: Espectro de emisión fluorescente amarilla obtenido por sustracción del espectro de emisión azul, obtenido a $\lambda_{\text{exc}} = 366$ nm, del espectro de emisión obtenido a $\lambda_{\text{exc}} = 366$ nm de la mezcla de **6** y 22.3 equivalentes del analito.

CONCLUSIONES:

De los resultados experimentales obtenidos en este capítulo se pueden sacar las siguientes conclusiones:

Se ha puesto a punto una sonda fluorescente para derivados de ω -aminoácidos que se comporta como una regla molecular, cambiando la emisión fluorescente amarilla inicial en azul en función de la distancia entre el grupo amino terminal y el grupo carboxilato del analito.

La sonda fluorescente es suficientemente selectiva como para que sirva para la detección de ω -aminoácidos y sus metabolitos encontrados en suplementos nutricionales, así como fármacos relacionados con ellos, como pregabalina o gabapentina, a partir de sus formulaciones farmacéuticas comerciales.

**PARTE III. PREPARACIÓN DE
SONDAS FLUOROGÉNICAS
PARA LA DETECCIÓN DE
AMINOÁCIDOS Y SUS
METABOLITOS**

TAREA 2: PREPARACIÓN DE SONDAS FLUOROGÉNICAS PARA LA DETECCIÓN DE AMINAS BIOGÉNICAS

RESULTADOS EXPERIMENTALES: En segundo lugar se va a realizar el estudio de las sondas fluorogénicas mostradas en la figura siguiente, en que cada una de las unidades coordinantes se encuentra unida a una estructura aromática, por lo que se medirán las variaciones fotofísicas debidas a la coordinación en presencia de varias series de metabolitos relacionados.

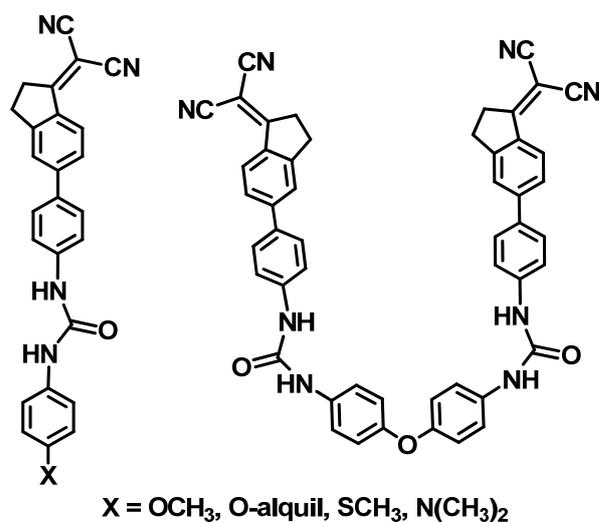
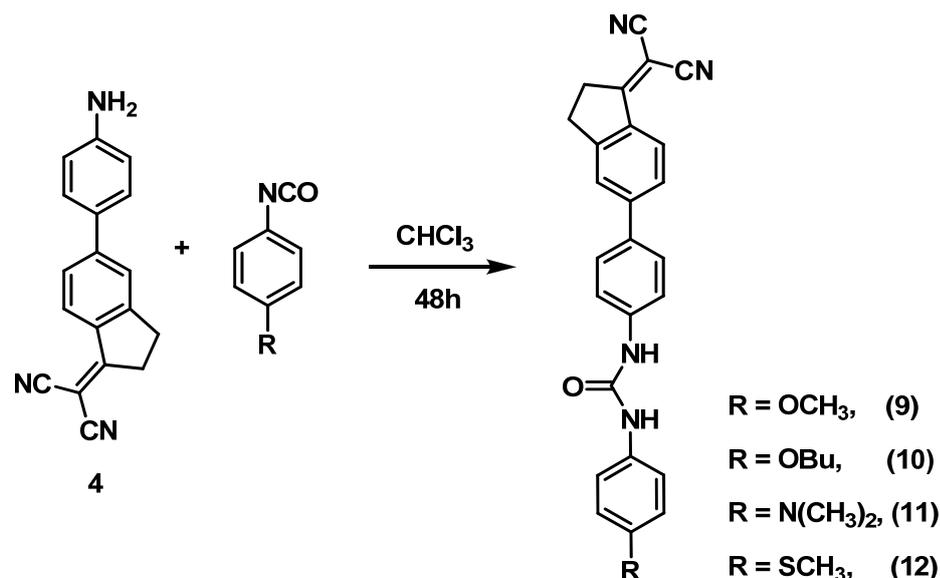


Figura 49: Sondas fluorogénicas proyectadas.

En estas dos sondas los grupos fluorogénicos están aislados o suficientemente alejados como para actuar de forma independiente con el metabolito correspondiente.

En primer lugar, se sintetizó la serie de diarilureas que lleva grupos dadores de electrones en la posición *para* del anillo aromático que no pertenece al grupo fluorogénico. En cada caso, la síntesis se llevó a cabo mediante reacción de la amina **4** con cada uno de los correspondientes isocianatos en cantidades equimoleculares, mediante agitación en cloroformo durante dos días a temperatura ambiente, con lo que se obtuvieron las diarilureas con rendimientos aceptables, 57–77% (Esquema 1)



Esquema 5

Las cuatro nuevas ureas obtenidas presentan variaciones significativas de la fluorescencia en presencia de varios aniones: fluoruro, benzoato, fosfato, acetato o cianuro en disolución de MeCN. La figura 50 muestra un ejemplo significativo, anión benzoato.

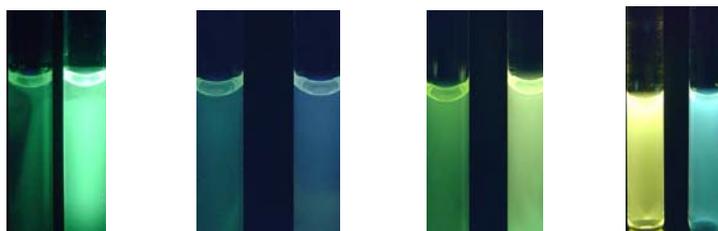


Figura 50: Disolución 10^{-4} M de **9**, **10**, **11** y **12** en MeCN +1 equivalente de BzO^- : (izquierda) Ref, (derecha) BzO^- ($\lambda_{\text{exc}} = 366 \text{ nm}$)

En varios casos el aumento de la fluorescencia es muy acusado, aunque en todos los ejemplos estudiados el cambio de fluorescencia generado se extingue con el tiempo. El proceso de disminución de la fluorescencia es, en general, bastante rápido, extinguiéndose en menos de un minuto en todos los casos estudiados excepto en el caso del *p*-metoxifenil derivado **9**, mostrado en la figura, por lo que se ha estudiado con detalle el proceso en este compuesto especialmente.

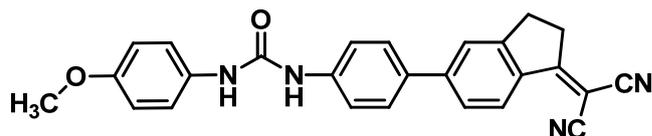


Figura 51: Estructura del compuesto **9**

El compuesto **9** se obtiene con un rendimiento del 74 % en forma de sólido amarillo oscuro, con un máximo de absorbancia $\lambda_{\text{max}}^{\text{abs}} = 365 \text{ nm}$ y un coeficiente de extinción molar $\epsilon = 15700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ en disolución de acetonitrilo. Una vez obtenido, se realizaron una serie de pruebas de detección con el compuesto **9** (10^{-4} M disuelto en DMSO) con una serie de aniones disueltos en MeCN. Mediante adición de cada uno de los aniones, la disolución inicial pierde el color amarillo característico al mismo tiempo que aumenta significativamente la fluorescencia en presencia de los siguientes aniones: F^- , BzO^- , H_2PO_4^- , HSO_4^- , AcO^- y CN^- .

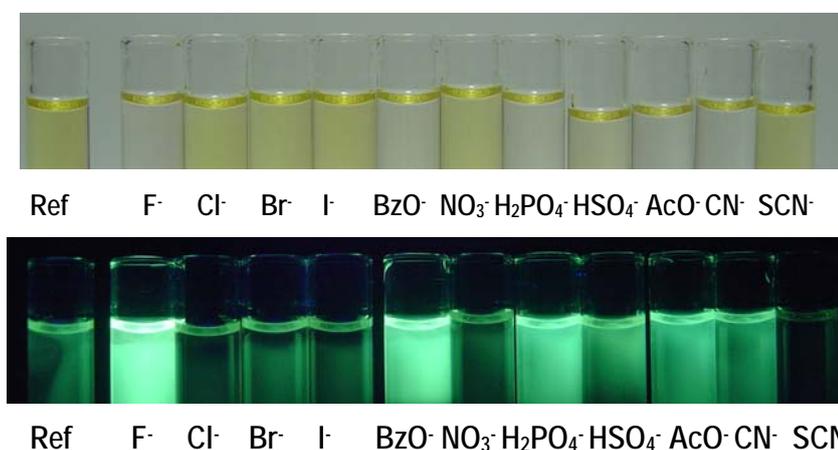


Figura 52: Efecto de la adición sobre una disolución 10^{-4} M de **9** en DMSO de 1 equivalente de cada uno de los aniones. Arriba, luz blanca. Abajo: $\lambda_{\text{exc}} = 366 \text{ nm}$

Al tratarse de un compuesto que no es fluorescente en disolución, y debido al elevado aumento de la fluorescencia observado a simple vista bajo la lámpara UV, se realizó el cálculo del rendimiento cuántico en presencia de un anión característico, como es el BzO^- , con el que se observó un gran aumento de la fluorescencia. Así el rendimiento cuántico para la especie formada por la diarilurea **9** y 1 equivalente de BzO^- en disolución de DMSO es $\Phi = 0.4$.

Como puede apreciarse, la diarilurea no presenta gran selectividad, ya que el aumento de la fluorescencia se produce con seis aniones distintos, aunque ese cambio no tiene la misma intensidad en todos ellos. En cualquier caso, con el fin de estudiar el proceso de generación de la fluorescencia, se realizó una valoración fluorimétrica de **9** (10^{-4} M en DMSO) con anión BzO^- disuelto en MeCN (Figura 53)

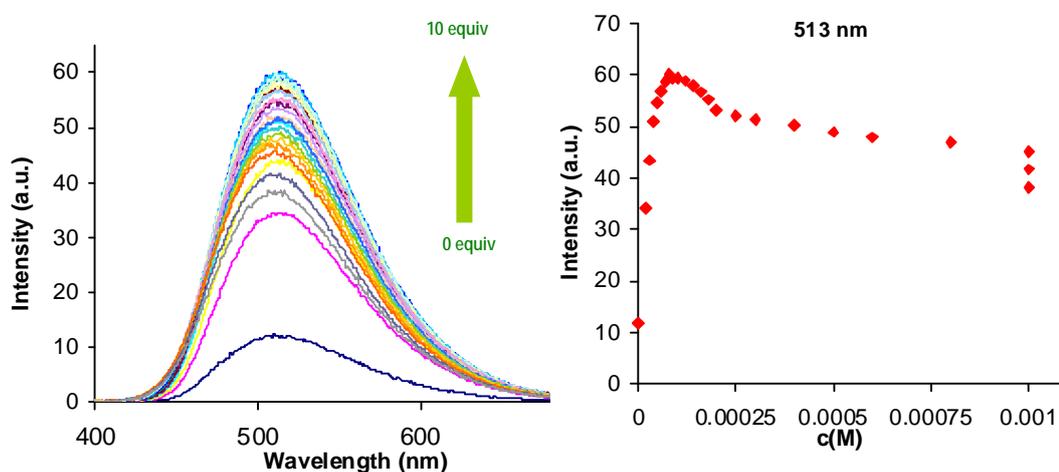


Figura 53: Izquierda: Espectro de emisión para la valoración fluorimétrica de la diarilurea (10^{-4} M en DMSO) con BzO^- (en MeCN) ($\lambda_{\text{excitación}} = 312$ nm). Derecha: Representación del aumento de fluorescencia con respecto a la concentración de ión BzO^- ($\lambda_{\text{máxima}} = 513$ nm)

En este caso, el ajuste a cualquiera de los modelos lineales propuestos no es posible, ya que la valoración tiene una curva característica en la cual se observa cómo a partir de un equivalente la intensidad de la fluorescencia disminuye y también se aprecia cómo la fluorescencia disminuye con el tiempo (cosa que se aprecia a simple vista bajo la lámpara) ya que los tres últimos puntos están tomados a distintos tiempos pero sin variar la concentración de analito añadida.

Para hacer una aproximación al tipo de complejación que se produce se realiza a continuación un análisis siguiendo el método de job's Plot, para el cual se prepara cada una de las disoluciones de forma independiente; de este modo se elimina el efecto del tiempo, ya que para todas las muestras transcurre el mismo tiempo entre la adición y la medida.

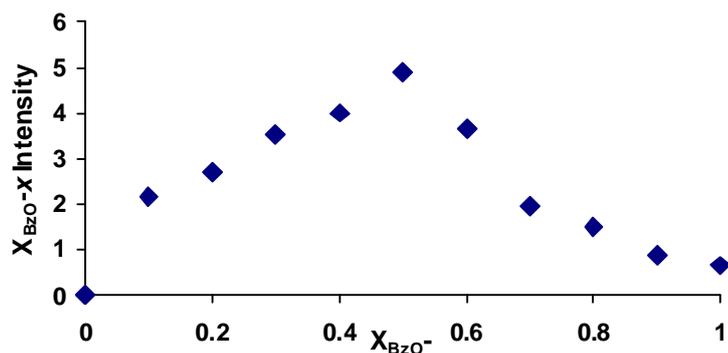


Figura 54: Job's Plot para la diarilurea **9** en DMSO con anión BzO^- ($\lambda_{\text{excitación}} = 312 \text{ nm}$) ($\lambda_{\text{emisión}} = 513 \text{ nm}$)

El sistema muestra el máximo a 1 equivalente de anión, que se corresponde con la formación de un complejo 1:1.

ESTUDIO MEDIANTE VALORACIÓN POR RMN- ^1H DEL COMPUESTO

9: Con el fin de intentar dilucidar el mecanismo por el que transcurre la interacción que da lugar a la emisión de fluorescencia, a continuación se llevaron a cabo una serie de estudios de valoración del compuesto con anión benzoato, mediante resonancia magnética nuclear de protón, utilizando una disolución 10^{-1} M de **9** en $\text{DMSO-}d_6$ que se valoró con BzO^- en el mismo disolvente. En los espectros correspondientes a la valoración pueden observarse las variaciones estructurales que se producen en el proceso de reconocimiento entre la diarilurea y el anión en estudio (Figura 55).

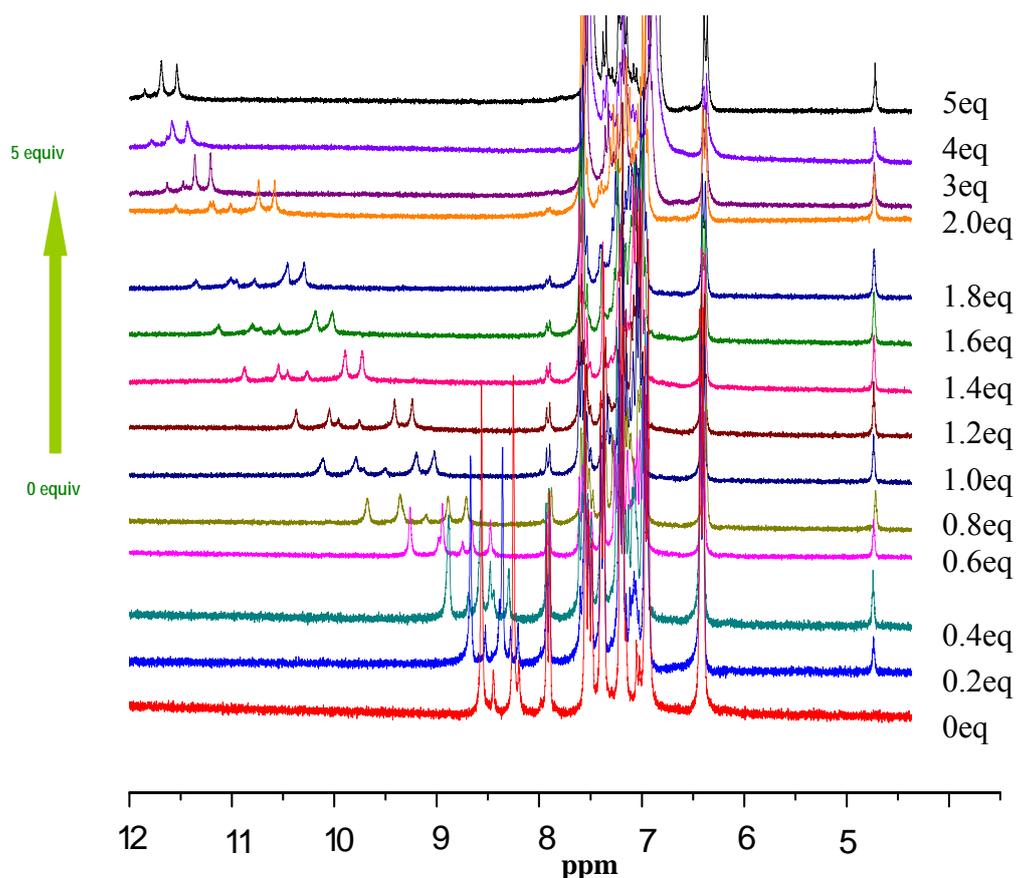
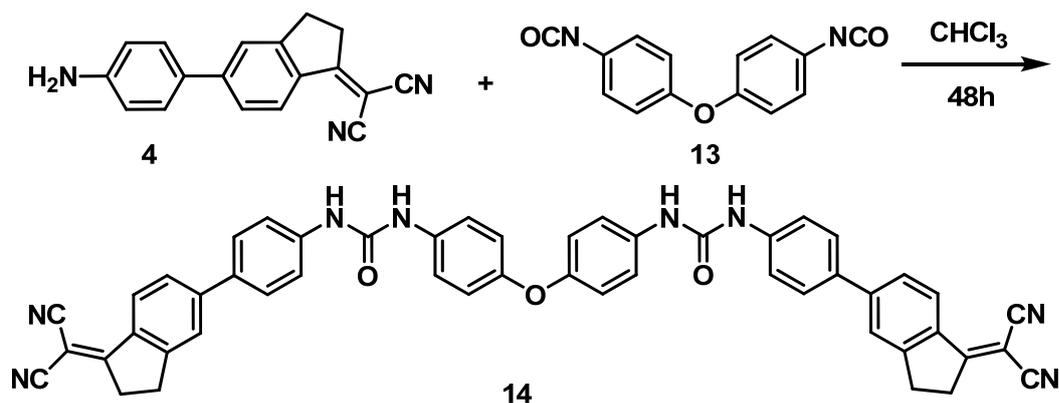


Figura 55

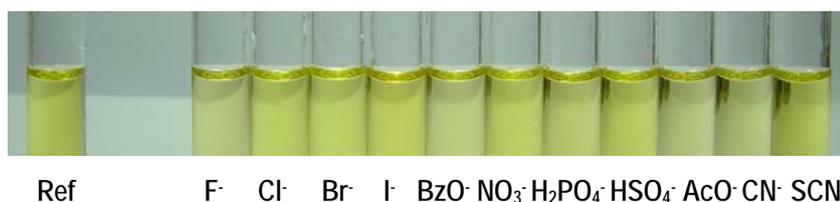
La adición de cantidades crecientes de BzO^- genera un desplazamiento de las dos señales de NH de las ureas a δ 8.85 y 8.56 hacia campos más bajos; progresivamente estas señales van desapareciendo a medida que los puentes de hidrógeno se van formando, apareciendo dos nuevas señales de NH de urea junto a las anteriores, pero a campos algo más altos, que son las que permanecen después de la adición de varios equivalentes de anión. Las señales aromáticas se vuelven más complicadas de analizar, pero parece que en cualquier caso su desplazamiento no cambia, como tampoco cambia la señal correspondiente a los protones del grupo metoxilo, por lo que aparentemente el único tipo de interacción que es visible es el puente de hidrógeno del carboxilato con el grupo urea.

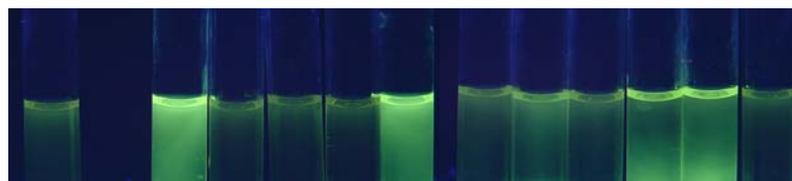
En cualquier caso, esta urea no presenta una gran selectividad. Se buscó incrementar la complejidad del sistema receptor buscando así mejorar este aspecto. Así, se sintetizó una nueva bis-diarilurea **14** mediante reacción del isocianato bisisocianatofenil éter **13** y la amina **4**, bajo agitación en cloroformo a temperatura ambiente durante dos días, obteniéndose un sólido amarillo oscuro con un 77 % de rendimiento.



Esquema 6

La nueva bis-diarilurea presenta un color amarillo en disolución en los disolventes orgánicos más comunes, con un máximo de absorbancia $\lambda_{\text{max}}^{\text{abs}} = 390 \text{ nm}$ y un coeficiente de extinción molar $\epsilon = 17200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ en DMSO. A continuación se realizaron una serie de pruebas de detección con el compuesto **14** disuelto en DMSO (10^{-4} M) y una serie de aniones en disolución acuosa. La disolución inicial pierde levemente algo del color amarillo característico al mismo tiempo que aumenta la fluorescencia en presencia de los aniones: F^- , BzO^- , AcO^- y CN^- .





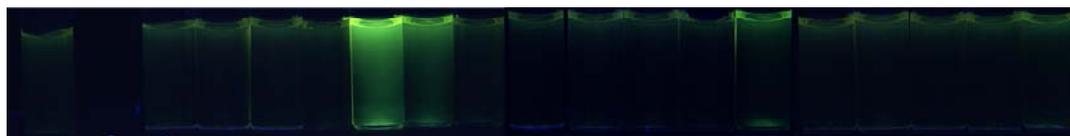
Ref F⁻ Cl⁻ Br⁻ I⁻ BzO⁻ NO₃⁻ H₂PO₄⁻ HSO₄⁻ AcO⁻ CN⁻ SCN⁻

Figura 56: Efecto de la adición sobre una disolución 10^{-4} M de **14** en DMSO de 1 equivalente de cada uno de los aniones en agua. Arriba, luz blanca. Abajo: $\lambda_{\text{exc}} = 366$ nm

Las respuestas que se aprecian siguen los patrones observados anteriormente con las diarilureas anteriores, cambios con los aniones con grupos carboxilato además de con F⁻ y con CN⁻.

ESTUDIOS DE DETECCIÓN DE AMINOÁCIDOS

Dado que la sonda estudiada es especialmente sensible a iones carboxilato, a continuación se realizó un estudio de interacción de la sonda fluorogénica disuelta en dimetilsulfóxido con una serie de 17 α -aminoácidos comunes en disolución acuosa.



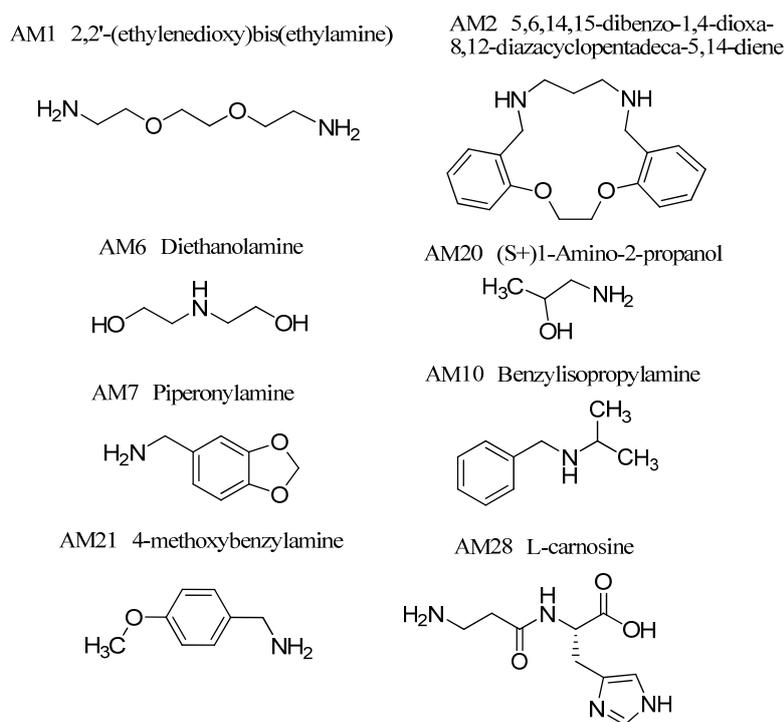
Ref., Asn, Glu, Gln, His, Lys, Arg, Asp, Gly, Thr, Trp, Cys, Pro, Val, Leu, Ile, Met, Phe

Figura 57: Incremento de fluorescencia tras añadir 2 equivalentes de cada aminoácido disuelto en H₂O sobre disoluciones 10^{-4} M de **14** en DMSO ($\lambda_{\text{excitación}} = 366$ nm)

El mayor incremento se produce con dos aminoácido básicos, especialmente frente a lisina y algo menos frente a arginina, y un incremento escaso con prolina.

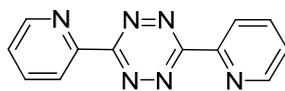
ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO DE **14** FRENTE A AMINAS

Dado que la sonda fluorogénica parece ser sensible a los grupos amino de los aminoácidos, más que a la estructura zwitteriónica en sí misma, el estudio de la selectividad de la sonda se orientó hacia grupos amino en diversas estructuras, enfrentándola con una amplia serie de aminas primarias, secundarias, arílicas, alquílicas y de otros tipos, buscando un patrón de detección común en los resultados obtenidos. Los resultados muestran incremento de la fluorescencia frente a bencilaminas y no frente a anilinas y tampoco frente a aminas que tienen grupos carbonilo próximos. Los resultados muestran respuesta frente a aminas cuya estructura recuerda a la de las aminas biogénicas y sus análogos sintéticos, y dado el gran interés que tiene este tipo de compuestos, el trabajo se orientó al estudio de la sensibilidad de **14** frente a una serie de aminas biogénicas y sus metabolitos.

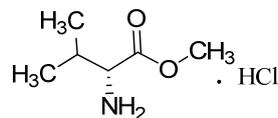


Esquema 7. Aminas que generan incremento de la fluorescencia de una disolución de **14** en DMSO [10^{-4} M de **14** en DMSO ($\lambda_{\text{excitación}} = 366$ nm)]

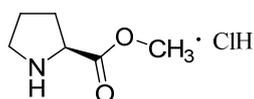
AM12 3,6-Di-(2-pyridyl)-1,2,4,5-tetrazine



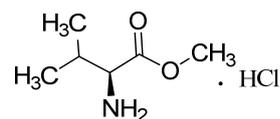
AM27 D-valine methyl ester hydrochloride



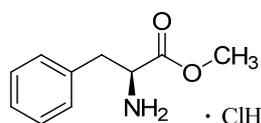
AM19 L-Proline methyl ester hydrochloride



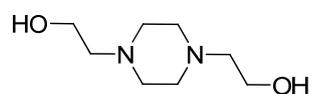
AM26 L-valine methyl ester hydrochloride



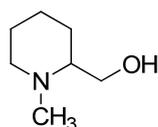
AM25 L-Phenylalanine methyl ester hydrochloride



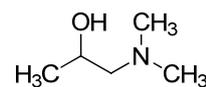
AM17 1,4-Bis(2-hydroxyethyl)piperazine



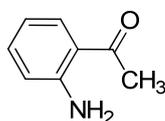
AM14 1-Methyl-2-piperidinemethanol



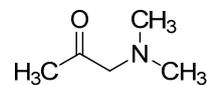
AM18 1-Dimethylamino-2-propanol



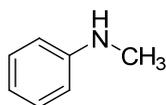
AM9 2'-Aminoacetophenone



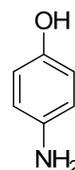
AM13 (Dimethylamino)acetone



AM3 N-Methylaniline

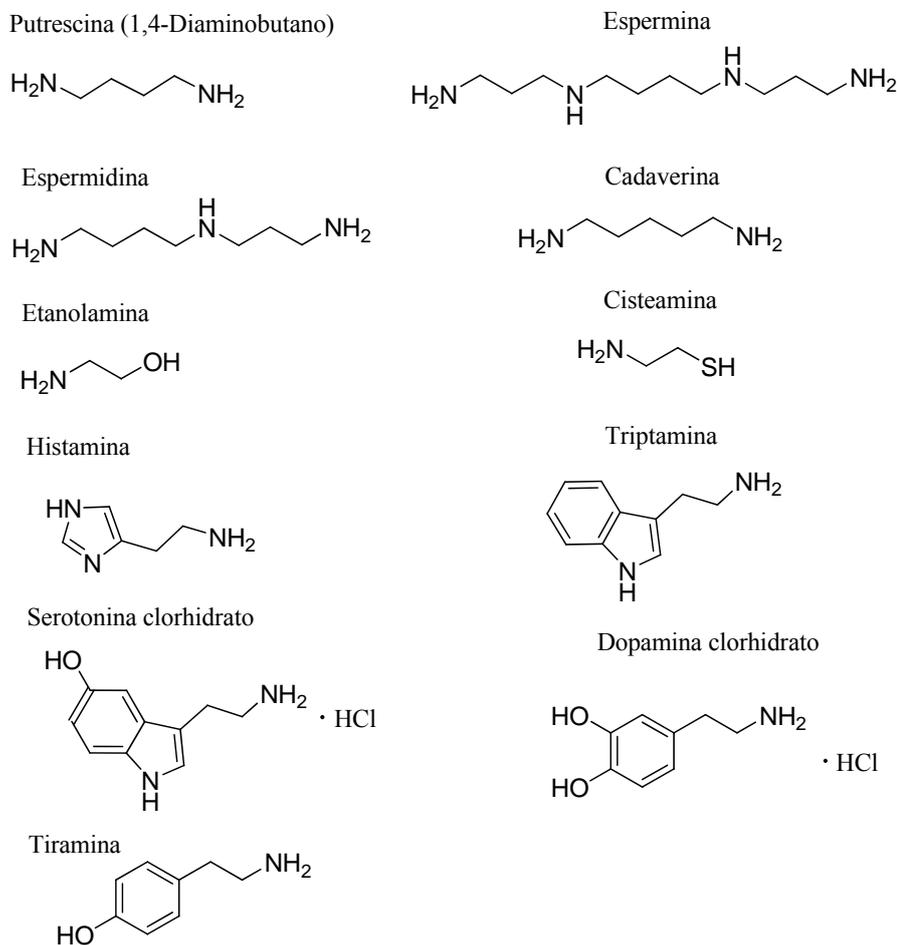


AM24 4-aminophenol



Esquema 8. Aminas que no generan incremento de la fluorescencia de una disolución de **14** en DMSO [10^{-4} M de **14** en DMSO ($\lambda_{\text{excitación}} = 366 \text{ nm}$)]

ESTUDIOS DE 14 FRENTE A AMINAS BIOGÉNICAS: Se eligió una serie de 11 aminas biogénicas solubles en agua.

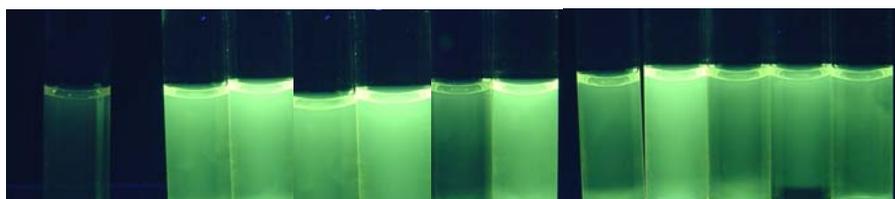


Se prepararon disoluciones 10^{-4} M de **14** en DMSO y se añadieron cantidades crecientes de cada amina biogénica disuelta en agua.



Ref, pu, esp, ser, dop, cyst, cad, his, esd, eta, trip, tir.

Figura 58a: Efecto de la adición sobre una disolución 10^{-4} M de **14** en DMSO de dos equivalentes de cada amina en H_2O bajo luz blanca.



Ref, pu, esp, ser, dop, cyst, cad, his, esd, eta, trip, tir.

Figura 58b: Efecto de la adición sobre una disolución 10^{-4} M de **14** en DMSO de dos equivalentes de cada amina en H_2O : Ref, **pu**: putrescina, **esp**: espermina, **ser**: serotonina, **dop**: dopamina, **cist**: cisteamina, **cad**: cadaverina, **his**: histamina, **esd**: espermidina, **eta**: etanolamina, **trip**: triptamina, **tir**: tiramina ($\lambda_{exc} = 366$ nm).

RENDIMIENTOS CUÁNTICOS: En los resultados cualitativos se aprecia una ligera disminución del color amarillo de la disolución inicial y un aumento en la fluorescencia con todas las aminas utilizadas, aunque en mayor proporción con unas que con otras. Para poder cuantificar la fluorescencia observada se realizó el cálculo del rendimiento cuántico de la interacción con alguna de las aminas. Al tratarse de un compuesto que no es fluorescente en disolución, el cálculo del rendimiento cuántico se realizó tras la adición de dos de las aminas en estudio, cadaverina y triptamina, con las que se observó un aumento significativo de la fluorescencia. Así el rendimiento cuántico para la especie formada por la bis-diarilurea **14** y 1 equivalente de triptamina en disolución de DMSO fue de $\Phi = 0.43$ y para la especie formada por la bis-diarilurea **14** y 1 equivalente de cadaverina en disolución de DMSO fue de $\Phi = 0.57$.

VALORACIONES FLUORIMÉTRICAS: Las valoraciones fluorimétricas realizadas mostraron un aumento de la banda de emisión ($\lambda_{m\acute{a}xima} = 515$ nm) y los ajustes realizados a modelos no lineales proporcionaron ajustes del tipo 1:1 en todos los casos.

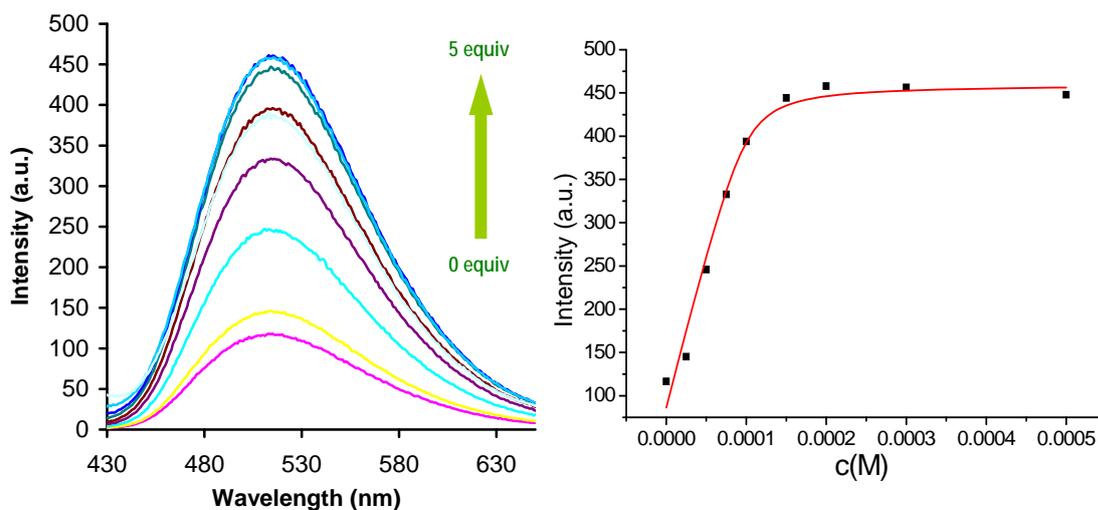


Figura 59: **Izquierda:** Espectros de emisión para la valoración fluorimétrica de la sonda **14** (10^{-4} M en DMSO) con triptamina (en H_2O) ($\lambda_{excitación} = 288$ nm). **Derecha:** Ajustes para el cálculo de la constante de formación del complejo 1:1 ($\lambda_{máxima} = 517$ nm) de **14** con triptamina.

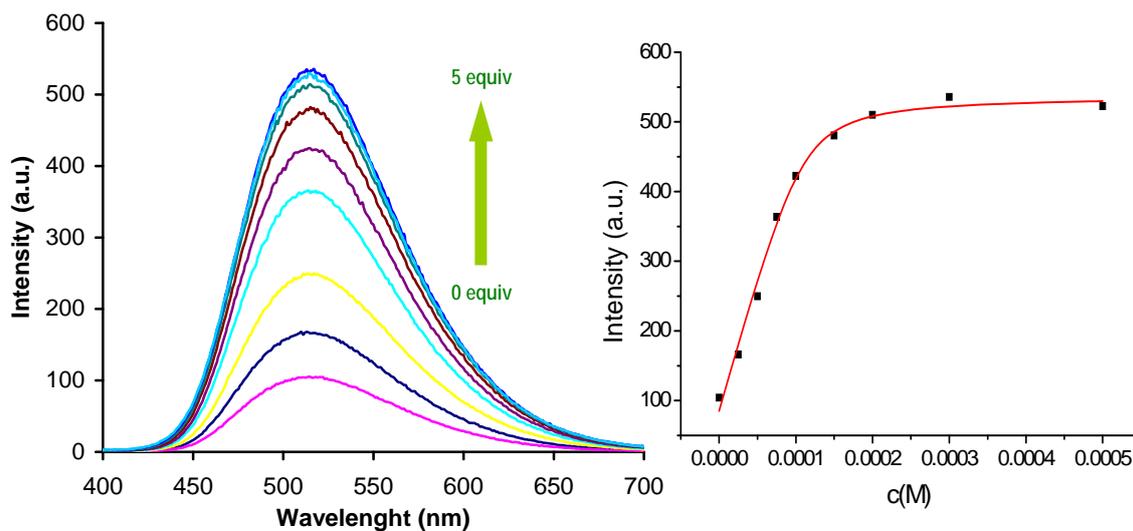


Figura 60: **Izquierda:** Espectros de emisión para la valoración fluorimétrica de **14** (10^{-4} M en DMSO) con tiramina (en H_2O) ($\lambda_{excitación} = 288$ nm). **Derecha:** Ajustes para el cálculo de la constante de formación del complejo 1:1 ($\lambda_{máxima} = 517$ nm) de **14** con Tiramina

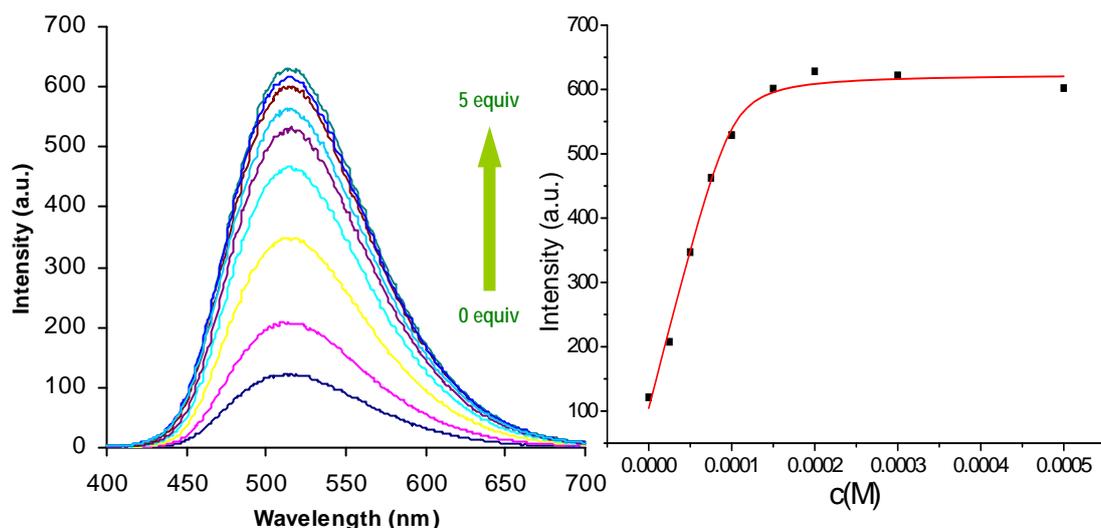


Figura 61: Izquierda: Espectros de emisión para la valoración fluorimétrica de **14** (10^{-4} M en DMSO) con putrescina (en H_2O) ($\lambda_{excitación} = 288$ nm). Derecha: Ajustes para el cálculo de la constante de formación del complejo 1:1 ($\lambda_{máxima} = 517$ nm) de **14** con putrescina.

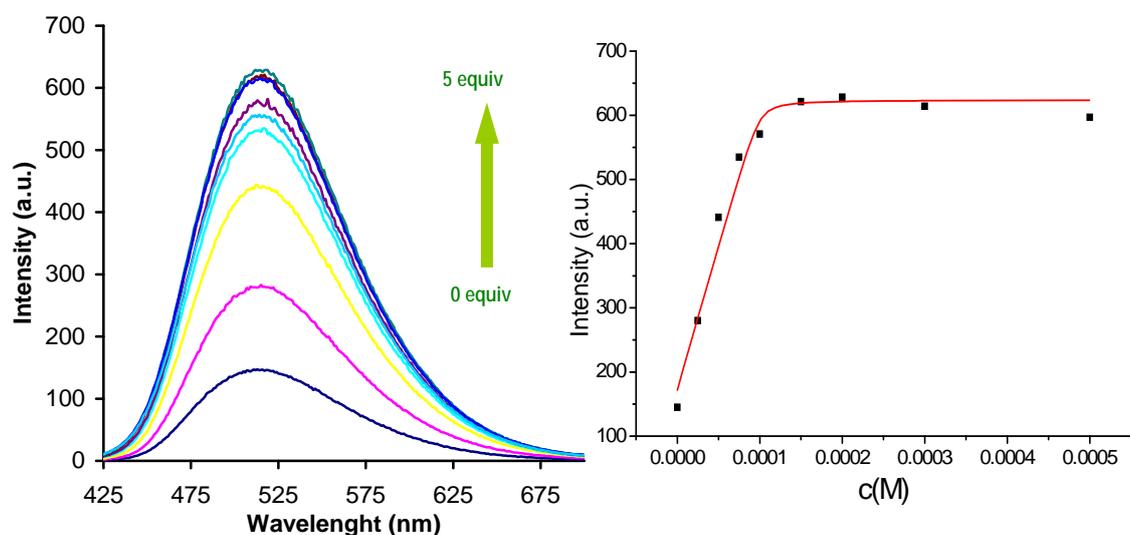


Figura 62: Izquierda: Espectros de emisión para la valoración fluorimétrica de **14** (10^{-4} M en DMSO) con cadaverina (en H_2O) ($\lambda_{excitación} = 288$ nm). Derecha: Ajustes para el cálculo de la constante de formación del complejo 1:1 ($\lambda_{máxima} = 517$ nm) de **14** con cadaverina

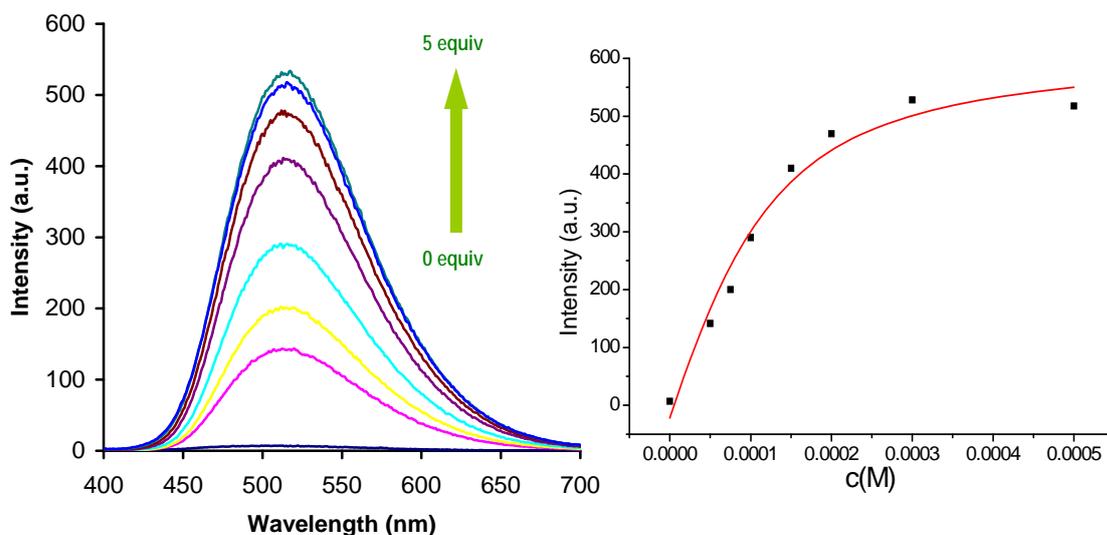


Figura 63: **Izquierda:** Espectros de emisión para la valoración fluorimétrica de **14** (10^{-4} M en DMSO) con cadaverina (en HEPES, pH 8.2) ($\lambda_{\text{excitación}} = 288$ nm). **Derecha:** Ajustes para el cálculo de la constante de formación del complejo 1:1 ($\lambda_{\text{máxima}} = 515$ nm) de **14** con cadaverina

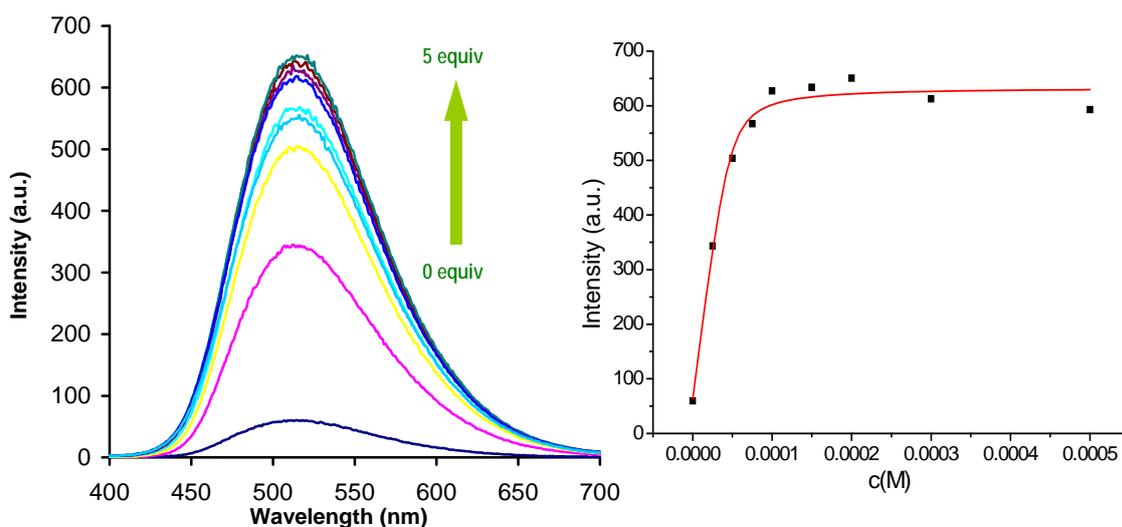


Figura 64: **Izquierda:** Espectros de emisión para la valoración fluorimétrica de **14** (10^{-4} M en DMSO) con espermidina (en H_2O) ($\lambda_{\text{excitación}} = 288$ nm). **Derecha:** Ajustes para el cálculo de la constante de formación del complejo 1:1 ($\lambda_{\text{máxima}} = 517$ nm) de **14** con espermidina.

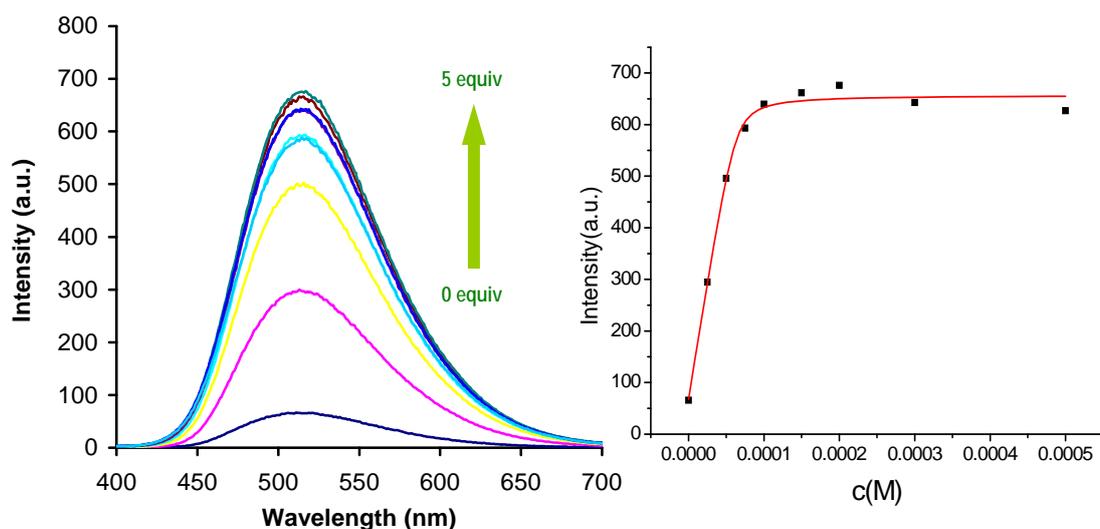


Figura 65: **Izquierda:** Espectro de emisión para la valoración fluorimétrica de **14** (10^{-4} M en DMSO) con espermina (en H_2O) ($\lambda_{excitación} = 288$ nm). **Derecha:** Ajustes para el cálculo de la constante de formación del complejo 1:1 ($\lambda_{máxima} = 517$ nm) de **14** con espermina.

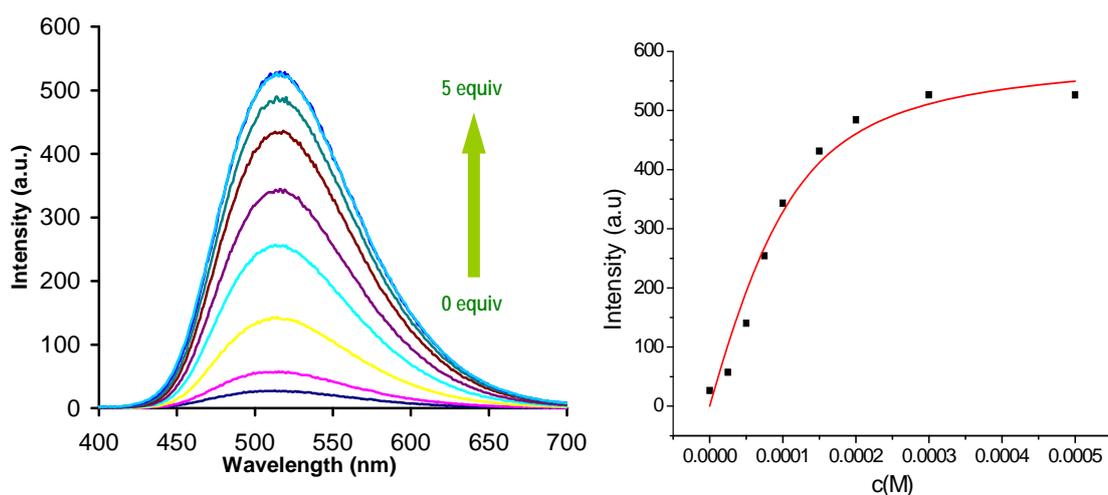


Figura 66: **Izquierda:** Espectros de emisión para la valoración fluorimétrica de **14** (10^{-4} M en DMSO) con histamina (en H_2O) ($\lambda_{excitación} = 288$ nm). **Derecha:** Ajustes para el cálculo de la constante de formación del complejo 1:1 ($\lambda_{máxima} = 517$ nm) de **14** con histamina

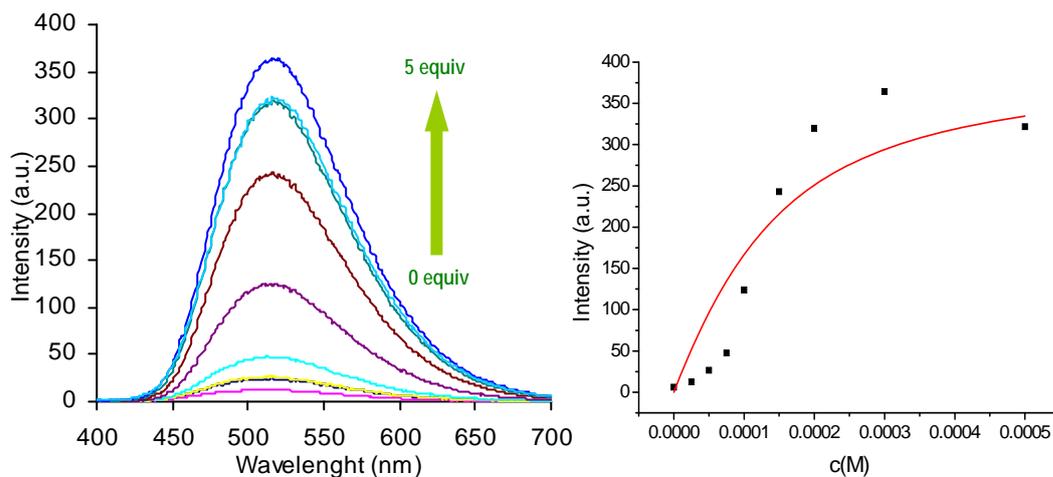


Figura 67: **Izquierda:** Espectros de emisión para la valoración fluorimétrica de **14** (10^{-4} M en DMSO) con dopamina (en H_2O) ($\lambda_{excitación} = 288$ nm). **Derecha:** Ajustes para el cálculo de la constante de formación del complejo 1:1 ($\lambda_{máxima} = 517$ nm) de **14** con dopamina.

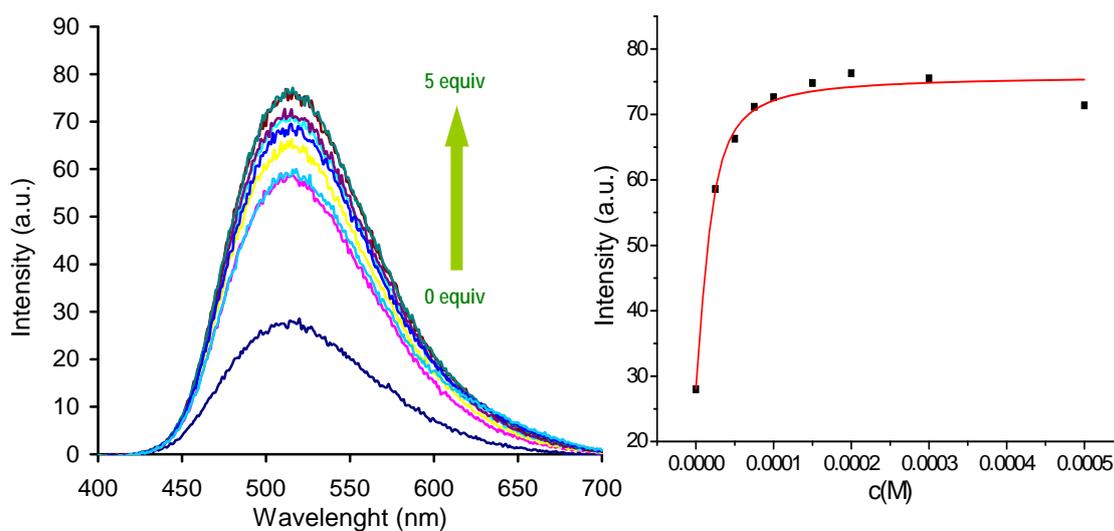


Figura 68: **Izquierda:** Espectros de emisión para la valoración fluorimétrica de **14** (10^{-4} M en DMSO) con dopamina (en HEPES, pH 8.2) ($\lambda_{excitación} = 288$ nm). **Derecha:** Ajustes para el cálculo de la constante de formación del complejo 1:1 ($\lambda_{máxima} = 515$ nm) de **14** con dopamina

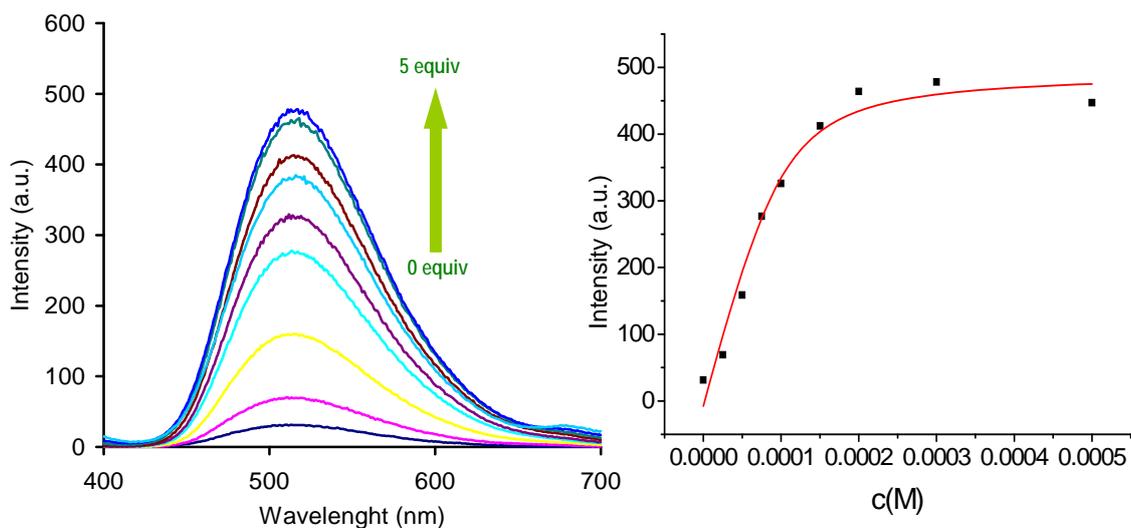


Figura 69: Izquierda: Espectros de emisión para la valoración fluorimétrica de **14** (10⁻⁴ M en DMSO) con serotonina (en H₂O) ($\lambda_{\text{excitación}} = 288$ nm). Derecha: Ajustes para el cálculo de la constante de formación del complejo 1:1 ($\lambda_{\text{máxima}} = 517$ nm) de **14** con serotonina.

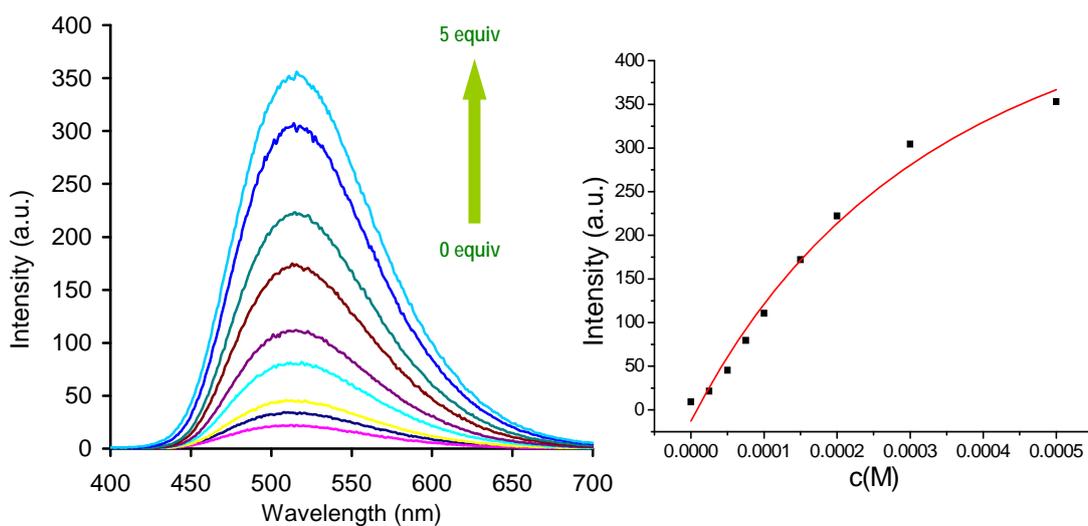


Figura 70: Izquierda: Espectros de emisión para la valoración fluorimétrica de **14** (10⁻⁴ M en DMSO) con cisteamina (en H₂O) ($\lambda_{\text{excitación}} = 288$ nm). Derecha: Ajustes para el cálculo de la constante de formación del complejo 1:1 ($\lambda_{\text{máxima}} = 517$ nm) de **14** con cisteamina.

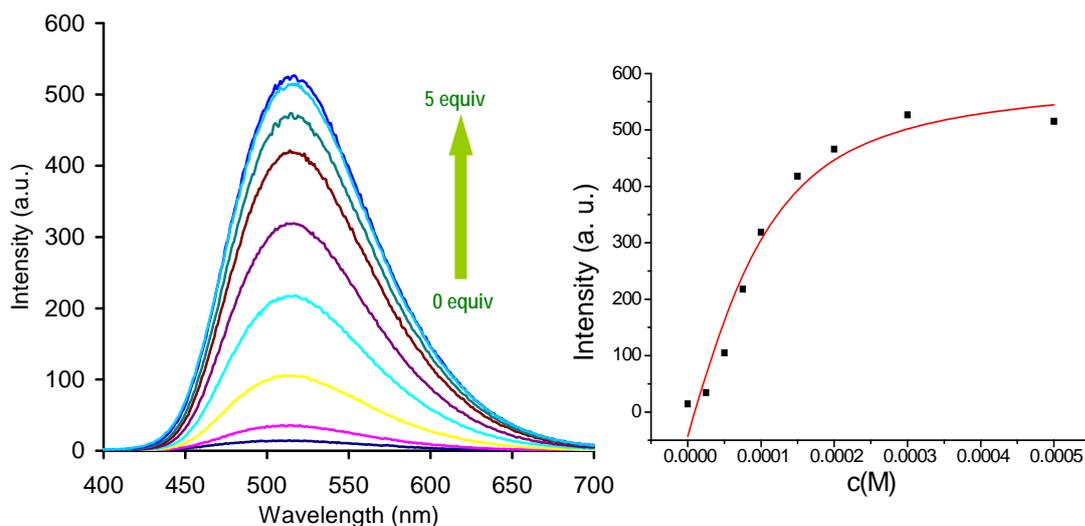


Figura 71: Izquierda: Espectros de emisión para la valoración fluorimétrica de **14** (10^{-4} M en DMSO) con etanolamina (en H_2O) ($\lambda_{excitación} = 288$ nm). **Derecha:** Ajustes para el cálculo de la constante de formación del complejo 1:1 ($\lambda_{máxima} = 517$ nm) de **14** con etanolamina.

En varios de los experimentos de valoración mediante fluorescencia se han modificado las condiciones del experimento mediante la utilización de las aminas biogénicas disueltas en medio tamponado HEPES a pH 8.2, para comprobar si la respuesta obtenida era la misma o el cambio del medio afectaba al proceso. De los experimentos se deduce que el aumento de fluorescencia se sigue produciendo al utilizar tampón HEPES, pH 8.2, aunque los valores de las constantes son diferentes a los hallados cuando se utilizaron las aminas biogénicas disueltas en agua.

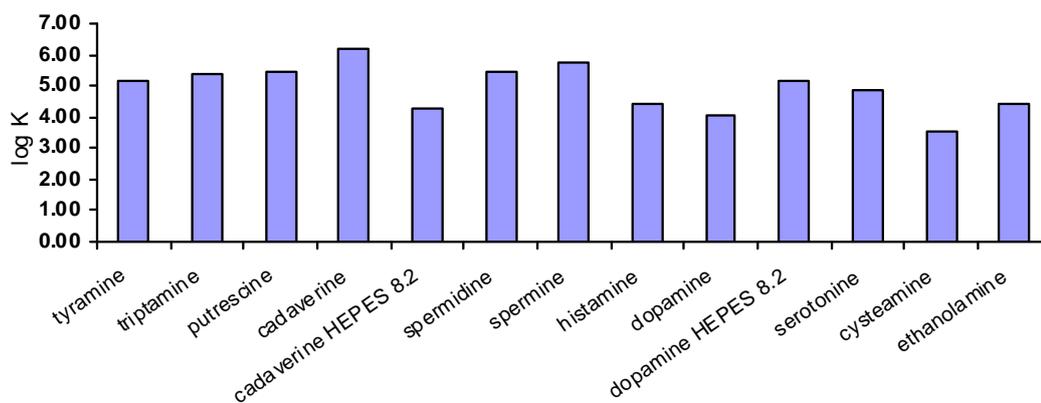


Figura 72: Representación logarítmica de las constantes de formación de los complejos 1:1 de **14** y las aminas biogénicas.

	Log K
<i>tyramine</i>	5.17 ± 0.36
<i>triptamine</i>	5.40 ± 0.09
<i>putrescine</i>	5.49 ± 0.17
<i>cadaverine</i>	6.23 ± 0.50
<i>cadaverine HEPES pH = 8.2</i>	4.31 ± 0.53
<i>spermidine</i>	5.48 ± 0.25
<i>spermine</i>	5.78 ± 0.24
<i>histamine</i>	4.43 ± 0.14
<i>dopamine</i>	4.09 ± 0.12
<i>dopamine HEPES pH = 8.2</i>	5.14 ± 0.23
<i>serotonine</i>	4.83 ± 0.19
<i>cysteamine</i>	3.53 ± 0.14
<i>ethanolamine</i>	4.41 ± 0.18

Tabla 5: Constantes de formación de los complejos 1:1 obtenidos a partir de las valoraciones fluorimétricas de disoluciones 10^{-4} M de **14** en DMSO con las aminas biogénicas disueltas en agua.

Los análisis por el método de Job's Plot realizados con ejemplos representativos confirman la estequiometría calculada a partir de los ajustes no lineales ya que ambos ejemplos muestran máximos de señal a una fracción molar de 0.5.

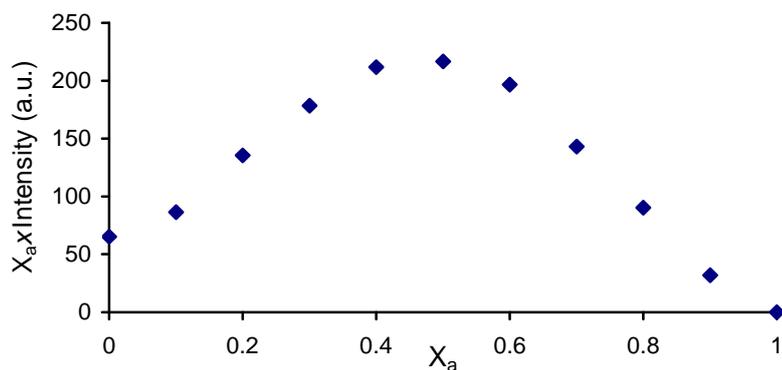


Figura 73: Analisis de Job's Plot de **14** (10^{-4} M en DMSO) con triptamina. ($\lambda_{\text{excitación}} = 288$ nm)
($\lambda_{\text{emisión}} = 517$ nm).

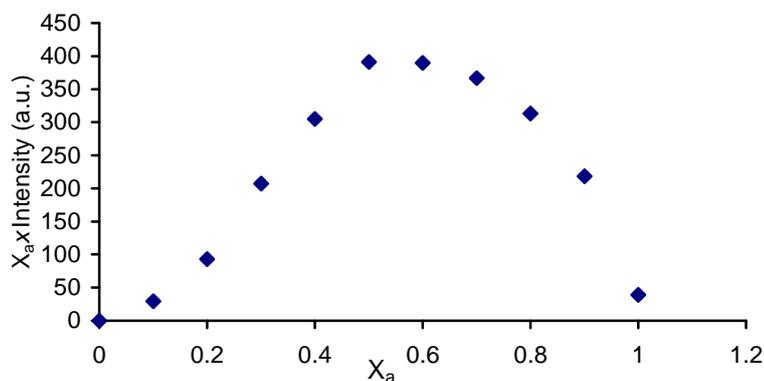


Figura 74: Analisis de Job's Plot de **14** (10^{-4} M en DMSO) con espermina. ($\lambda_{\text{excitación}} = 288$ nm)
($\lambda_{\text{emisión}} = 517$ nm).

LÍMITES DE DETECCIÓN:

Los límites de detección calculados para cadaverina y dopamina son los siguientes:

CADAVERINA en H₂O $1.2256 \cdot 10^{-14}$ M.

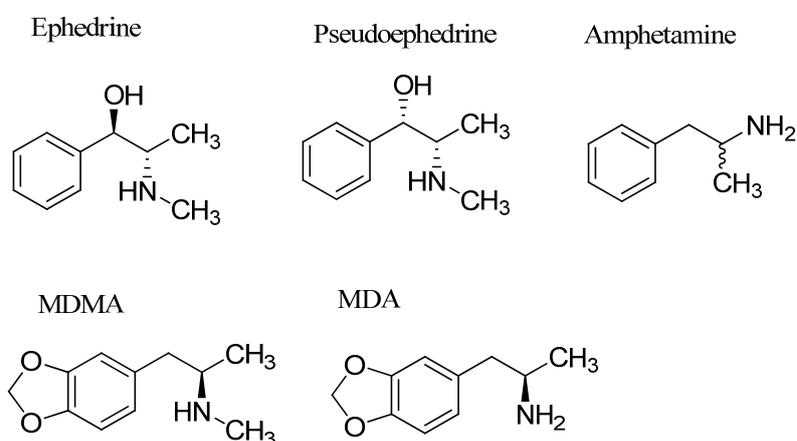
CADAVERINA en HEPES pH = 8.2 $1.901 \cdot 10^{-13}$ M.

DOPAMINA en HEPES pH = 8.2 $1.077 \cdot 10^{-11}$ M.

Al tratarse de procesos en que se genera fluorescencia, los límites de detección que se observan son especialmente bajos.

ESTUDIOS DE DETECCIÓN DE ANFETAMINAS

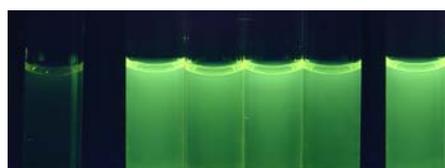
Además de las aminas biogénicas estudiadas, algunos compuestos de origen natural o sintético están fuertemente relacionados con ellas, tanto en su estructura como en su acción fisiológica. Los compuestos cuya detección tiene mayor interés son las aminas de las series conocidas como efedrinas (de origen natural) y anfetaminas (de origen sintético), debido a su uso extendido como fármacos o drogas psicoestimulantes. Por esto se realizó un nuevo estudio con una serie de efedrinas y anfetaminas de gran interés.



Se prepararon disoluciones 10^{-4} M de **14** en DMSO y se añadieron cantidades crecientes de cada una de las aminas en agua, excepto las 2 últimas que se añadieron en disolución acuosa de HEPES a pH 8.2.



Ref, eph, peh, anf, MDA, MDMA.



Ref, eph, peh, anf, MDA, MDMA.

Figura 75: Efecto de la adición sobre una disolución 10^{-4} M de **14** en DMSO de dos equivalentes de cada amina en H_2O o tampón: **Ref**, **eph**: efedrina (H_2O), **peh**: pseudoefedrina (H_2O), **anf**: anfetamina (H_2O), **MDA**: 3,4-metilendioxianfetamina (HEPES pH 8.2), **MDMA**: 3,4-metilendioximetanfetamina (éxtasis) (HEPES pH 8.2). **Arriba:** luz blanca. **Abajo:** $\lambda_{exc} = 366$ nm.

En los resultados cualitativos se aprecia una ligerísima disminución del color amarillo de la disolución inicial y un aumento en la fluorescencia con todas las aminas utilizadas. Las valoraciones fluorimétricas realizadas mostraron un aumento de la banda de emisión ($\lambda_{m\acute{a}xima} = 517$ nm) en todos los casos y los ajustes realizados a modelos no lineales dieron como resultado complejos del tipo 1:1.

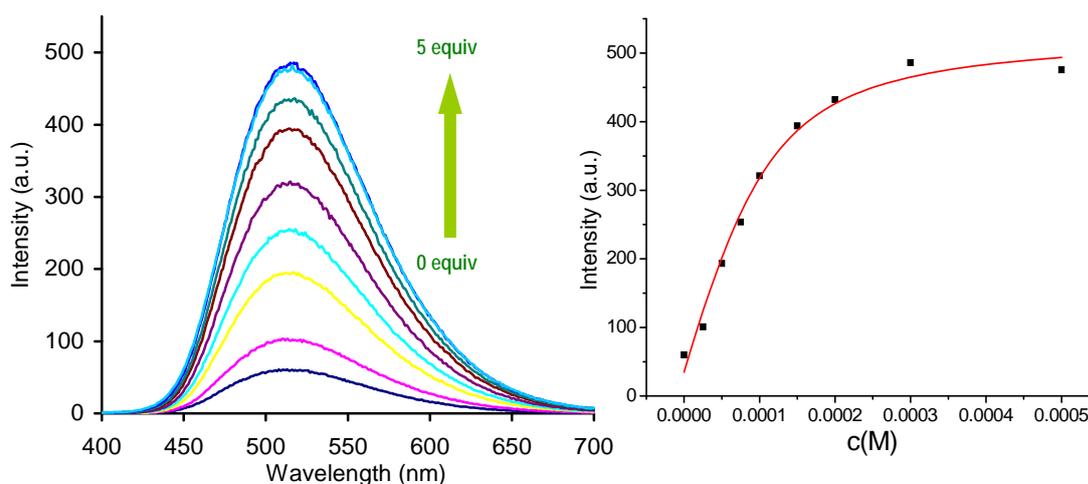


Figura 76: Izquierda: Espectros de emisión para la valoración fluorimétrica de **14** (10^{-4} M en DMSO) con efedrina (en H_2O) ($\lambda_{excitación} = 288$ nm). **Derecha:** Ajustes para el cálculo de la constante de formación del complejo 1:1 ($\lambda_{m\acute{a}xima} = 515$ nm) de **14** con efedrina.

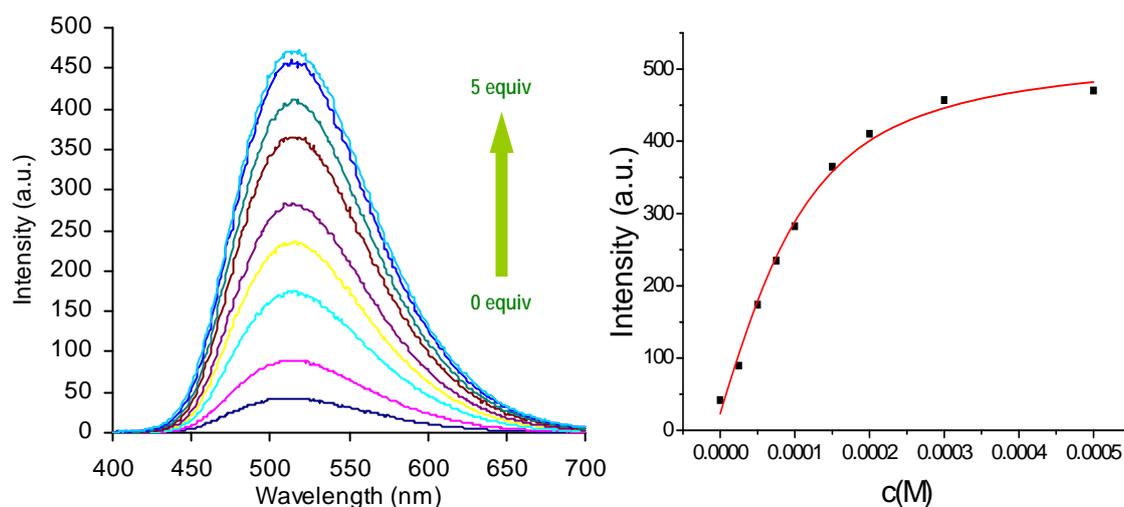


Figura 77: Izquierda: Espectros de emisión para la valoración fluorimétrica de **14** (10⁻⁴ M en DMSO) con pseudoefedrina (en H₂O) ($\lambda_{\text{excitación}} = 288$ nm). **Derecha:** Ajustes para el cálculo de la constante de formación del complejo 1:1 ($\lambda_{\text{máxima}} = 515$ nm) de **14** con pseudoefedrina.

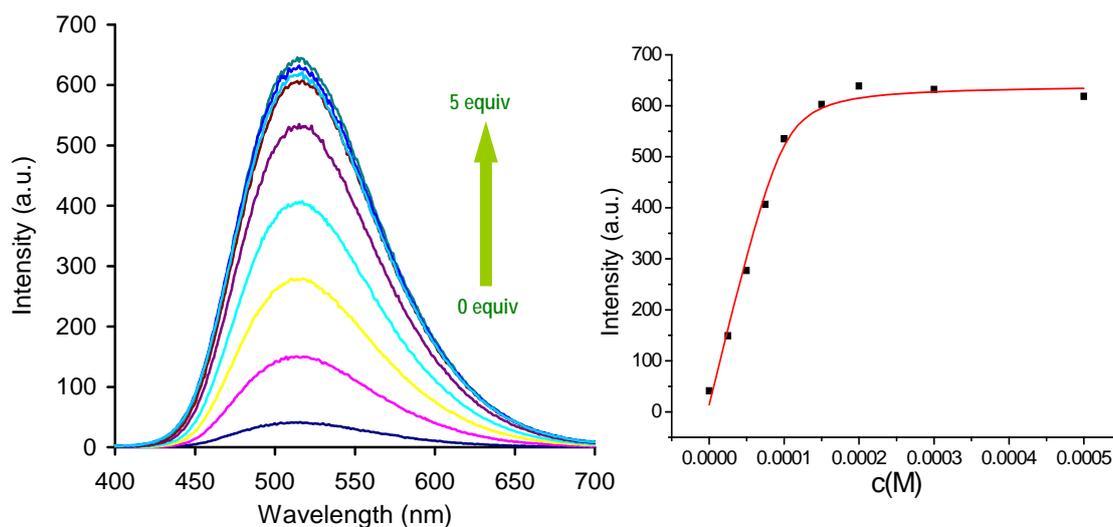


Figura 78: Izquierda: Espectros de emisión para la valoración fluorimétrica de **14** (10⁻⁴ M en DMSO) con anfetamina (en H₂O) ($\lambda_{\text{excitación}} = 288$ nm). **Derecha:** Ajustes para el cálculo de la constante de formación del complejo 1:1 ($\lambda_{\text{máxima}} = 515$ nm) de **14** con anfetamina.

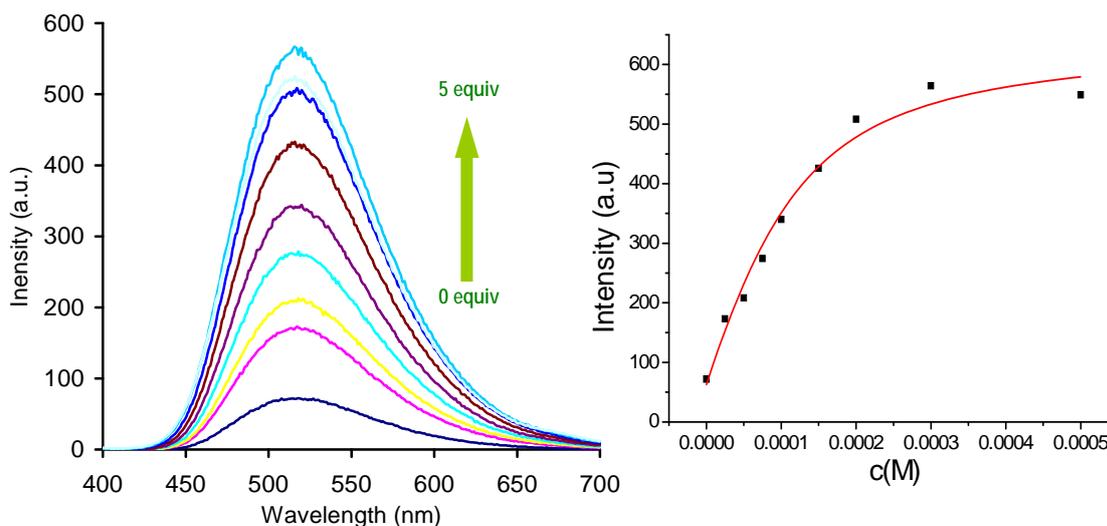


Figura 79: **Izquierda:** Espectros de emisión para la valoración fluorimétrica de **14** (10^{-4} M en DMSO) con MDA (H_2O) ($\lambda_{excitación} = 288$ nm). **Derecha:** Ajustes para el cálculo de la constante de formación del complejo 1:1 ($\lambda_{máxima} = 517$ nm) de **14** con MDA

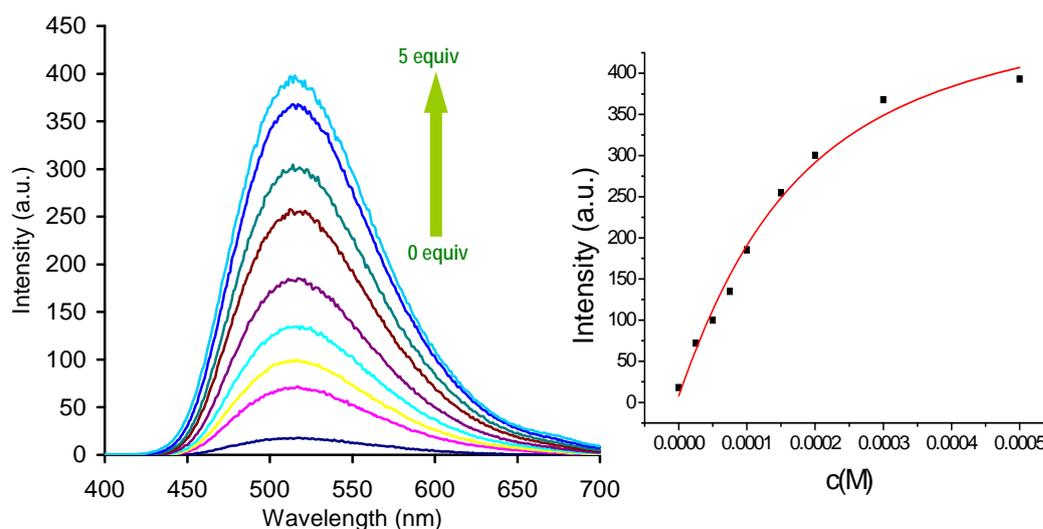


Figura 80: **Izquierda:** Espectros de emisión para la valoración fluorimétrica de **14** (10^{-4} M en DMSO) con MDA (HEPES pH = 8.2) ($\lambda_{excitación} = 288$ nm). **Derecha:** Ajustes para el cálculo de la constante de formación del complejo 1:1 ($\lambda_{máxima} = 517$ nm) de **14** con MDA

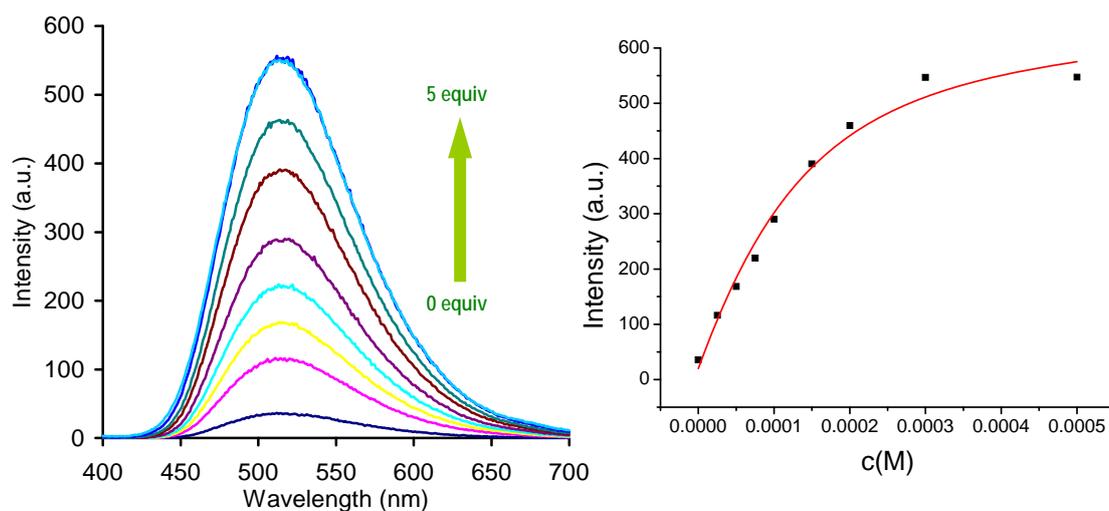


Figura 81: Izquierda: Espectros de emisión para la valoración fluorimétrica de **14** (10^{-4} M en DMSO) con MDA (H_2O) ($\lambda_{\text{excitación}} = 288$ nm). **Derecha:** Ajustes para el cálculo de la constante de formación del complejo 1:1 ($\lambda_{\text{máxima}} = 517$ nm) de **14** con MDA

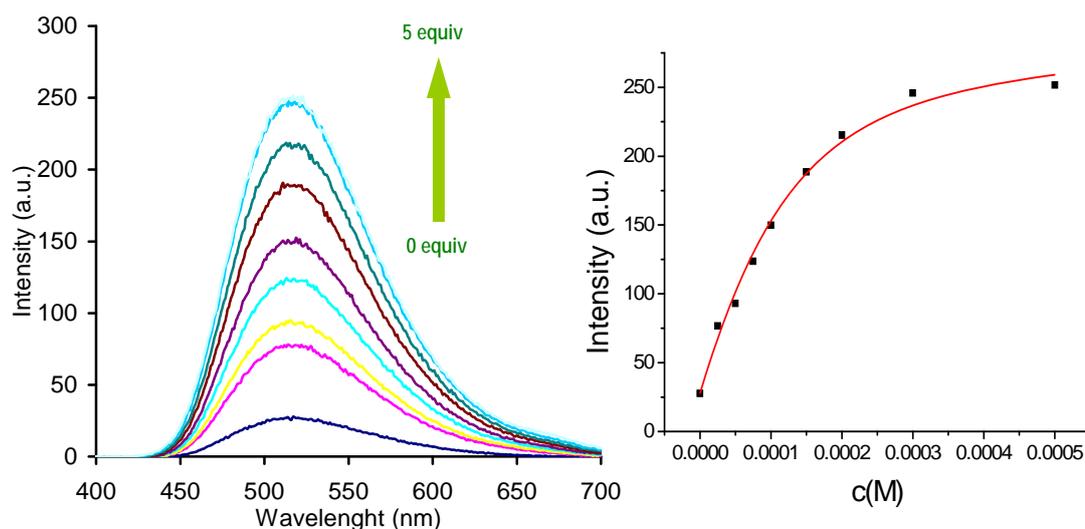


Figura 82: Izquierda: Espectros de emisión para la valoración fluorimétrica de **14** (10^{-4} M en DMSO) con MDMA (HEPES pH = 8.2) ($\lambda_{\text{excitación}} = 288$ nm). **Derecha:** Ajustes para el cálculo de la constante de formación del complejo 1:1 ($\lambda_{\text{máxima}} = 517$ nm) de **14** con MDMA

Parte III. Sondas fluorogénicas para la detección de aminoácidos y sus metabolitos

Se realizaron experimentos de valoración disolviendo algunas de las aminas en tampón HEPES a pH = 8.2, con el fin de comprobar el efecto del tampón en los resultados. Pudo comprobarse que el aumento de fluorescencia se produce igualmente en presencia de tampón y que los valores de las constantes obtenidas son similares a las obtenidas cuando se disuelven las aminas en agua.

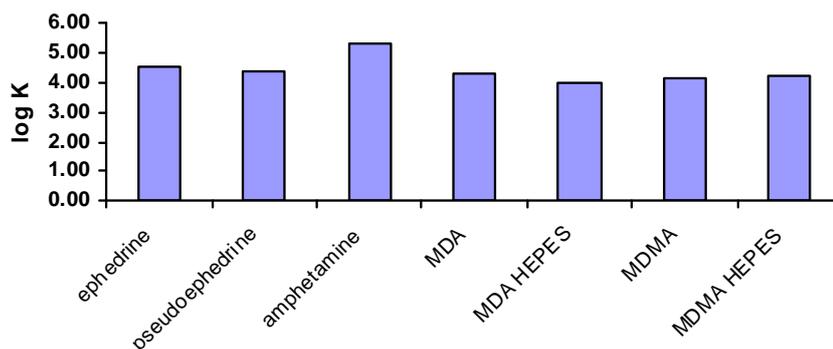


Figura 83: Representación logarítmica de las constantes de formación de los complejos 1:1 de **14** y anfetaminas.

	log K
<i>ephedrine</i>	4.50 ± 0.11
<i>pseudoephedrine</i>	4.36 ± 0.08
<i>amphetamine</i>	5.35 ± 0.17
<i>MDA</i>	4.29 ± 0.13
<i>MDA HEPES pH = 8.2</i>	3.95 ± 0.10
<i>MDMA</i>	4.12 ± 0.12
<i>MDMA HEPES pH = 8.2</i>	4.23 ± 0.09

Tabla 6: Constantes de formación de los complejos 1:1 obtenidos a partir de las valoraciones fluorimétricas **14** con anfetaminas.

LÍMITES DE DETECCIÓN:

Efedrina en H₂O	9.492·10⁻¹⁴ M
MDA en H₂O (neutralizada con NaOH)	2.481·10⁻¹⁴ M
MDMA en H₂O (neutralizada con NaOH)	4.218·10⁻¹⁴ M
Pseudoefedrina en H₂O	4.170·10⁻¹³ M

Cuando las medidas se realizan añadiendo alícuotas de analito sobre la sonda fluorogénica, paulatinamente el efecto del tiempo hace que la curva tome finalmente la

forma de la figura 84, que no puede ajustarse a ningún modelo no lineal (valoración de **14** con 1,4-diaminobutano [putrescina]), en que puede apreciarse que aparece un máximo de fluorescencia y luego disminuye por efecto del tiempo.

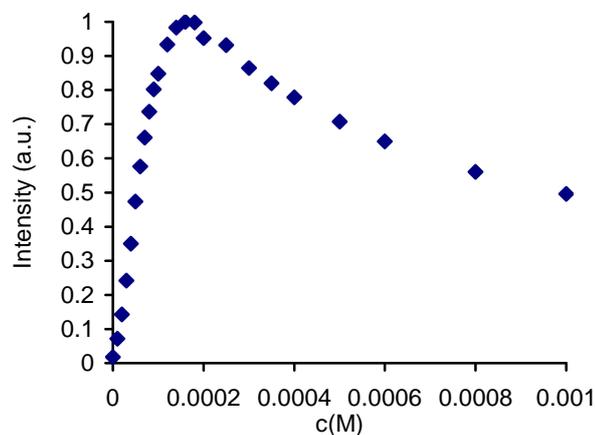


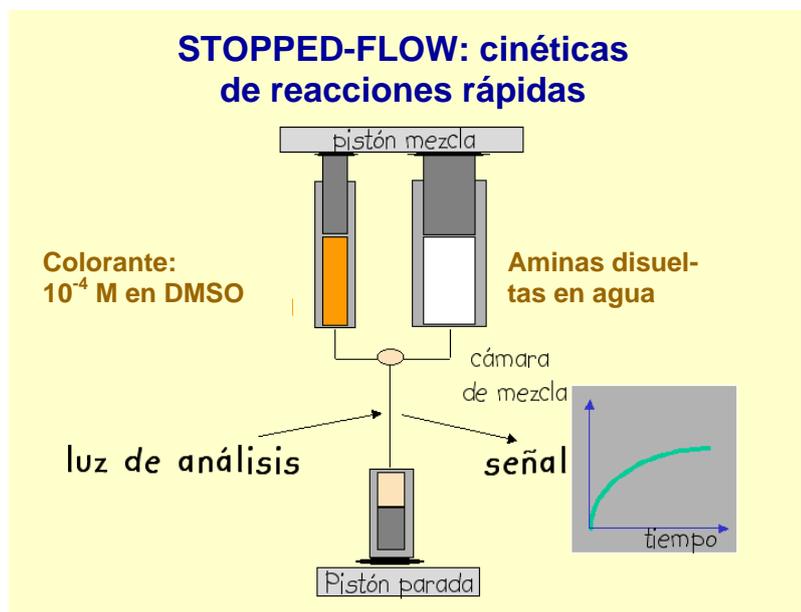
Figura 84

Para poder obtener curvas de valoración sin el efecto del tiempo, las valoraciones descritas han sido realizadas preparando disoluciones individuales correspondientes a cada punto medido y realizando las valoraciones con cada una de las alícuotas preparadas de forma independiente en el momento de la medición. De esta manera se elimina el efecto del tiempo y se consigue que las curvas tengan un patrón ajustable.

STOPPED-FLOW: CINÉTICAS DE REACCIONES RÁPIDAS

Por otra parte, se ha estudiado el proceso de generación de la fluorescencia en los procesos anteriores mediante el estudio cinético del proceso de generación de la especie fluorescente y del proceso de desactivación posterior. El estudio se ha realizado utilizando el método de *stopped-flow* a partir del cual se obtienen las ecuaciones de velocidad de ambos procesos. El estudio se realiza en condiciones de pseudo-orden 1, en este caso con la concentración de analito (0.833×10^{-3}) en exceso, 10 veces mayor que la de la sonda fluorogénica (0.833×10^{-4} M). Todos los experimentos han sido realizados bajo las

mismas condiciones de temperatura, % de agua (3.84 % vol) y volúmenes inyectados en cada muestra.



Esquema de funcionamiento de un estudio mediante stopped-flow

	K_v formación	K_v quenching
SPERMINE(spr)	0.092402	0.0071713
SPERMIDINE(spd)	0.08718	0.00752218
CADAVERINE(cdr)	0.06433	0.00787294
PUTRESCINE(ptr)	0.09082	0.00813422
EPHEDRINE(eph)	0.06545	0.0054153
PSEUDOEPHEDRINE(peh)	0.07158	0.00573527
MDA(mda)	0.03658	5.32E-04
MDMA(mdma)	0.135	4.42E-05
AMPHETAMINE(anf)	0.02443943	0.0072249
SEROTONINE(ser)	0.02652	0.00216798
DOPAMINE(dop)	0.04776	0.00444705
TRIPTAMINE	0.04776	0.00444705
TYRAMINE	0.02652	0.00216798

Tabla 7: Constantes de velocidad de activación (K_v formación) y desactivación (K_v quenching) de la fluorescencia tras añadir 1 equivalente de analito en H₂O sobre una disolución de **14** en DMSO medidos con el método Stopped-Flow.

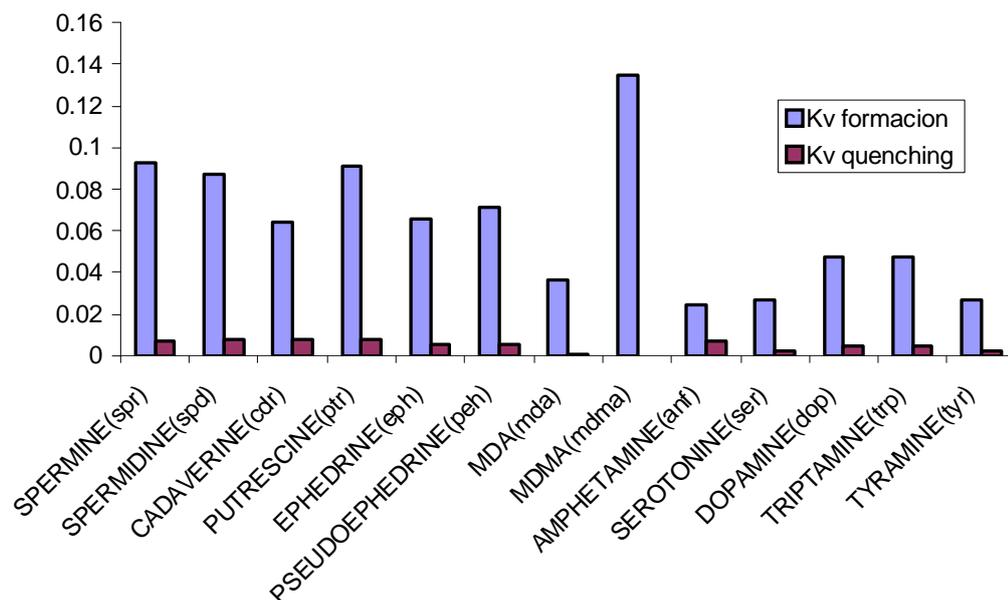


Figura 85: Constantes de velocidad de los proceso de fluorescencia ON (azul) y OFF (granate) medidos por el método de Stopped-flow para el proceso de detección de anfetaminas y aminas biogénicas con **14**.

ANÁLISIS MULTICOMPONENTE

Dado que el estudio se ha realizado con un alto número de compuestos, a continuación se procesaron todos los datos y variables obtenidos mediante análisis multicomponente, con el fin de poder diferenciar unos compuestos de otros. Partiendo de las cuatro variables estudiadas, como son pK_{acidez} , $pK_{\text{equilibrio}}$, $K_v^{\text{formación}}$ y $K_v^{\text{quenching}}$, medidas para la serie de 13 aminas estudiadas, se efectuó el estudio mediante análisis multicomponente. El set de datos se resume en la tabla siguiente.

	Col_1	Col_2	Col_3	Col_4	
	AMINA	pK _a	pK _{eq}	K _v ^{formacion}	K _v ^{quenching}
1	Triptamine	10.2	5.40	0.04776	0.00444705
2	Tyramine	9.74	5.17	0.02652	0.00216798
3	Putrescine	10.8	5.49	0.09082	0.00813422
4	Cadaverine	10.05	6.23	0.06433	0.00787294
5	Spermidine	10.9	5.48	0.092402	0.0071713
6	Spermine	11.5	5.78	0.08718	0.00752218
7	Dopamine	8.9	4.09	0.04776	0.00444705
8	Serotonine	6.04	4.83	0.02652	0.00216798
9	Ephedrine	9.2	4.50	0.06545	0.0054153
10	Pseudoephedrine	9.9	4.36	0.07158	0.00573527
11	Anfetamine	9.9	5.35	0.02443943	0.0072249
12	MDA	9.9	3.95	0.03658	5.32E-04
13	MDMA	10.38	4.23	0.135	4.42E-05

Tabla 8

El propósito de este análisis fue obtener el menor número de combinaciones lineales de las cuatro variables que sirvieran para explicar el mayor porcentaje de varianza. A partir de este conjunto de datos y utilizando el programa *statgraphics* de análisis estadístico se obtuvieron 2 componentes principales que sirvieron para explicar un 83.3% de la varianza.

Nº COMPONENTE	EIGENVALUE	% VARIANZA	% VARIANZA ACUMULADA
1	2.11569	52.892	52.892
2	1.21932	30.483	83.375
3	0.370479	9.262	92.637
4	0.294511	7.363	100.000

Tabla 9

Estas nuevas variables creadas no son más que una combinación de las iniciales en las que se elimina la información innecesaria. El peso de cada variable inicial en las dos nuevas variables generadas es el siguiente:

	COMPONENTE 1	COMPONENTE 2
pK_a	0.537145	0.385256
pK_{eq}	0.531915	-0.451612
$K_v^{formación}$	0.332355	0.717747
$K_v^{quenching}$	0.563988	-0.363954

Tabla 10

Con estos resultados se pueden construir las ecuaciones de cada una de las componentes principales:

Ecuación de la primera componente principal:

$$0.537145 * pK_a + 0.531915 * pK_{eq} + 0.332355 * K_v^{formación} + 0.563988 * K_v^{quenching}$$

Ecuación de la segunda componente principal:

$$0.385256 * pK_a - 0.451612 * pK_{eq} + 0.717747 * K_v^{formación} - 0.363954 * K_v^{quenching}$$

Con estas nuevas ecuaciones se puede calcular para cada muestra estudiada un sistema de dos coordenadas formado por las componentes antes señaladas:

	Component 1	Component 2
1	0.237284	-0.423788
2	-0.792332	-0.58522
3	172.276	0.165016
4	164.792	-10.701
5	157.965	0.359368
6	20.638	0.184291
7	-12.668	0.0264696
8	-254.806	-144.763
9	-0.466001	0.118383
10	-0.159798	0.504292
11	0.39581	-135.015
12	-186.097	0.665276
13	-0.553264	28.538

Tabla 11

La representación gráfica de estos puntos es la siguiente:

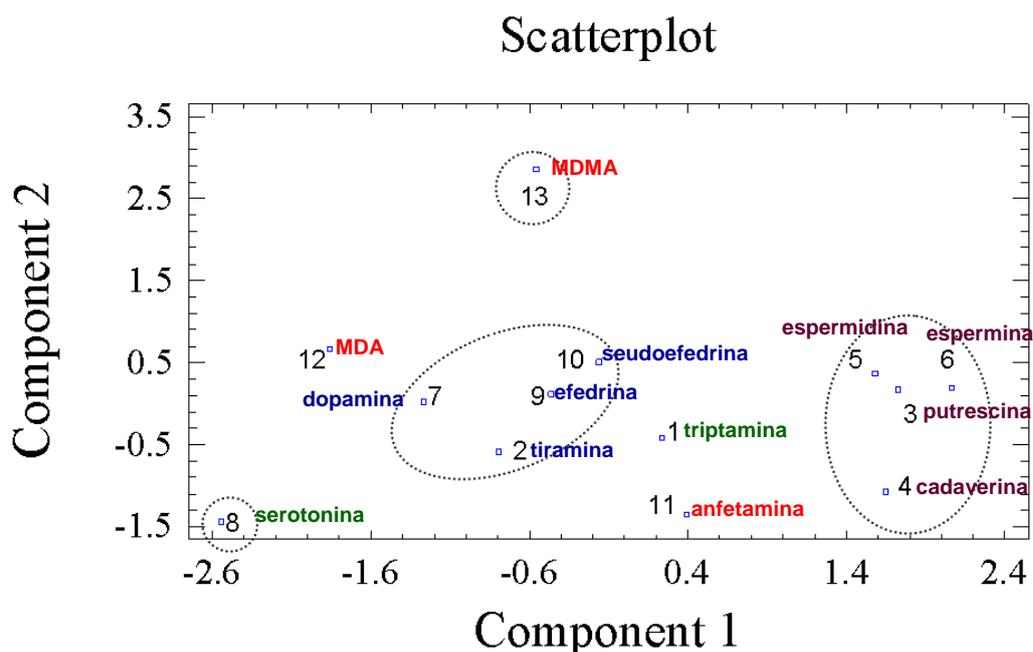


Figura 86: Representación gráfica de las dos componentes principales obtenidas para el proceso de detección de anfetaminas y aminas biogénicas con **14**.

Análisis de resultados: La distribución de los puntos en la representación de estas dos componentes muestra las siguientes características:

1°.- Se encuentran 4 puntos (3, 4, 5, 6) que están separados del resto y que se encuentran en la zona de valores altos de la componente 1; en esta componente tiene una correlación importante la variable pK_a , $K_v^{\text{formación}}$ y $K_v^{\text{quenching}}$ y estas aminas son las que tienen un valor más elevado de estas variables, mientras que se encuentran en valores bajos de la componente 2, en las cuales la correlación negativa más importante se da con las variables pK_{eq} y $K_v^{\text{quenching}}$.

2°.- Se observa otro grupo separado del resto, puntos 2, 7, 9, 10, que están en la parte central de la representación. Se encuentran en valores negativos de la componente 1, pK_a , $K_v^{\text{formación}}$ y $K_v^{\text{quenching}}$, menores que para otras aminas

3°.- El punto 8 está en valores negativos de ambas componentes, es decir que presenta valores bajos de todas las variables medidas.

4°.- El punto 13 está separado del resto debido a un alto valor de la componente 2; esta componente tiene una correlación positiva elevada con la variable $K_v^{\text{formación}}$ y esto hace que esta amina, que presenta ese resultado tan alto en la velocidad de formación, esté situada en ese lugar.

5°.- Los puntos 11 y 12 también se encuentran separados del resto, el punto 11 tiene un valor negativo de la componente 2, es decir $K_v^{\text{formación}}$ es baja y tiene valores medios de $K_v^{\text{quenching}}$. El punto 12 tiene valores negativos de componente 1, $K_v^{\text{formación}}$ y $K_v^{\text{quenching}}$ son especialmente bajos y el resto de variables muestra valores intermedios, ya que se encuentra en un punto intermedio de la componente 2.

CONCLUSIONES:

De este capítulo se pueden extraer las siguientes conclusiones:

De entre una serie de compuestos fluorogénicos, se ha puesto a punto una sonda fluorogénica de aminas biogénicas, que funciona generando una elevada fluorescencia en presencia de diversas aminas de origen natural o sintético, en que la fluorescencia generada depende de la estructura de la amina utilizada, y que se extingue con el tiempo, siendo la velocidad de formación y de extinción distinta para cada amina estudiada.

La sonda fluorogénica estudiada es capaz de discriminar entre las diversas aminas biogénicas o miméticas de las mismas, que es capaz de detectar por vía fluorogénica, debido al peso que tiene cada componente estudiada, lo que puede ser aplicado a aminas de alto interés farmacológico o biológico, como Anfetaminas sintéticas, con límites de detección extraordinariamente bajos.

**PARTE III. PREPARACIÓN DE
SONDAS FLUOROGÉNICAS
PARA LA DETECCIÓN DE
AMINOÁCIDOS Y SUS
METABOLITOS**

TAREA 3: PREPARACIÓN DE UNA SONDA FLUOROGÉNICA PARA LA DETECCIÓN DE AMINOÁCIDOS Y PÉPTIDOS

RESULTADOS EXPERIMENTALES: En tercer lugar se va a realizar el estudio de la sonda fluorogénica mostrada en la figura siguiente, en que una unidad coordinante bisamida se encuentra unida a dos grupos fluorogénicos, por lo que se medirán las variaciones fotofísicas debidas a la coordinación en presencia de varias series de metabolitos relacionados.

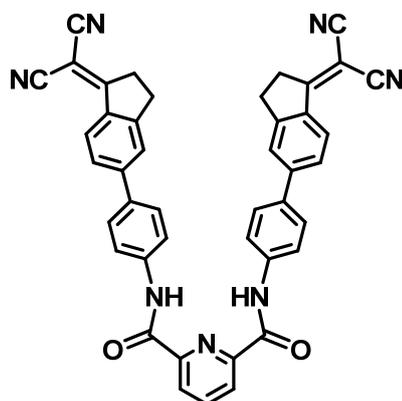
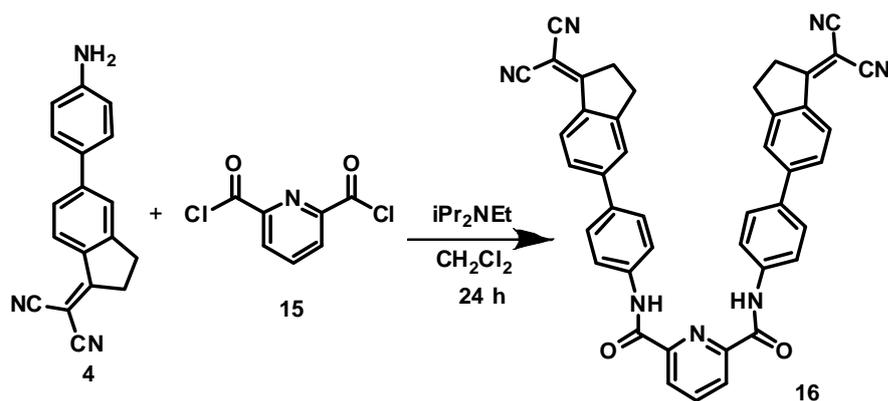


Figura 87: Sonda fluorogénica proyectada.

En esta sonda los fluoróforos están cercanos debido al puente de hidrógeno entre las amidas. Cuando se produzca la coordinación, los dos fluoróforos se alejarán como consecuencia del cambio conformacional y la excitación se modificará. Este tipo de estructuras con un receptor dipicolinilamida conectado a dos etiquetas fluorescentes ha demostrado una alta capacidad como receptor de aniones.¹

¹ A. Kovalchuk, J. L. Bricks, G. Reck, K. Rurack, B. Schulz, A. Szumna, H. Weißhoff, *Chem. Commun.* **2004**, 1946–1947.

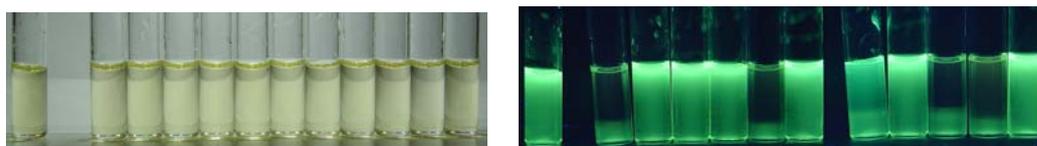
La síntesis del receptor queda descrita en el esquema 9. Una disolución del dicloruro del ácido 2,6-piridindicarboxílico en CH_2Cl_2 se añade, gota a gota, en condiciones de atmósfera inerte, sobre una disolución que contiene amina **4** y base de Hünig en CH_2Cl_2 . La mezcla se mantiene bajo agitación a temperatura ambiente durante un día, tras lo cual el producto sólido formado se filtra y se caracteriza. La bisamida **16** se obtiene como un sólido amarillo oscuro con un rendimiento del 79%.



Esquema 9

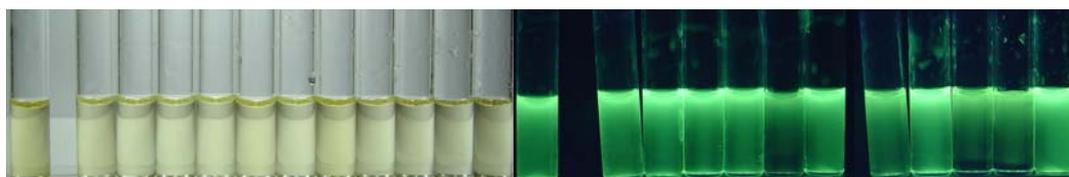
El compuesto **16** es un sólido poco soluble en los disolventes ordinarios, aunque es algo soluble en CHCl_3 y en DMSO. En DMSO da lugar a una disolución de color amarillo claro, con un $\lambda_{\text{máxima absorción}} = 381 \text{ nm}$ y un coeficiente de extinción molar $\epsilon = 30200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, mostrando en fluorescencia un máximo de emisión de $\lambda_{\text{máxima emisión}} = 512 \text{ nm}$ ($\lambda_{\text{excitación}} = 366 \text{ nm}$) en DMSO, con un rendimiento cuántico de $\Phi = 0.012$ en DMSO. Este tipo de bisamidas presenta un sistema preorganizado útil para la detección de aniones, ya que la disposición espacial de los NH favorece la formación de puentes de hidrógeno con aniones que pueden formarlos. En cambio, permanece sin cambios después de la adición de varios equivalentes de los cationes más comunes.

El estudio comenzó realizando pruebas preliminares con aniones en distintos medios, tal como se muestra en las figuras siguientes.



Ref F⁻ Cl⁻ Br⁻ I⁻ BzO⁻ NO₃⁻ H₂PO₄⁻ HSO₄⁻ AcO⁻ CN⁻ SCN⁻ Ref F⁻ Cl⁻ Br⁻ I⁻ BzO⁻ NO₃⁻ H₂PO₄⁻ HSO₄⁻ AcO⁻ CN⁻ SCN⁻

Figura 88: Efecto de la adición de 2 equivalentes de cada uno de los aniones ($5 \cdot 10^{-3}$ M en MeCN) sobre disoluciones 10^{-4} M del compuesto **16** en DMSO. Izquierda: variación del color. Derecha: modificación de la fluorescencia, $\lambda_{exc} = 366$ nm.



Ref F⁻ Cl⁻ Br⁻ I⁻ BzO⁻ NO₃⁻ H₂PO₄⁻ HSO₄⁻ AcO⁻ CN⁻ SCN⁻ Ref F⁻ Cl⁻ Br⁻ I⁻ BzO⁻ NO₃⁻ H₂PO₄⁻ HSO₄⁻ AcO⁻ CN⁻ SCN⁻

Figura 89: Efecto de la adición de 2 equivalentes de cada uno de los aniones ($5 \cdot 10^{-3}$ M $40 \mu\text{l}$ H₂O) sobre disoluciones 10^{-4} M del compuesto **16** en DMSO. Izquierda: variación del color. Derecha: modificación de la fluorescencia, $\lambda_{exc} = 366$ nm.

Las disoluciones iniciales 10^{-4} M de **16** en DMSO no sufren cambios aparentes en el color después de la adición de cada uno de los aniones, sino que el proceso de reconocimiento se traduce solamente en cambio de fluorescencia. Así, al observar las distintas disoluciones bajo luz ultravioleta $\lambda_{exc} = 366$ nm, se aprecia que el compuesto pierde la fluorescencia inicial en presencia de los aniones: F⁻, BzO⁻, AcO⁻ y CN⁻, cuando se añaden en disolución en acetonitrilo, y en presencia de los aniones BzO⁻, AcO⁻ y CN⁻, cuando se añaden los aniones en disolución acuosa. El agua en pequeñas proporciones no parece tener incidencia en la fluorescencia en aquellos casos en que el anión no influye.

ESTUDIOS FRENTE A AMINOÁCIDOS Y SUS METABOLITOS

La bisamida **16** parece ser muy adecuada para el reconocimiento de grupos carboxilo ya que la disolución original de receptor libre en DMSO pierde la fluorescencia en presencia de carboxilatos con preferencia a fluoruro, por lo que el trabajo se orientó al estudio del comportamiento de la bisamida frente a una serie de aminoácidos con distintas características. Así, en el siguiente gráfico se puede observar de forma cuantitativa la disminución de la fluorescencia ($1 - I_0/I_{max}$) de una disolución de bisamida **16** (10^{-4} M,

DMSO) mediante la adición de 4 equivalentes de cada uno de los distintos aminoácidos tanto proteínogénicos como metabólicos, así como algunos metabolitos importantes relacionados con ellos.

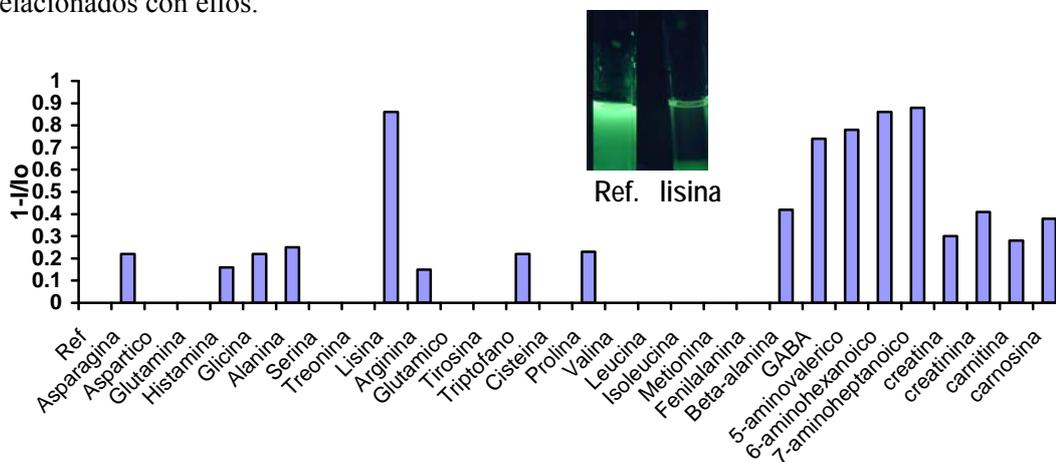


Figura 90: Valores normalizados de disminución de la fluorescencia ($1-I_0/I_{max}$) de una disolución de bisamida **16** (10^{-4} M, DMSO) mediante la adición de 4 equivalentes de cada uno de los distintos aminoácidos o metabolitos en agua. Imagen: disminución de la fluorescencia tras la adición de 4 equivalentes de *L*-lisina.

Se observan principalmente cambios en la fluorescencia frente a aminoácidos básicos y aminoácidos de cadena larga que llevan un grupo amino en su extremo, también frente a un dipéptido que cumple ese requisito, como la carnosina, y frente a derivados de aminoácidos que intervienen en el metabolismo muscular.

Para cuantificar estas interacciones se preparan disoluciones acuosas de las aminoácidos y derivados y se realizan una serie de valoraciones con las que se cuantifica en cada caso la disminución de la fluorescencia ($\lambda_{m\acute{a}xima} = 512$ nm), en función de la concentración de analito en el medio. Todas las valoraciones se ajustan a un modelo 1:1 de complejación, siendo *L*-lisina el aminoácido con el que obtiene una constante más alta así como un ajuste más correcto, ya que con el resto de los α -aminoácidos estudiados los ajustes no lineales tienen un error bastante alto.

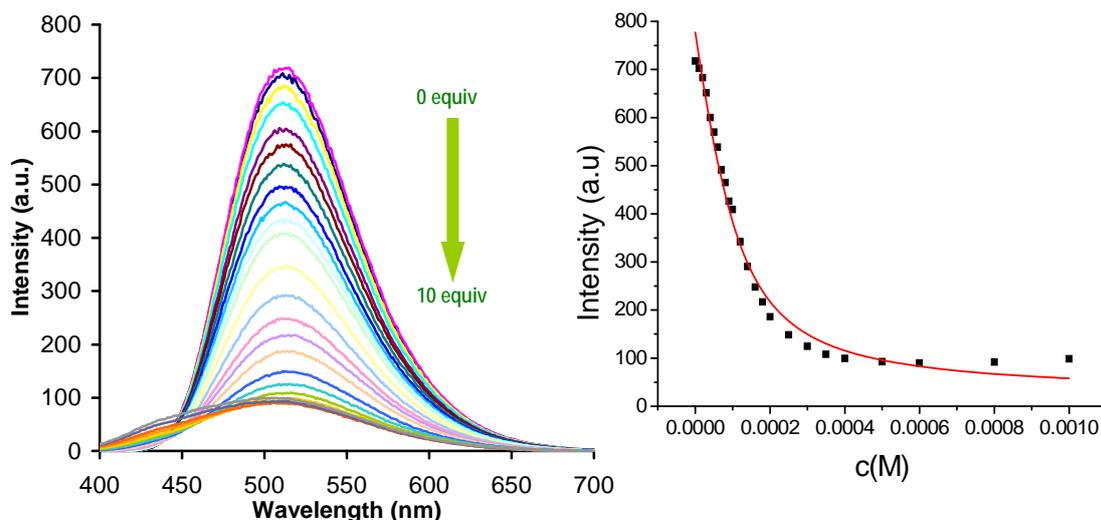


Figura 91: Izquierda: Espectros de emisión para la valoración fluorimétrica de **16** (10^{-4} M en DMSO) con *L*-lisina (H_2O) ($\lambda_{excitación} = 366$ nm). Derecha: Ajustes para el cálculo de la constante de formación del complejo 1:1 ($\lambda_{máxima} = 512$ nm) de **16** con *L*-lisina.

En la tabla y gráfica siguientes se representan las constantes de complejación de la sonda **16** (10^{-4} M, DMSO) con los distintos α -aminoácidos estudiados, disueltos en agua ($\lambda_{excitación} = 366$ nm, $\lambda_{máxima} = 512$ nm)

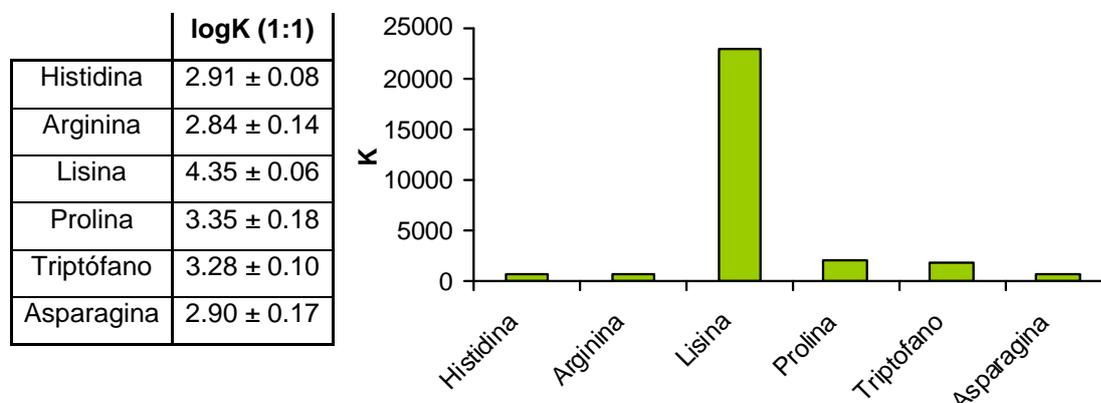


Tabla 14, Figura 92: Representación de las constantes de complejación de la sonda **16** (10^{-4} M, DMSO) con los distintos α -aminoácidos disueltos en agua.

El cambio frente a *L*-lisina es tan característico que se realizaron unas pruebas para comprobar si este cambio es lo suficientemente significativo en comparación con los

cambios en presencia de los otros α -aminoácidos con los que existe algo de señal en fluorescencia. Así, se prepararon disoluciones 10^{-4} M de **16** en DMSO y se fueron añadiendo una serie de α -aminoácidos en H₂O, en distinto orden: histidina, triptófano, asparagina, prolina y lisina. Primer vial: referencia. Segundo vial: adición de 1 equivalente de histidina, triptófano, asparagina y prolina sobre la referencia. Tercer vial: Adición de 1 a 4 equivalentes de lisina sobre la mezcla del segundo vial. Cuarto vial: adición de 1 a 4 equivalentes de lisina sobre la referencia.

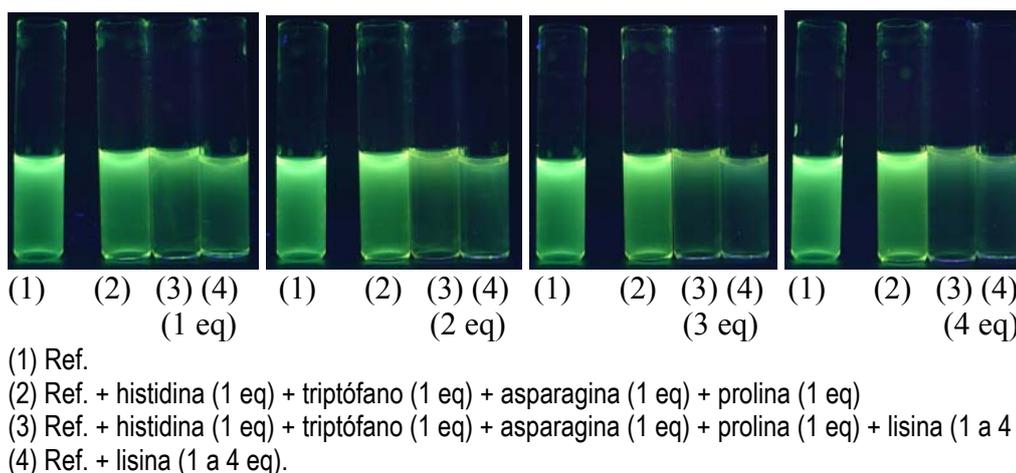


Figura 93: Efecto de la adición de 1 a 4 equivalentes de *L*-lisina sobre disoluciones que contienen distintos aminoácidos que pueden actuar como interferentes

Si se compara el comportamiento de las disoluciones que contienen *L*-lisina con las que no lo tienen, se comprueba una clara disminución de la fluorescencia en los casos en los que hay *L*-lisina en el medio, tanto si hay presentes otros aminoácidos como si no. Por otro lado la adición de la mezcla de aminoácidos (sin lisina) sobre la disolución de referencia no genera disminución aparente de la fluorescencia.

Las pruebas cualitativas realizadas inicialmente con ω -aminoácidos lineales muestran resultados que merecen la pena ser estudiados, ya que a simple vista se produce una cierta disminución de fluorescencia en presencia de los mismos, por lo que es interesante cuantificar las constantes de complejación para los aminoácidos de esta serie.

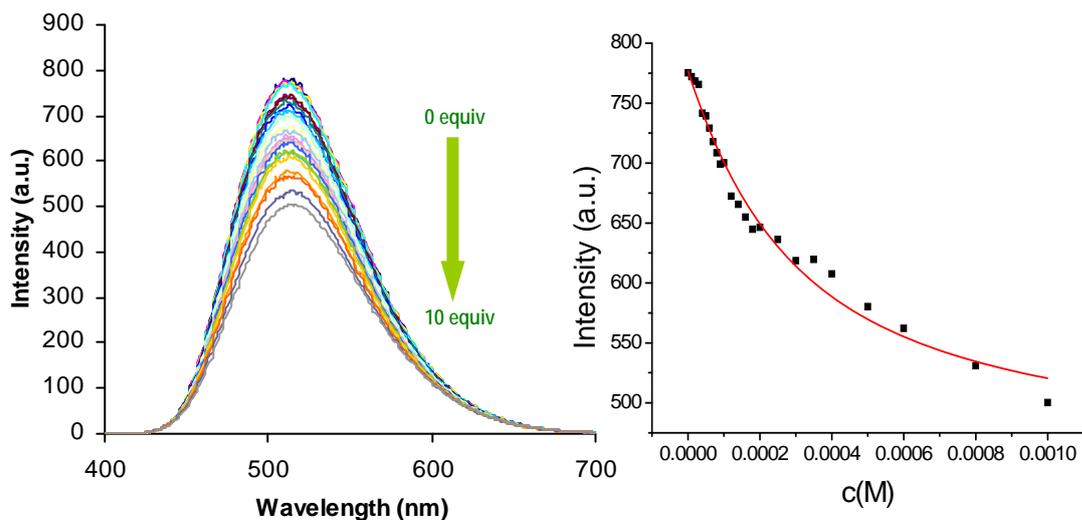


Figura 94: Izquierda: Espectros de emisión para la valoración fluorimétrica de **16** (10^{-4} M en DMSO) con *L*-glicina (H_2O) ($\lambda_{excitación} = 366$ nm). Derecha: Ajustes para el cálculo de la constante de formación del complejo 1:1 ($\lambda_{máxima} = 512$ nm) de **16** con *L*-glicina.

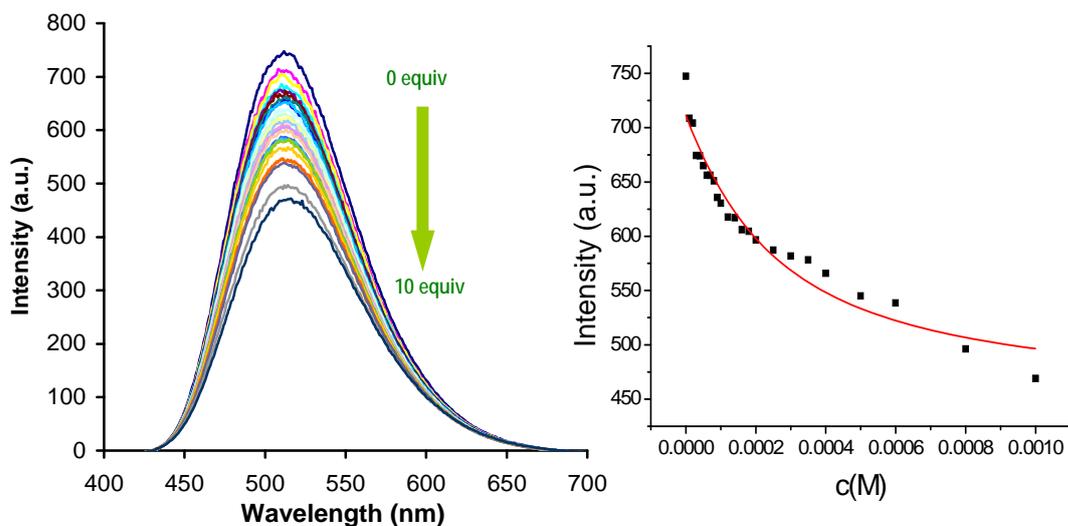


Figura 95: Izquierda: Espectros de emisión para la valoración fluorimétrica de **16** (10^{-4} M en DMSO) con *L*-alanina (H_2O) ($\lambda_{excitación} = 366$ nm). Derecha: Ajustes para el cálculo de la constante de formación del complejo 1:1 ($\lambda_{máxima} = 512$ nm) de **16** con *L*-alanina.

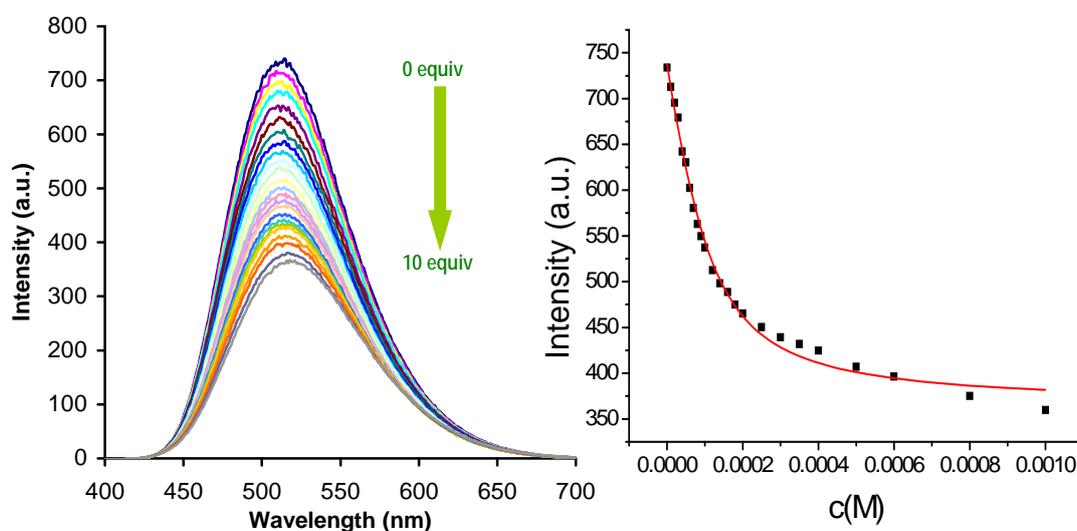


Figura 96: Izquierda: Espectros de emisión para la valoración fluorimétrica de **16** (10^{-4} M en DMSO) con β -alanina (H_2O) ($\lambda_{\text{excitación}} = 366$ nm). **Derecha:** Ajustes para el cálculo de las constantes de formación del complejo 1:1 ($\lambda_{\text{máxima}} = 512$ nm) de **16** con β -alanina.

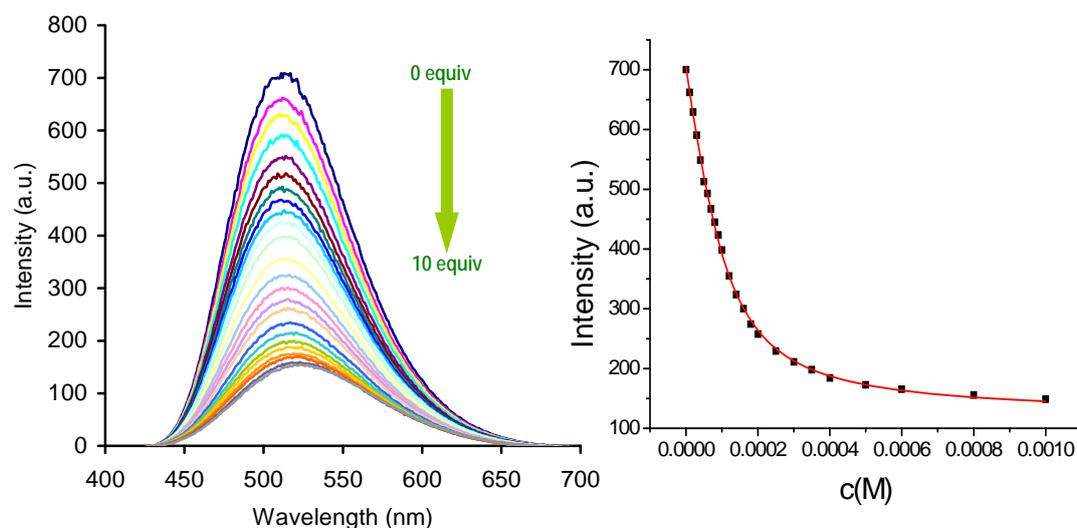


Figura 97: Izquierda: Espectros de emisión para la valoración fluorimétrica de **16** (10^{-4} M en DMSO) con GABA (H_2O) ($\lambda_{\text{excitación}} = 366$ nm). **Derecha:** Ajustes para el cálculo de la constante de formación del complejo 1:1 ($\lambda_{\text{máxima}} = 512$ nm) de **16** con GABA.

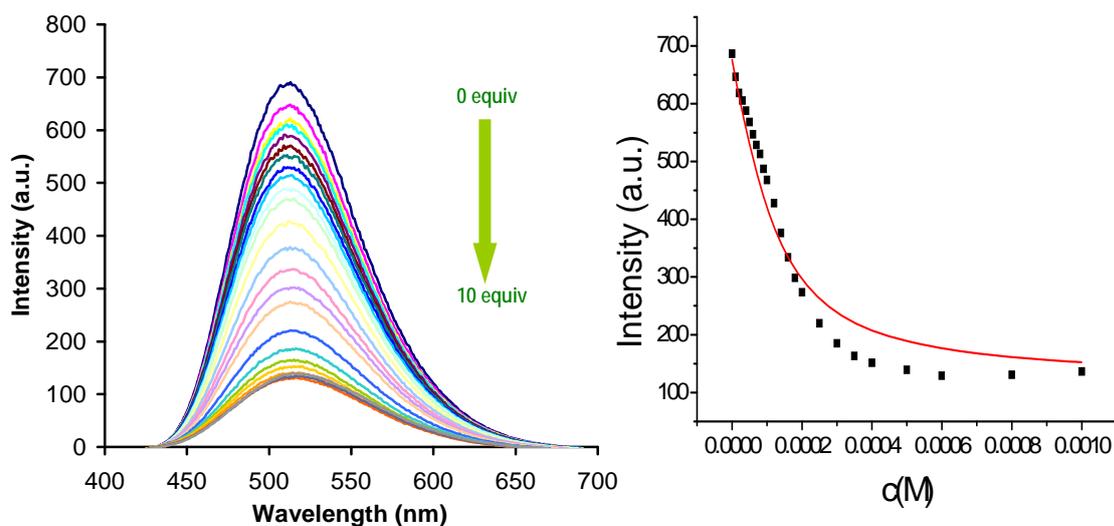


Figura 98: **Izquierda:** Espectros de emisión para la valoración fluorimétrica de **16** (10^{-4} M en DMSO) con ac. 5-aminovalérico (H_2O) ($\lambda_{excitación} = 366$ nm). **Derecha:** Ajustes para el cálculo de K, complejo 1:1 ($\lambda_{máxima} = 512$ nm) de **16** con ac. 5-aminovalérico.

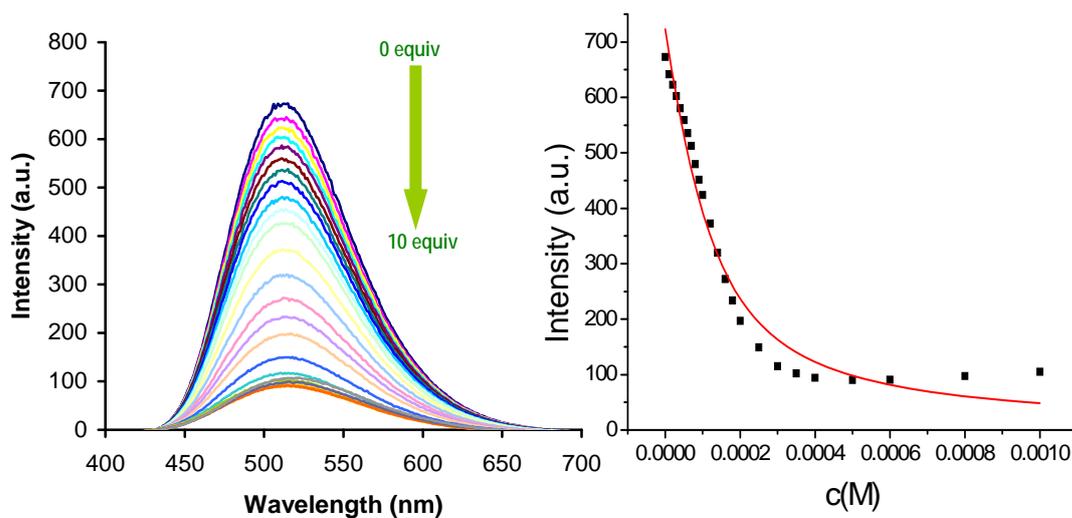


Figura 99: **Izquierda:** Espectros de emisión para la valoración fluorimétrica de **16** (10^{-4} M en DMSO) con ac. 6-aminohexanoico (H_2O) ($\lambda_{excitación} = 366$ nm). **Derecha:** Ajustes para el cálculo de K del complejo 1:1 ($\lambda_{máxima} = 512$ nm) de **16** con ac. 6-aminohexanoico.

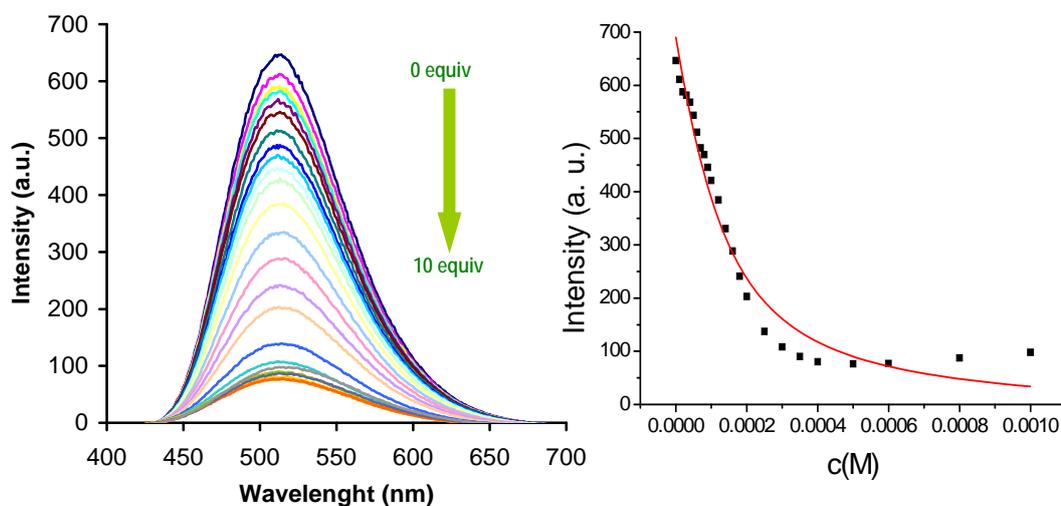


Figura 100: Izquierda: Espectros de emisión para la valoración fluorimétrica de **16** (10^{-4} M en DMSO) con ac. 7-aminoheptanoico (H_2O) ($\lambda_{excitación} = 366$ nm). Derecha: Ajustes para el cálculo de K del complejo 1:1 ($\lambda_{máxima} = 511$ nm) de **16** con ac. 7-aminoheptanoico.

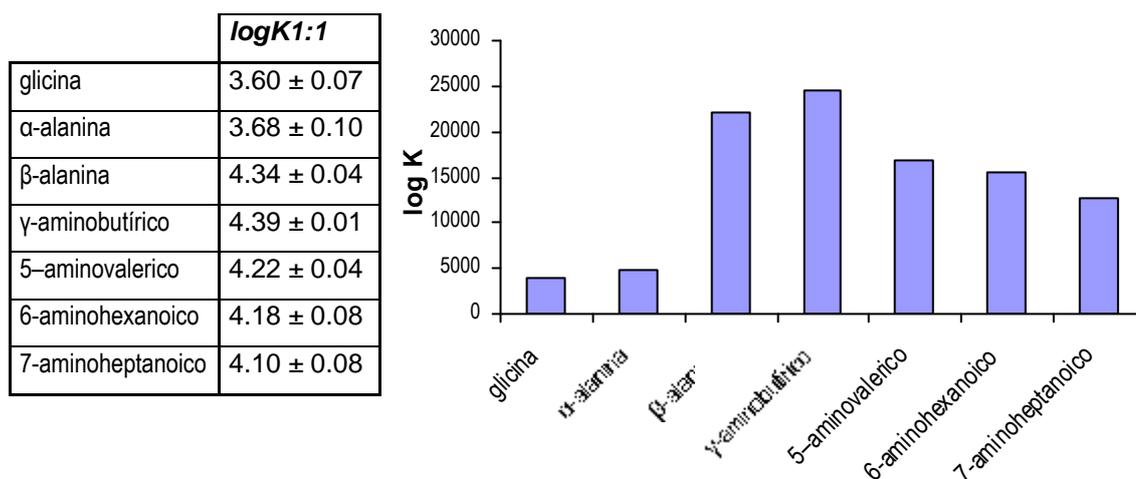


Tabla 15, Figura 101: Representación de las constantes de complejación de **16** (10^{-4} M, DMSO) con los distintos aminoácidos estudiados, disueltos en agua ($\lambda_{excitación} = 366$ nm, $\lambda_{máxima} = 512$ nm)

A continuación se amplió el estudio al reconocimiento de metabolitos y fármacos.

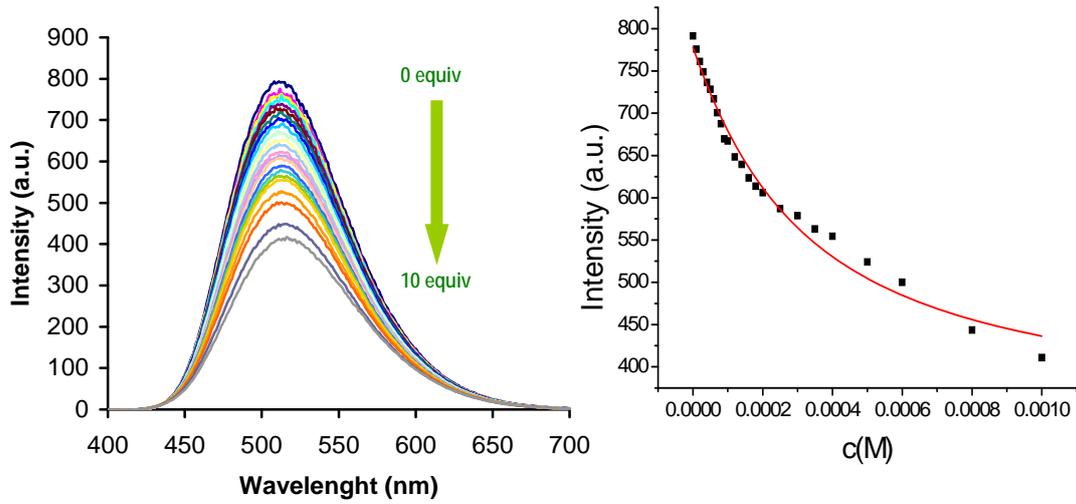


Figura 102: Izquierda: Espectros de emisión para la valoración fluorimétrica de **16** (10^{-4} M en DMSO) con creatina (H_2O) ($\lambda_{excitación} = 366$ nm). **Derecha:** Ajustes para el cálculo de la constante de formación del complejo 1:1 ($\lambda_{máxima} = 512$ nm) de **16** con creatina.

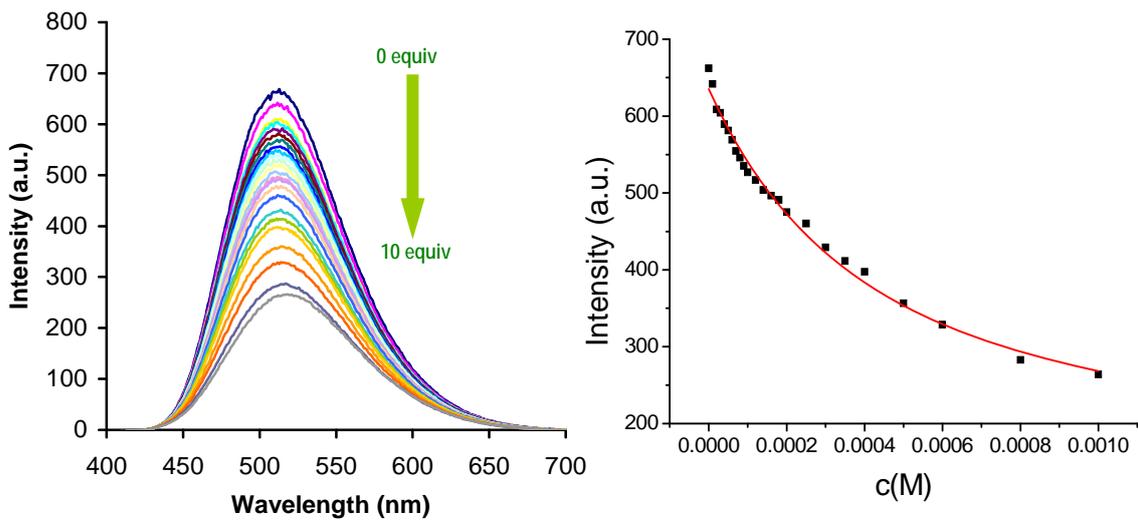


Figura 103: Izquierda: Espectros de emisión para la valoración fluorimétrica de **16** (10^{-4} M en DMSO) con creatinina (H_2O) ($\lambda_{excitación} = 366$ nm). **Derecha:** Ajustes para el cálculo de la constante de formación del complejo 1:1 ($\lambda_{máxima} = 512$ nm) de **16** con creatinina.

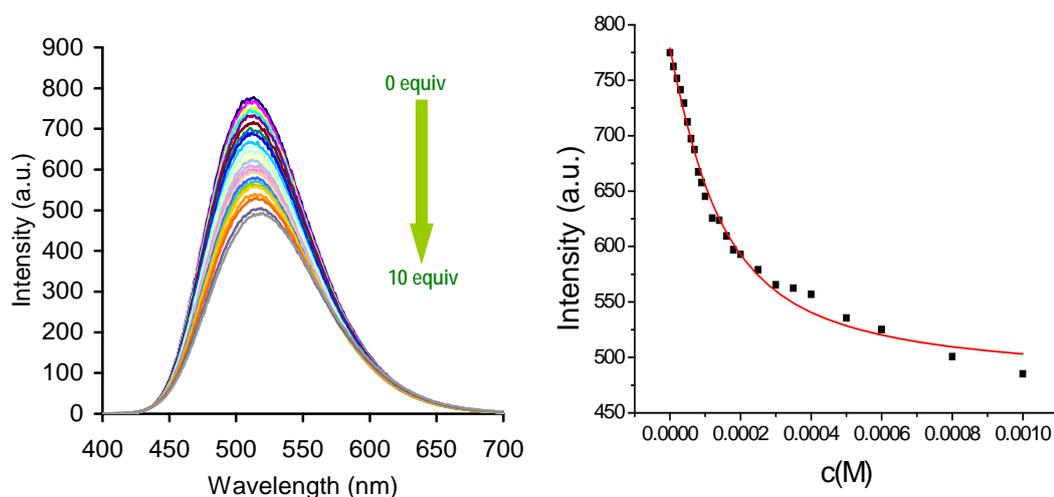


Figura 104: Izquierda: Espectros de emisión para la valoración fluorimétrica de **16** (10^{-4} M en DMSO) con gabapentina (H_2O) ($\lambda_{excitación} = 366$ nm). **Derecha:** Ajustes para el cálculo de la constante de formación del complejo 1:1 ($\lambda_{máxima} = 512$ nm) de **16** con gabapentina.

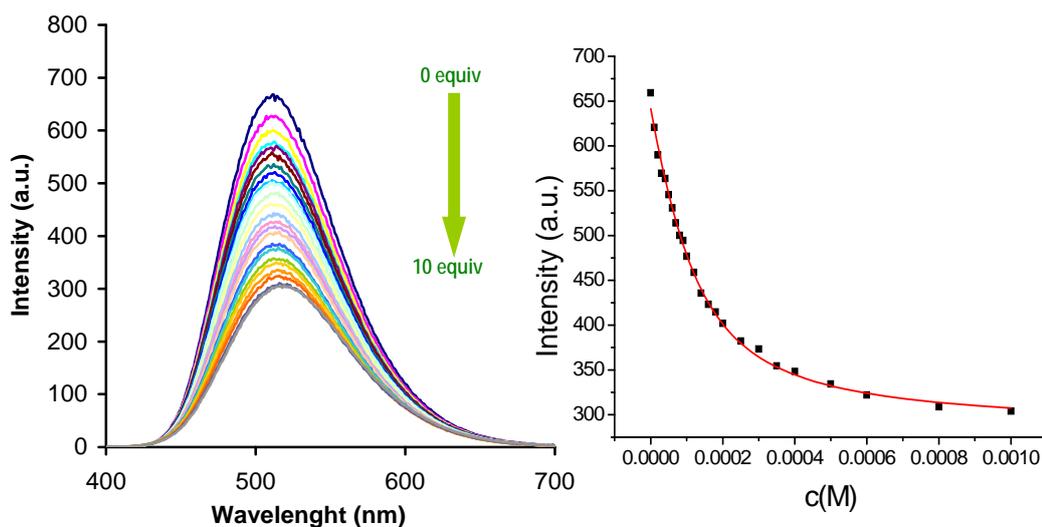


Figura 105: Izquierda: Espectros de emisión para la valoración fluorimétrica de **16** (10^{-4} M en DMSO) con L-carnitina (H_2O) ($\lambda_{excitación} = 366$ nm). **Derecha:** Ajustes para el cálculo de la constante de formación del complejo 1:1 ($\lambda_{máxima} = 512$ nm) de **16** con L-carnitina.

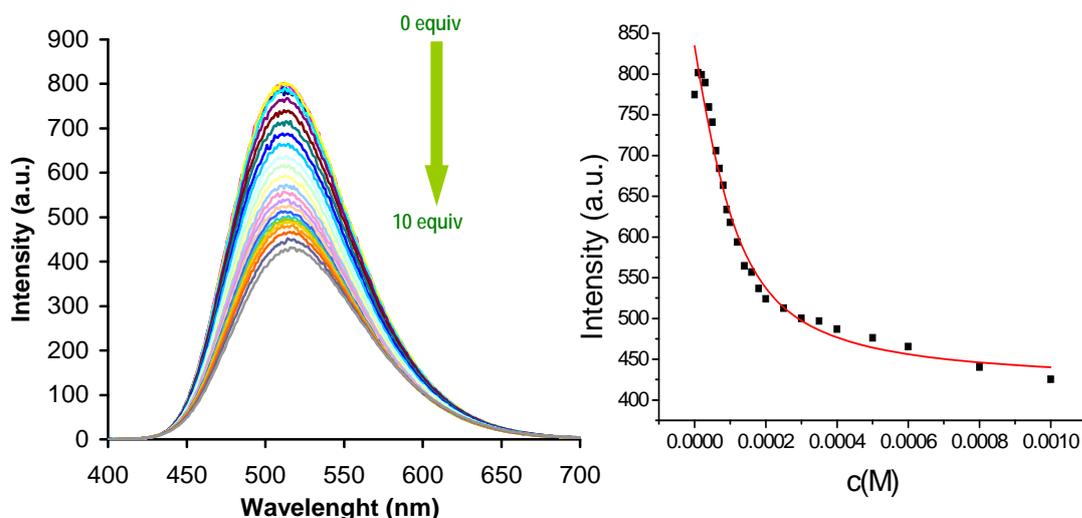


Figura 106: Izquierda: Espectros de emisión para la valoración fluorimétrica de **16** (10^{-4} M en DMSO) con carnosina (H_2O) ($\lambda_{excitación} = 366$ nm). Derecha: Ajustes para el cálculo de la constante de formación del complejo 1:1 ($\lambda_{máxima} = 512$ nm) de **16** con carnosina.

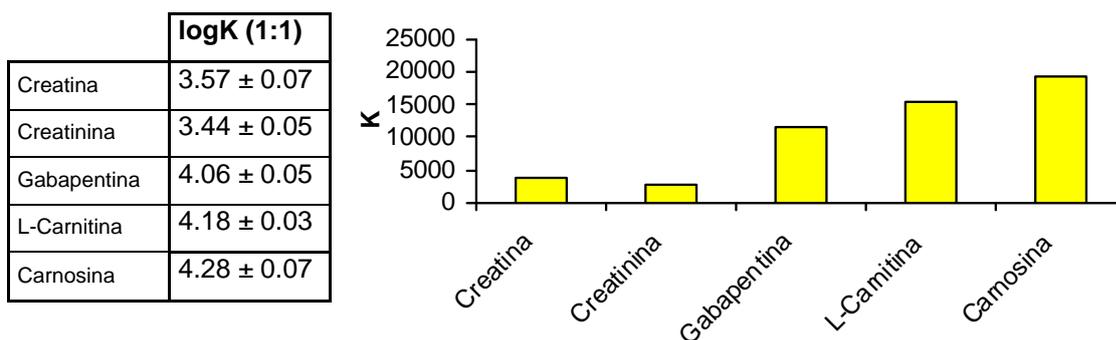


Tabla 16, Figura 107: Representación de las constantes de complejación de **16** (10^{-4} M, DMSO) con los distintos metabolitos y fármacos estudiados (H_2O , $\lambda_{excitación} = 366$ nm, $\lambda_{máxima} = 512$ nm)

De todos los metabolitos y fármacos estudiados, el cambio más acusado se produce con carnosina, que es un dipéptido de β -alanina e histidina (β -alanil-L-histidina), utilizado como suplemento nutricional. La estructura del dipéptido carnosina está cercana a la de los ω -aminoácidos y la constante de complejación es del mismo orden que la obtenida con algunos de los miembros de esa serie, por lo que parece que la sonda

fluorogénica se comporta también como una regla molecular, en que los parámetros de emisión dependen de la estructura del analito con el que se coordina.

Para completar el estudio se realizó un análisis por el método Job's Plot, que sirve para confirmar el tipo de complejo formado entre receptor y analito. Se ha utilizado un analito al que responde de forma selectiva, como es la carnosina, tal como puede verse en la figura siguiente.

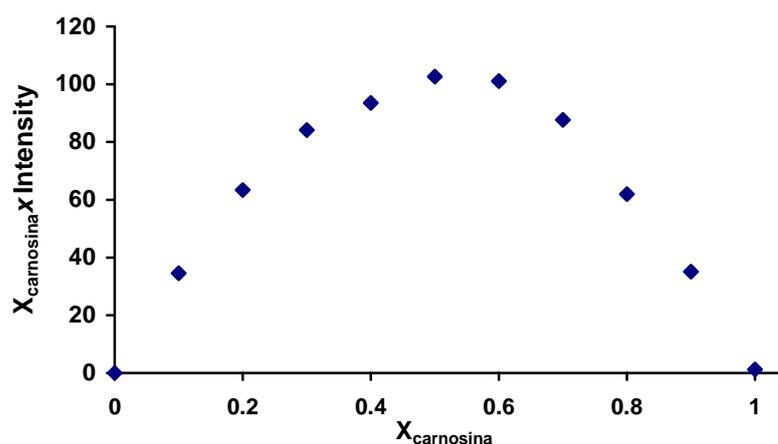


Figura 108: Análisis por el método Job's Plot del complejo **16**:carnosina

Siguiendo el método Job's Plot para el complejo **16** (en DMSO) y carnosina (en H_2O), se ha representado en el eje de abscisas la fracción molar de analito y en el de ordenadas el producto de la intensidad de fluorescencia por la fracción molar de analito. La gráfica correspondiente muestra un máximo a 0.5 de fracción molar, lo que confirma la estequiometría 1:1 del complejo formado.

Estudio del límite de detección de carnosina (disuelta en H_2O):

En este caso corresponde con un valor de $5.61 \cdot 10^{-6}$ M.

Estudio del límite de detección de carnosina (disuelta en HEPES, pH = 8.2)

En este caso corresponde con un valor de $8.12 \cdot 10^{-6}$ M.

Se ha realizado también la valoración cuantitativa de **16** con carnosina en condiciones fisiológicas, utilizando tampón HEPES pH = 8.2 como medio de disolución de carnosina. La constante de complejación de **16** (10^{-4} M, DMSO) con carnosina en tampón ($\lambda_{\text{excitación}} = 366$ nm, $\lambda_{\text{máxima}} = 512$ nm) da un valor de 4.21 ± 0.08 , similar al obtenido mediante disolución acuosa, lo que prueba que se puede realizar la valoración de cada uno de los aminoácidos o metabolitos a los que la sonda tiene una sensibilidad efectiva en medios tamponados.

CONCLUSIONES:

De los resultados experimentales obtenidos en este capítulo se pueden sacar las siguientes conclusiones:

Se ha puesto a punto una sonda fluorescente de derivados de ω -aminoácidos que se comporta también como una regla molecular, extinguiéndose la emisión fluorescente inicial en función de la distancia entre el grupo amonio terminal y el grupo carboxilato del analito.

La sonda fluorescente es suficientemente selectiva como para que sirva para la detección de ω -aminoácidos y sus metabolitos, como el dipéptido carnosina, encontrados en suplementos nutricionales, así como fármacos relacionados estructuralmente con ellos, como gabapentina, a partir de sus formulaciones farmacéuticas comerciales.

Es posible realizar la detección de los analitos en condiciones fisiológicas tamponadas.

4. CONCLUSIONES

De los hechos experimentales expuestos en esta memoria se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1.- Se ha realizado la exploración sistemática de una serie de complejos de paladio, de los cuales se han estudiado sus características como sensores químicos de cationes, encontrándose que uno de ellos es especialmente adecuado para esta función presentando una alta selectividad y sensibilidad frente a catión mercurio(II) en distintos disolventes.

2.- El estudio de los procesos de detección de mercurio(II) y metilmercurio(II) ha permitido establecer una serie de equilibrios de reacción a partir de los cuales pueden identificarse y cuantificarse las especies de mercurio(II) y metilmercurio(II), e incluso cuantificar ambas en una mezcla conjunta.

3.- Se ha puesto a punto una nueva sonda cromogénica y fluorogénica OFF-ON para la detección a simple vista de catión cobre(II) en mezclas de acetonitrilo-agua, en condiciones de selectividad completa y sensibilidad nanomolar.

4.- La sonda desarrollada para el catión cobre(II) puede ser útil para la detección de cobre(II) en muestras de origen medioambiental en el rango de las cantidades traza ($\mu\text{g l}^{-1}$), requeridas por los organismos vivos, mediante espectroscopía de ultravioleta-visible y fluorescencia.

5.- Se ha puesto a punto una sonda fluorescente tipo bis-urea, para derivados de ω -aminoácidos, que se comporta como una regla molecular, cambiando la emisión fluorescente amarilla inicial en azul en función de la distancia entre el grupo amonio terminal y el grupo carboxilato del analito.

6.- La sonda fluorescente es suficientemente selectiva como para que sirva para la detección de ω -aminoácidos y sus metabolitos encontrados en suplementos nutricionales, así como fármacos relacionados con ellos, como pregabalina o gabapentina, a partir de sus formulaciones farmacéuticas comerciales.

7.- De entre una serie de compuestos fluorogénicos tipo bis-diarilureas, se ha puesto a punto una sonda fluorogénica de aminas biogénicas, que funciona generando una elevada fluorescencia en presencia de diversas aminas de origen natural o sintético, en que la fluorescencia generada depende de la estructura de la amina utilizada, y que se extingue con el tiempo, siendo la velocidad de formación y de extinción distinta para cada amina estudiada.

8.- La sonda fluorogénica estudiada es capaz de discriminar entre las diversas aminas biogénicas o miméticas de las mismas, que es capaz de detectar por vía fluorogénica, debido al peso que tiene cada componente estudiada en el análisis de componentes principales, lo que puede ser aplicado a aminas de alto interés farmacológico o biológico, como anfetaminas sintéticas, con límites de detección extraordinariamente bajos.

9.- Se ha puesto a punto una sonda fluorescente tipo bis-amida, para la detección de derivados de ω -aminoácidos, que se comporta también como una regla molecular, extinguiéndose la emisión fluorescente inicial en función de la distancia entre el grupo amonio terminal y el grupo carboxilato del analito.

10.- La sonda fluorescente es suficientemente selectiva como para que sirva para la detección de ω -aminoácidos y sus metabolitos encontrados en suplementos nutricionales, así como fármacos relacionados estructuralmente con ellos, a partir de sus formulaciones farmacéuticas comerciales, siendo posible realizar la detección de los analitos en condiciones fisiológicas tamponadas.

5. APÉNDICE EXPERIMENTAL

PROCEDIMIENTOS GENERALES

Las reacciones bajo atmósfera inerte se llevaron a cabo en matraces previamente secados y purgados en corriente de nitrógeno. Los disolventes utilizados se secaron inmediatamente antes de su uso por destilación en atmósfera inerte sobre un agente desecante adecuado. Los agentes desecantes utilizados fueron Na/benzofenona para THF y benceno.

La cromatografía de capa fina fue realizada utilizando sílica gel Merck 60 GF-254, utilizando como reveladores luz ultravioleta de 254/366 nm, ácido fosfomolibdico, p-anisaldehído o yodo. Las cromatografías preparativas se desarrollaron sobre placas de 20 x 20 cm y 1 mm de espesor. Para la cromatografía de columna se utilizó sílica gel Merck 60 (230-400 mesh ASTM).

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Gallenkamp y no están corregidos.

Los espectros de infrarrojos (IR) fueron realizados en pastilla de bromuro potásico en un espectrofotómetro Nicolet Impact 410, Perkin Elmer Spectrum BX.

Los espectros de resonancia magnética nuclear de protón (RMN-¹H) y carbono (RMN-¹³C) fueron realizados en disolución del disolvente deuterado que se indica en cada caso, en aparatos Varian Mercury 300 MHz (300 MHz) y Varian Unity Inova 400 (400 MHz).

Los espectros de masas se realizaron en un espectrómetro VG-Micromass AutoSpec, en impacto electrónico a una energía de 70 eV.

Las pruebas de espectroscopía de UV-Visible se realizaron en un espectrómetro Varian Cary 300 Bio, en cubetas de 1 cm y a una temperatura controlada de 25°C.

Los espectros de fluorescencia fueron realizados en un espectrofómetro Varian Cary Eclipse en cubetas de 1 cm y a una temperatura controlada de 25°C.

Las sales que se utilizaron en el estudio de las propiedades de los sensores químicos fueron en forma de percloratos o de triflato en el caso de los cationes de interés, para los aniones se utilizaron las correspondientes sales de tetrabutilamonio y para algunos casos de aminoácidos se utilizaron las correspondientes sales de HCl. En todos los casos se usó como disolvente acetonitrilo Aldrich, 99.98+% HPLC grade, H₂O bidestilada ó DMSO.

METODOLOGIA PARA EL ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES COMO SENSORES QUÍMICOS

Estudio cualitativo

El primer paso en el estudio de las propiedades como sensor químico colorimétrico de cualquier compuesto, es el screening cualitativo con una serie de analitos de interés medioambiental: Ag⁺, Ni²⁺, Sn²⁺, Cd²⁺, Zn²⁺, Pb²⁺, Cu²⁺, Fe³⁺, Sc³⁺, Al³⁺, Hg²⁺ como cationes y F⁻, Cl⁻, Br⁻, I⁻, BzO⁻, NO³⁻, H₂PO₄⁻, HSO₄⁻, AcO⁻, CN⁻, SCN⁻ como aniones, para ello se utilizan las siguientes sales:

CATIONES		ANIONES	
g ⁺	A AgClO ₄ · xH ₂ O	F ⁻	[CH ₃ (CH ₂) ₃] ₄ NF
i ²⁺	N Ni(ClO ₄) ₂ · 6H ₂ O	Cl ⁻	[CH ₃ (CH ₂) ₃] ₄ NCl
	S Sn(CF ₃ SO ₃) ₂	Br ⁻	[CH ₃ (CH ₂) ₃] ₄ NBr

n^{2+}	C	$Cd(ClO_4)_2$	I^-	$[CH_3(CH_2)_3]_4NI$
d^{2+}	Z	$Zn(CF_3SO_3)_2$	BzO^-	$[CH_3(CH_2)_3]_4N(OCOC_6H_5)$
n^{2+}	P	$Pb(ClO_4)_2$	NO_3^-	$[CH_3(CH_2)_3]_4N(NO_3)$
b^{2+}	C	$Cu(ClO_4)_2 \cdot 6H_2O$	$H_2PO_4^-$	$[CH_3(CH_2)_3]_4N(H_2PO_4)$
u^{2+}	F	$Fe(ClO_4)_3 \cdot xH_2O$	HSO_4^-	$[CH_3(CH_2)_3]_4N(HSO_4)$
e^{3+}	S	$Sc(CF_3SO_3)_3$	AcO^-	$[CH_3(CH_2)_3]_4N(OCOCH_3)$
c^{3+}	A	$Al(ClO_4)_3 \cdot 9H_2O$	CN^-	$[CH_3C(CH_2)]N(CN)$
l^{3+}	H	$Hg(ClO_4)_2$	SCN^-	$[CH_3(CH_2)_3]_4N(SCN)$
g^{2+}				

Tabla 1

Se preparan disoluciones 5×10^{-2} M, 5×10^{-3} M, 5×10^{-4} M de cada uno de los iones, así como también se prepara una disolución 10^{-4} M de la molécula ligando. A partir de aquí se establecen las alícuotas que deben añadirse.

Para las adiciones de H^+ y OH^- , se utilizan disoluciones de 5×10^{-3} M en agua de H_2SO_4 y $NaOH$, respectivamente.

El resto de aniones utilizados tales como aminoácidos o aminas han sido utilizados como especies neutras, bien porque se utilizaban directamente o bien por que se neutralizaban las especies iónicas de partida con $NaOH$.

El ensayo se lleva a cabo bajo una luz blanca (230-240V; 50-60Hz) y las fotografías se realizan con una cámara digital SONY modelo DSC P10.

Para todas las pruebas se utiliza un juego de micropipetas EPPENDORF Research que presentan los siguientes datos técnicos:

MODE LO	Ep T.I.P.S.	Volumen	Error sistemático de medición (Inexactitud)	Error aleatorio de medición (Imprecisión; CV)
2 - 20 μ l	2 - 200	2 μ l	$\pm 5.0 \%$	$\leq 1.5 \%$
		10 μ l	$\pm 1.2 \%$	$\leq 0.6 \%$
		20 μ l	$\pm 1.0 \%$	$\leq 0.3 \%$
10 - 100 μ l	2 - 200	10 μ l	$\pm 3.0 \%$	$\leq 1.0 \%$
		50 μ l	$\pm 1.0 \%$	$\leq 0.3 \%$
		100 μ l	$\pm 0.8 \%$	$\leq 0.2 \%$
100 - 1000 μ l	50 - 1000	100 μ l	$\pm 3.0 \%$	$\leq 0.6 \%$
		5000 μ l	$\pm 1.0 \%$	$\leq 0.2 \%$
		1000 μ l	$\pm 0.6 \%$	$\leq 0.2 \%$
500 - 5000 μ l	100- 5000	500 μ l	$\pm 2.4 \%$	$\leq 0.6 \%$
		2500 μ l	$\pm 1.2 \%$	$\leq 0.25 \%$
		5000 μ l	$\pm 0.6 \%$	$\leq 0.15 \%$

Tabla 2

Las primeras pruebas se realizarán en el disolvente en el que las moléculas presentan una mayor solubilidad.

Se pipetea 2 ml de disolución en diferentes viales, y se añade 1 equivalente (40 μ l de disolución 5×10^{-3} M) de catión o anión [pipeta (10 - 100 μ l)].

En primer lugar se observa con que analitos se produce el cambio de color, también es importante tener en cuenta que el proceso de cambio de color sea estable con el tiempo, por eso se realiza una fotografía al comienzo, y otra transcurridos unos minutos (5 min. aproximadamente).

Así mismo, se comprueba el cambio bajo la luz ultravioleta ($\lambda = 366$ nm), si los complejos formados, al añadir el primer equivalente de analito, son fluorescentes o por el contrario se disminuye la fluorescencia con respecto al ligando.

Si se continúan añadiendo equivalentes del analito, la dilución comienza a ser un factor a tener en cuenta, pero en este caso al ser un estudio meramente cualitativo no es significativo.

A continuación se añade agua desionizada, hasta 6 o 8 equivalentes (alícuotas de 40 μ l), para comprobar el comportamiento de las especies formadas en medio acuoso.

Una vez recogidas todas las fotos se hace un estudio para determinar que analitos serán los más interesantes de cara a un estudio más profundo. Deben tenerse en cuenta principalmente tres características:

- sensibilidad
- selectividad
- estabilidad en medio acuoso

Para optimizar los resultados se repiten las pruebas modificando el % de agua, posteriormente, se repite la misma secuencia de pasos con otros disolventes, como, MeCN, DMSO, EtOH ...

Una vez comprobados los efectos que produce cada analito, se hace hincapié en el estudio de la selectividad, una de las pruebas consiste en introducir en un vial junto con los 2 ml de disolución de ligando un equivalente de cada uno de los analitos con los que no cambia de color o de fluorescencia, y posteriormente añadir el analito, al que es sensible, para comprobar si la presencia del resto de analitos le afecta.

Estudio cuantitativo

Valoración en UV-Vis y en fluorescencia:

Una vez hecho el análisis oportuno tras las pruebas cualitativas se elige en que disolventes y para que analitos es oportuno hacer la valoraciones, tanto en UV-Vis como fluorescencia.

Para la valoración en UV-Vis, el procedimiento será siempre el mismo, pipetear en un vial 5 ml de una disolución 10^{-4} M de ligando, sobre este volumen se adicionan cantidades crecientes de disolución de catión o de anión (disoluciones 5×10^{-2} M, 5×10^{-3} M, 5×10^{-4} M), intentando que el incremento de volumen sea mínimo, ya que para los posteriores cálculos debe considerarse que la concentración de ligando permanece constante.

A continuación se muestra, como ejemplo, la siguiente tabla en la que se aprecian los volúmenes añadidos:

V añadido (μl)	V total (μl)	Eq.	Concentración
0	5000	0	0
5	5005	0.05	4.995E-06
50	5010	0.1	9.98E-06
15	5015	0.15	1.4955E-05
20	5020	0.2	1.992E-05
25	5025	0.25	2.4876E-05
30	5030	0.3	2.9821E-05
35	5035	0.35	3.4757E-05
40	5040	0.4	3.9683E-05
45	5045	0.45	4.4599E-05
50	5050	0.5	4.9505E-05
55	5055	0.55	5.4402E-05
60	5060	0.6	5.9289E-05
65	5065	0.65	6.4166E-05
70	5070	0.7	6.9034E-05
75	5075	0.75	7.3892E-05
80	5080	0.8	7.874E-05
85	5085	0.85	8.3579E-05
90	5090	0.9	8.8409E-05
95	5095	0.95	9.3229E-05
100	5100	1	9.8039E-05
105	5105	1.05	0.00010284
110	5110	1.1	0.00010763
115	5115	1.15	0.00011241
120	5120	1.2	0.00011719
125	5125	1.25	0.00012195
130	5130	1.3	0.00012671

V añadido (μl)	V total (μl)	Eq.	Concentración
135	5135	1.35	0.00013145
140	5140	1.4	0.00013619
145	5145	1.45	0.00014091
150	5150	1.5	0.00014563
155	5155	1.55	0.00015034
160	5160	1.6	0.00015504
165	5165	1.65	0.00015973
170	5170	1.7	0.00016441
180	5180	1.8	0.00017375
190	5190	1.9	0.00018304
200	5200	2	0.00019231
210	5210	2.1	0.00020154
220	5220	2.2	0.00021073
230	5230	2.3	0.00021989
240	5240	2.4	0.00022901
250	5250	2.5	0.0002381
260	5260	2.6	0.00024715
270	5270	2.7	0.00025617
280	5280	2.8	0.00026515
300	5300	3	0.00028302
320	5320	3.2	0.00030075
340	5340	3.4	0.00031835
360	5360	3.6	0.00033582
380	5380	3.8	0.00035316
400	5400	4	0.00037037
405	5405	4.5	0.00041628
410	5410	5	0.00046211
415	5415	5.5	0.00050785
420	5420	6	0.00055351

Tabla 3

Para realizar correctamente la valoración se siguen los siguientes pasos:

En primer lugar se selecciona el método a utilizar con el software desde el que se maneja el equipo; los barridos generalmente se realizan entre 700-200 nm y es necesario hacer en primer lugar un barrido con el blanco que en nuestro caso es el disolvente.

El 1^{er} barrido se hace con la disolución del ligando en concentración 10^{-4} M. De este modo al observar el espectro completo se estudia cual es la banda representativa del color del ligando, será la que debe controlarse a lo largo de toda la valoración.

Para el 2^o barrido se vacía el contenido de la cubeta en el vial y sobre los 5 ml de disolución se añade la alícuota (micropipeta 2-20 μ l) de catión o del anión, se homogeneiza varias veces, y con esta nueva disolución se llena de nuevo la cubeta de cuarzo ($V = 3$ ml) y se realiza el segundo barrido.

El proceso se repite sucesivas veces, se observa como la banda responsable del color original desaparece y aparece otra banda responsable de la aparición del nuevo color o por el contrario, la banda original se desplaza por efecto de la adición del ión.

La valoración continúa hasta que en el espectro UV-Vis no se aprecie variación en las bandas (exceso de analito).

Una vez finalizado el proceso, se guardan los resultados como un archivo ASCII.

Estos datos se pasan a una hoja Excel y se representan por un lado todos los barridos realizados, y por otro lado, para una longitud de onda fija, se representa la variación de absorbancia frente a la concentración de catión o anión (en moles/litro) de la disolución valorada.

Para la valoración en fluorescencia, se pipetea, también, en un vial 5 ml de una disolución 10^{-4} M de Ligando, sobre este volumen se adicionan cantidades crecientes de disolución de analito (disoluciones 5×10^{-2} M, 5×10^{-3} M, 5×10^{-4} M), intentando, del mismo modo, que el incremento de volumen sea mínimo (tabla 3).

Los pasos para realizar la valoración por fluorescencia varían un poco de los anteriores, previamente, se tendrá que realizar un espectro de absorbancia en UV-Vis, tanto del ligando como del complejo, si es fluorescente:

En primer lugar se selecciona el método a utilizar con el software desde el que manejamos el equipo, se realiza un barrido previo (“PreScan”), donde el fluorímetro indica los espectros de excitación y emisión (situado en ángulo de 90° respecto del

detector) y las posibles longitudes de onda de excitación de la muestra, según el equipo. Siempre que se pueda, se elegirá el punto isobéptico de la valoración en UV-Vis, como longitud de onda de excitación, para asegurar que la absorción sea la misma en todos los puntos de la valoración y que la emisión, así leída, sea por tanto, comparable. Los barridos generalmente se elegirán dependiendo de donde este la 1ª dispersión Rayleigh.

Una vez seleccionada la longitud de onda de excitación, es necesario hacer diferentes pruebas para optimizar diferentes parámetros del equipo, como el tamaño de la rendija, $\lambda_{\text{excitación}}$, el tamaño de la rendija de emisión, la velocidad de los barridos, etc.

Una vez elegidos los diferentes parámetros, se realiza un barrido con el disolvente utilizado. Los datos obtenidos se restaran a cada barrido de la valoración.

El siguiente barrido se hace con la disolución del ligando. Para los sucesivos barridos, como en la valoración en UV-Vis, se vacía el contenido de la cubeta en el vial y sobre los 5 ml de disolución se añade la alícuota (micropipeta 2-20 μl) de analito, se homogeneiza varias veces, y con esta nueva disolución se llena de nuevo la cubeta ($V = 3$ ml), realizándose el barrido.

La valoración continúa hasta que en el espectro de emisión no se aprecien cambios (exceso de analito).

Una vez finalizado el proceso, se guardan los resultados como un archivo ASCII.

Estos datos se pasan a una hoja Excel y, si es necesario, se realiza un filtrado (“smoothed”) si los espectros tienen mucho ruido. Posteriormente se representan por un lado todos los barridos realizados (una vez restado el barrido del disolvente), y por otro lado, para la longitud de onda en el máximo de emisión, se representa la intensidad relativa frente a la concentración de catión o anión (en moles/litro) de la disolución valorada.

Tratamiento de los datos

A partir de los datos de la variación de la absorbancia o intensidad relativa de fluorescencia frente a la concentración de catión o anión añadida, es posible determinar las constantes de estabilidad de los complejos formados.

Complejos ML

En el caso de la formación de una especie de estequiometría 1:1, el equilibrio está controlado por una constante de estabilidad K , que depende de la concentración de las diferentes especies en el equilibrio (ligando libre L , metal libre M y complejo ML):



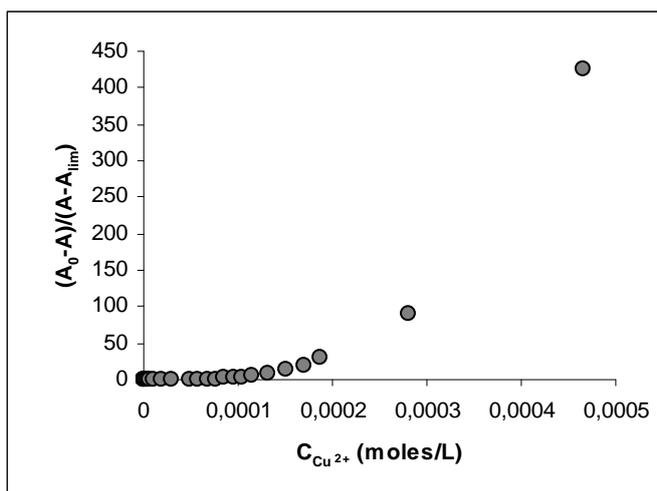
La ecuación de la constante de equilibrio puede ser reescrita en términos de absorbancia del siguiente modo:

$$\frac{A_0 - A}{A - A_{\text{lim}}} = K[M]$$

Donde A es la absorbancia de la disolución y A_0 y A_{lim} son los valores de la absorbancia del ligando libre y del complejo respectivamente.

Si además se supone que la concentración total de metal en el medio (CM) es igual a $[M]$, entonces es posible determinar la constante K a partir del cálculo de la pendiente de la recta obtenida al representar $(A_0 - A)/(A - A_{\text{lim}})$ en función de CM . Sin embargo, en la mayoría de los casos esta aproximación no es válida, y debe utilizarse un modelo más complicado para determinar la constante del equilibrio.

En el siguiente gráfico se muestran los datos obtenidos en el caso de una valoración con Cu^{2+} en UV-Vis. Se observa que la dependencia entre $(A_0 - A)/(A - A_{\text{lim}})$ y CM no es lineal, por lo que la aproximación $CM = [M]$ no puede ser aplicada.



En estos casos deben utilizarse modelos más complicados para el cálculo de la constante. En la formación de complejos 1:1 el modelo utilizado es el siguiente:1

$$A = A_0 + \frac{A_{\text{lim}} - A_0}{2C_0} \left[C_0 + C_M + \frac{1}{K} - \sqrt{\left(C_0 + C_M + \frac{1}{K} \right)^2 - 4C_0C_M} \right]$$

Siendo: A: absorbancia de la disolución a lo largo de la valoración

A_0 : absorbancia del ligando

A_{lim} : absorbancia del complejo ML

C_0 : concentración del ligando

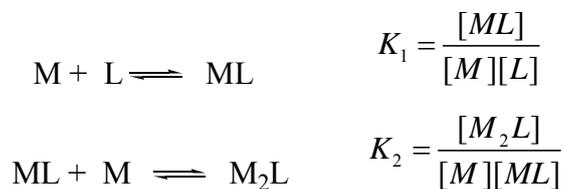
C_M : concentración del metal a lo largo de la valoración

K: constante de formación del complejo

De este modo, la constante K puede ser determinada mediante un ajuste no lineal de mínimos cuadrados de la absorbancia observada A en función de C_M .

En el caso de la formación de complejos de estequiometría más compleja (M_2L , ML_2 , M_2L_3), existen también diferentes modelos matemáticos, que permiten obtener el valor de las constantes de los diferentes equilibrios.2

Complejos M_2L



$$A = \frac{A_0 + C_0 b K_1 [M] + A_{\text{lim}} \beta [M]^2}{1 + K_1 [M] + \beta [M]^2}$$

Siendo $\beta = K_1 K_2$ y b el coeficiente de absorción molar del complejo intermedio

ML

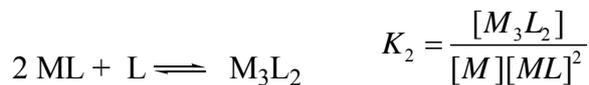
¹ (a) *Principles and Methods in Supramolecular Chemistry*, 2nd ed.; (Eds.: H. J. Schneider, A. Yatsimirsky) John Wiley & Sons: Chichester, **2000**. (b) J. Bourson, J. Pouget, B. Valeur. *J. Phys. Chem.* **1993**, 97, 4552-4557.

² D. Taziaux, “*Fluoroionophores dérivés de la coumarine 343: photophysique et étude de la complexation de cations alcalins et alcalino-terreux*” Tesis Doctoral, Université Catholique de Louvain.

Complejos ML_2 

$$A = \frac{N}{4K_1K_2[M]} \left(\frac{A_0}{C_0} + bK_1[M] + \frac{A_{\text{lim}}N}{2C_0} \right)$$

$$N = -1 - K_1[M] + \sqrt{(1 + K_1[M])^2 + 8C_0K_1K_2[M]}$$

Complejos M_3L_2 

$$A = \frac{N}{4K_1^2K_2[M]^3} \left(\frac{A_0}{C_0} + bK_1[M] + \frac{A_{\text{lim}}N}{2C_0} \right)$$

$$N = -1 - K_1[M] + \sqrt{(1 + K_1[M])^2 + 8C_0K_1^2K_2[M]^3}$$

Todas estas expresiones se utilizan con la aproximación $CM = [M]$, y K se determina a partir de un ajuste no lineal por mínimos cuadrados de la absorbancia A en función de CM .

El ajuste de los datos se realiza con el programa matemático (Microcal ORIGIN v.7.0).

Valoración por RMN-¹H

Las valoraciones se realizan en un Espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear, modelo VARIAN MERCURY 300 MHz o VARIAN UNITY INOVA 400 MHz.

En este caso deben aumentarse las concentraciones ya que la técnica es menos sensible. Se prepara una disolución 0.007733 M de ligando, (3 mg de ligando en 0.75 ml del disolvente deuterado correspondiente) en el tubo de RMN.

Ejemplo: En las valoraciones por RMN-¹H del ligando realizadas con Cu²⁺, se va a añadir alícuotas de una disolución 2.9·10⁻² M de Cu²⁺ en acetonitrilo deuterado. En la Tabla 4 se aprecia el aumento del volumen en el tubo de RMN al finalizar la valoración

V añadido de Cu ²⁺ (μl)	Eq	V añadido de Cu ²⁺ (μl)	Eq
10	0.05	160	0.8
20	0.1	170	0.85
30	0.15	180	0.9
40	0.2	190	0.95
50	0.25	200	1
60	0.3	240	1.2
70	0.35	280	1.4
80	0.4	320	1.6
90	0.45	360	1.8
100	0.5	400	2
110	0.55	440	2.2
120	0.6	480	2.4
130	0.65	520	2.6
140	0.7	560	2.8
150	0.75	600	3

Tabla 4

Procedimiento:

Se llena un tubo de RMN (NORELL, 509-UP, 178 mm, ultra precisión) con la disolución preparada de Ligando en el disolvente deuterado elegido (0.75 ml), el primer espectro será el del Ligando.

La valoración se realiza sobre el tubo de RMN inicial, se añaden las alícuotas de catión (20 μl), se agita ligeramente y se adquiere un nuevo espectro.

Considerando los resultados obtenidos previamente en UV-VIS, así serán el número de puntos que se tomen en esta nueva valoración.

En este caso no es tan importante el efecto de la dilución (no se efectúa un seguimiento cuantitativo) ya que no son tan importantes las concentraciones sino poder observar bien las especies que se forman a lo largo de la valoración.

STOPPED FLOW

La técnica de stopped-flow es especialmente útil para los estudios cinéticos de reacciones rápidas en disolución, para determinar las concentraciones de los reactivos químicos a partir de los resultados cinéticos. El sistema de detección es siempre el mismo (Figura X) y está compuesto por dos pistones donde se encuentran los reactivos, una cámara de mezcla y un pistón de parada que detiene el flujo de las disoluciones de los reactivos en cuanto se produce la mezcla.

Las medidas cinéticas se llevaron a cabo en un equipo de stopped-flow, bajo temperatura controlada ± 0.1 °C y provisto de dos sistemas de detección, tanto de fluorescencia como de absorbancia. La señal obtenida a lo largo del curso de la reacción fue recogida en un osciloscopio digital Tektronik 2212 y la señal fue transferida a un ordenador en la que los resultados fueron analizados por ajustes no lineales utilizando funciones multiexponenciales³. Las medidas utilizadas en los ajustes son los valores medios obtenidos tras 10 repeticiones de cada experimento:

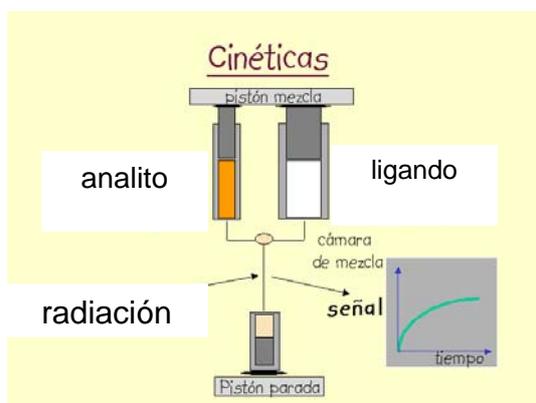


Figura 1

ANÁLISIS MULTICOMPONENTE

El Análisis de Componentes Principales es una técnica estadística de síntesis de la

³ S. W. Provencher, *J. Chem. Phys.* **1976**, *64*, 2772-2777.

información, o reducción del número de variables. Es decir, ante un banco de datos con muchas variables, el objetivo será reducirlas a un menor número perdiendo la menor cantidad de información posible.

Los nuevos componentes principales o factores serán una combinación lineal de las variables originales, y además serán independientes entre sí.

Un aspecto clave en el Análisis de Componentes Principales es la interpretación de los factores que será deducida tras observar la relación de los factores con las variables iniciales, debe tenerse en cuenta tanto el signo como la magnitud de las correlaciones y para ello es necesario conocer ampliamente todos los resultados del sistema a estudiar.

METODO DE JOB'S PLOT PARA EL CÁLCULO DEL TIPO DE COMPLEJO FORMADO ENTRE ANALITO Y LIGANDO

Este método permite determinar experimentalmente la relación estequiométrica en la que se combinan los reactivos de una reacción. Se basa en la realización de una serie de disoluciones empleando cantidades diferentes de cada reactivo (variando las fracciones molares de ambos) pero manteniendo constante la cantidad total. Puede entonces medirse una variable del sistema, relacionada con la concentración, como es en este caso la Absorbancia o la Fluorescencia y representarse frente a la variación de la concentración de uno de los reactivos.

Por ejemplo, en este caso tras realizar las pertinentes medidas de fluorescencia, se representa el valor del producto Intensidad de fluorescencia por la fracción molar de analito, frente a la fracción molar de analito (X_a)

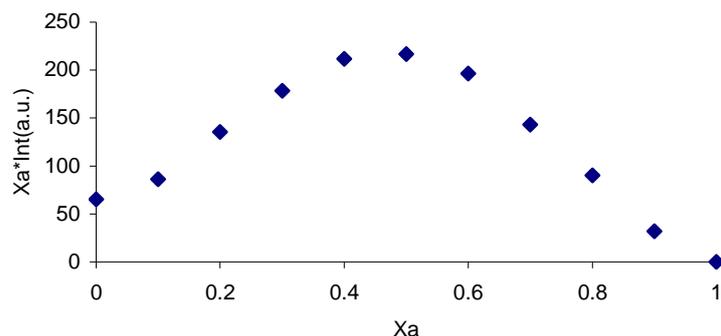


Figura 2. Analisis Job's Plot de la bisdiarilurea **14** (10^{-4} M en DMSO) con triptamina.
($\lambda_{\text{excitación}}=390$ nm, $\lambda_{\text{emisión}} = 515$ nm).

CÁLCULO DE LÍMITE DE DETECCIÓN

Se procede al cálculo del límite de detección en los dos disolventes para los que se han realizado el resto de ensayos, DMSO para la disolución de bisdiarilurea **14** y MDA en H_2O . El método utilizado para este cálculo es el de la variabilidad del blanco descrito en el libro Handbook of Chemometrics and Qualimetrics⁴.

Para ello se realiza una recta de calibrado, se valida y se miden, en las mismas condiciones, varias réplicas del blanco, en el caso de que la disolución de ligando presente señal sin presencia de analito será tomada como blanco, como ocurre en este caso realizándose 10 réplicas del mismo a una longitud de onda fija.

Se realiza un calibrado con 5 medidas y 10 réplicas para el blanco utilizando una disolución 10^{-4} M de bisdiarilurea **14**:

(M) MDA	Intensidad	(M) MDA	Intensidad
0.000005	57.30054474	0.000025	134.505722
0.00001	80.40509033	0.00003	151.3577881
0.000015	101.607933	0.000035	174.2579803
0.00002	112.0621109	0.00004	194.4051056

Tabla 5

⁴ D. L. Massart, B. G. M. Vandeguiste, L. M. C. Buydens, S. De Jong, P. L. Lewi, J. Smeyers-Verbeke, *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A*, Capítulo 13, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 1997, p. 379.

Con estos valores construimos la recta de calibrado:

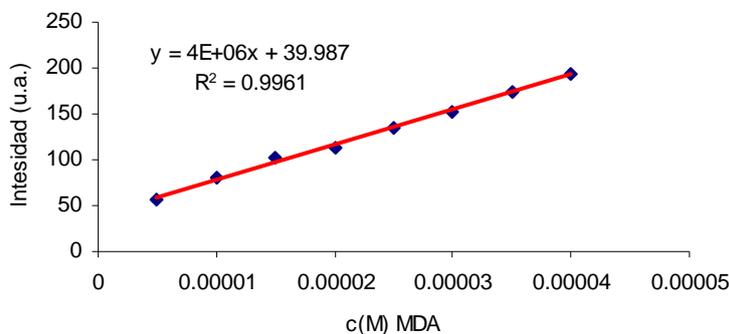


Figura 3

La ecuación obtenida por el ajuste por mínimos cuadrados es la siguiente:

$$y = 4E + 06x - 39.987 \tag{1}$$

Los valores de absorbancia de las medidas del blanco, disolución de ligando libre, son las que se detallan a continuación, así como el valor de la concentración calculada a partir de la ecuación [1].

réplicas	Intensidad	c(M) _{calc}
1	40.8143501	2.06838E-07
2	40.6610832	1.68521E-07
3	40.7860375	1.99759E-07
4	40.2789421	7.29855E-08
5	38.936245	-2.62689E-07
6	39.9844322	-6.41945E-10
7	38.4784584	-3.77135E-07
8	38.7967682	-2.97558E-07
9	38.4589005	-3.82025E-07
10	38.4399033	-3.86774E-07

Tabla 6

Para determinar el límite de detección se necesita la media (\bar{x}) y la desviación típica (s) de los datos de la concentración calculada sobre las réplicas del blanco:

$$\bar{x} \pm s = (-1.058 \pm 0.258) \cdot 10^{-7} \tag{2}$$

A un nivel de probabilidad del 5% ($\alpha=\beta=0.05$), el valor de $t_C=t_D$ según las tablas⁵ utilizadas, para 9 grados de libertad ($GL = N - 1 = 10 - 1 = 9$) es de 1.833.

Según este método, el límite de decisión viene dado por la siguiente ecuación.

$$L_C = t_C \times s \times \sqrt{1 + \frac{1}{N}} \quad [3]$$

Siendo N el número de réplicas del blanco (10).

Por lo tanto:

$$L_C = t_C \times s \times \sqrt{1 + \frac{1}{N}} = 1.833 \times 0.258 \cdot 10^{-7} \times \sqrt{1 + \frac{1}{10}} = 4.962 \cdot 10^{-8}$$

El límite de detección corresponde al doble del límite de decisión, con lo cual:

$$L_D = 2L_C = 9.924 \cdot 10^{-8}$$

Dicho límite de detección viene dado en términos de concentración por:

$$x_D = 2x_C = \frac{2L_C}{b} \quad [4]$$

Donde b es la pendiente de la recta de calibrado [1].

Entonces:

$$x_D = \frac{2L_C}{b} = \frac{2 \times 4.962 \cdot 10^{-8}}{4E - 06} = 2.481 \cdot 10^{-14}$$

Por lo tanto, el límite de detección de la bisdiarilurea **14**, a la concentración de $CL=10^{-4}$ M para MDA en H_2O , corresponde con un valor de $2.481 \cdot 10^{-14}$ M.

RENDIMIENTO CUÁNTICO

El rendimiento cuántico de fluorescencia muestra la eficacia del proceso fluorescente, y es la relación entre el número de fotones emitidos y el de fotones absorbidos:

⁵ D. L. Massart, B. G. M. Vandeguisse, L. M. C. Buydens, S. De Jong, P. L. Lewi, J. Smeyers-Verbeke, *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A*, Capítulo 13, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 1997, p. 379.

$$\phi = \frac{n_{\text{emitidos}}}{n_{\text{absorbidos}}}$$

La expresión que define el valor del rendimiento cuántico de un compuesto de forma experimental es la siguiente:

$$\phi = \phi_s \cdot \frac{A_s}{A} \cdot \frac{F}{F_s} \cdot \frac{n^2}{n_s^2}$$

Donde:

Φ_s : Rendimiento cuántico de la sustancia estándar.

A_s : Absorbancia de la sustancia estándar a λ_{max}

F_s : Área bajo la curva de emisión de la sustancia estándar.

n_s : Índice de refracción del disolvente en el que se encuentra el estándar

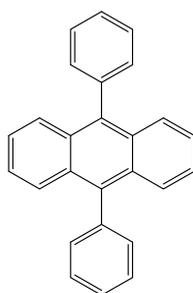
A : Absorbancia de la muestra a λ_{max} .

F : Área bajo la curva de emisión de la muestra problema.

n : Índice de refracción del disolvente en el que se encuentra el estándar

Ejemplo:

Para el cálculo del rendimiento cuántico de un compuesto cualquiera, se utiliza como patrón una de las moléculas más utilizadas para las técnicas fluorimétricas, el 9,10-diphenylanthracene (DPA) disuelto en ciclohexano.



$\Phi_s = 0.95$ en CICLOHEXANO

Abs = 393 nm en CICLOHEXANO

El compuesto que a estudiar tiene un máximo de absorbancia próximo a los 389 nm en THF. La proximidad de este valor con el de la referencia utilizada hace que se cumpla una de las condiciones para aplicar el método para el cálculo del rendimiento cuántico.

El procedimiento utilizado se puede dividir en los siguientes pasos:

1º) Se preparan dos disoluciones de la referencia en CICLOHEXANO y otras dos del compuesto problema (bisurea **6**) en THF y se realizan los correspondientes espectros UV-Vis (el máximo de absorbancia en todos los casos debe estar entre 0.03 y 0.1 unidades de absorbancia):

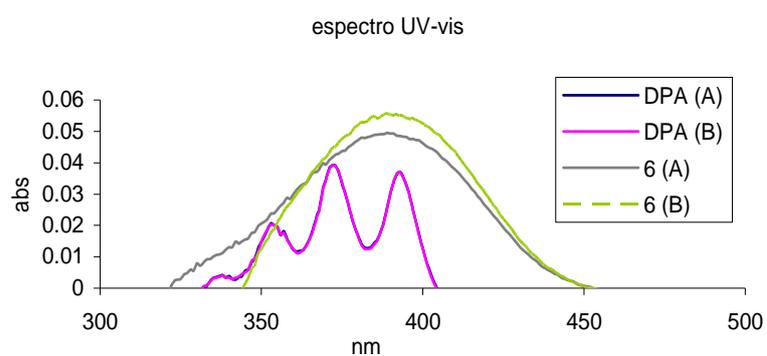


Figura 4

2º) A continuación se realizan las medidas de los espectros de emisión de fluorescencia con estas mismas disoluciones, como λ excitación se utiliza un valor próximo al máximo de absorbancia, en este caso 393 nm.

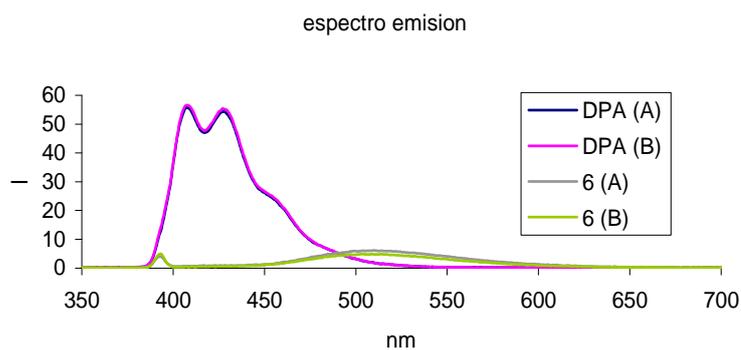


Figura 5

3º) Con los resultados obtenidos tras estas medidas se procede al cálculo del rendimiento cuántico del compuesto problema. Utilizando los valores medios de los resultados obtenidos con el estándar para aplicarlos en el cálculo del Φ de las réplicas del compuesto problema por separado y finalmente haciendo la media de los dos resultados obtenidos⁶

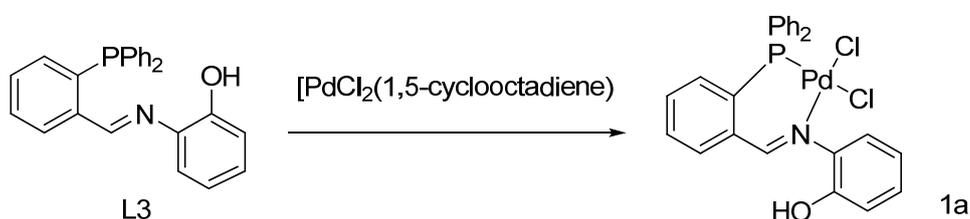
Exc.393 nm	SlitsEx.5	SlitsEm.5				
sample	Solvent	OD@exc	A	int. Fluo	red. Fluo	n
6 (A)	THF	0.050	0.10875	6.5694E+02	6.0409E+03	1.408
6 (B)	THF	0.056	0.12098	5.1347E+02	4.2444E+03	1.408
standard	Solvent	OD@exc mean	A mean	int. Fluo mean	red. Fluo	n
DPA	C ₆ H ₁₂	0.037	0.081667	3170.48251	38821.88454	1.427
DPA	C ₆ H ₁₂	0.037	0.081667	3170.48251	38821.88454	1.427

standard	QY (std)	QY (sample)	QY mean
DPA	0.95	0.14391	
DPA	0.95	0.10111	0.12252

⁶ Cálculos realizados según el método del Federal Institute for Materials Research and Testing (BAM), Unter den Eichen 87, 12205 Berlin, Alemania).

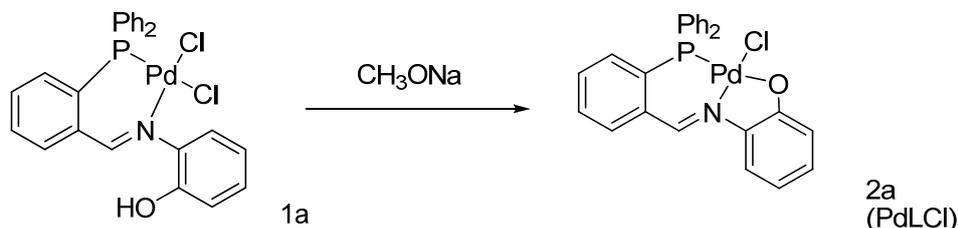
6. SPECTROSCOPIC AND ANALYTICAL CHARACTERIZATION OF COMPOUNDS

[Pd{2-[(2-diphenylphosphanylbenzylidene)(*o*-phenol)amine]Cl₂}Cl₂] (1a):



[PdCl₂(cod)] (0.106 g, 3.71 mmol) and ligand **L3**¹ (0.145 g, 3.81 mmol) were dissolved in dichloromethane (15 mL) and stirred at room temperature. Then the solvent was evaporated, the residue was filtered at reduced pressure and washed with ether. A yellow solid was obtained (0.199 g, 3.56 mmol, 96%). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 6.71 (m, 1H), 6.85 (m, 1H), 7.10 (m, 1H), 7.21 (t, 1H, *J*_{H-H} = 8.95 Hz), 7.35 (d, 1H, *J*_{H-H} = 7.9 Hz), 7.60 (m, 10H, Ph₂), 7.80 (t, 1H, *J*_{H-H} = 7.6 Hz), 7.94 (t, 1H, *J*_{H-H} = 7.7 Hz), 8.21 (m, 1H, (d) *J*_{H-P} = 8 Hz), 8.80 (s, 1H, HCN), 9.22 (br, 1H, OH); ³¹P NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 30.90; IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 494 (Pd-N), 1616 (C=N), 2260 cm⁻¹ (OH); elemental analysis calcd (%) for C₂₅H₂₀Cl₂NOPPd: C, 53.74; H, 3.61; N, 2.51; found: C, 53.93; H, 3.52; N, 2.66.

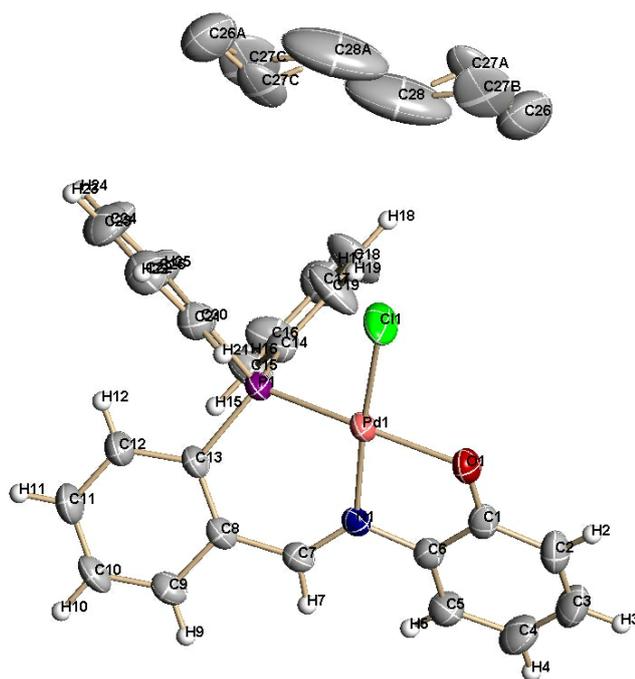
¹ J. R. Dilworth, S. D. Howe, A. J. Hutson, J. R. Miller, J. Silver, R. M. Thompson, M. Harman, M. B. Hursthouse, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1994**, 3553-3562

[Pd{2-[(2-diphenylphosphanylbenzylidene)(*o*-phenolate)amine}Cl] (2a):

Complex **1a** (0.099 g, 1.77 mmol) was dissolved in dichlorometane (10 mL), then NaMeO/MeOH 0.29 M solution (0.6 mL, 1.7 mmol) was added under stirring. After the addition, the solvent was evaporated under reduced pressure and the residue was dissolved in dichlorometane and filtered through Kieselgur. The solution was concentrated under reduced pressure and precipitated with hexane. The precipitate was filtered under reduced pressure and washed with ether. Purple lustrous crystals (0.082 g, 0.157 mmol, 90%) were obtained. Single crystals, suitable for X-ray diffraction, were grown by slow diffusion in acetone/hexane from an acetone solution of the complex. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 6.43 (dd, 1H, $J_{\text{H-H}} = 1.4, 6.9$ Hz), 6.96 (dd, 1H, $J_{\text{H-H}} = 1.4, 8.4$ Hz), 7.08 (m, 1H), 7.33 (dd, 1H, $J_{\text{H-H}} = 1.3, 8.7$ Hz), 7.36 (s, 1H), 7.42 (m, 4H), 7.51 (m, 2H), 7.55 (m, 1H), 7.65 (m, 4H, [d in $^1\text{H}\{^{31}\text{P}\}$ -NMR, $J_{\text{H-P}} = 7.2$ Hz]), 7.73 (m, 1H), 7.83 (m, 1H, [d in $^1\text{H}\{^{31}\text{P}\}$ -NMR, $J = 7.2$ Hz]), 8.50 (d, 1H, $J_{\text{H-P}} = 2.9$ Hz, HCN); ^{31}P NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 33.55; IR (KBr): $\tilde{\nu} = 1101$ (C-O), 1579 cm^{-1} (C=N); elemental analysis calcd (%) for $\text{C}_{25}\text{H}_{19}\text{ClNOPPd}$: C, 57.49; H, 3.67; N, 2.68; found: C, 57.38; H, 3.59; N, 2.63. Crystal data for **5**, $\text{C}_{53}\text{H}_{38}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_2\text{P}_2\text{Pd}_2$, $M = 1080.49$, triclinic, P-1, $a = 10.4716(9)$ Å, $b = 10.7759(10)$ Å, $c = 12.1189(11)$ Å, $\alpha = 79.939(2)^\circ$, $\beta = 74.7020(10)^\circ$, $\gamma = 70.8850(10)^\circ$; $V = 1240.46(19)$ Å 3 , $Z = 1$, $D_{\text{calc}} = 1.446$ gcm^{-3} , $\mu(\text{Mo-K}\alpha) = 0.938$ mm^{-1} . Purple prism, (0.50 x 0.20 x 0.10) mm^3 . 11781 measured reflections, 4281 independent ($R_{\text{int}} = 0.0260$), 3919 observed ($I > 2\sigma(I)$). $R_1 = 0.0406$, $wR_2 = 0.1330$ (all data). CCDC 675180. **X-Ray Diffraction Structure Report for 2a (CCDC 675180):** A single crystal of **2a** was mounted on a glass fibre. X-ray measurements were made using a Bruker SMART CCD area-detector diffractometer with Mo-K α radiation ($\lambda = 0.71073$ Å).¹ Intensities were integrated² from several series of exposures, each exposure covering 0.3° in ω , and the

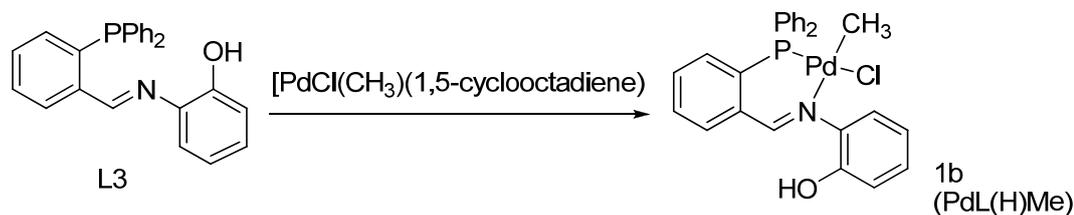
total data set being a sphere. Absorption corrections were applied, based on multiple and symmetry-equivalent measurements.³ The structure was solved by direct methods and refined by least squares on weighted F^2 values for all reflections (see Table 1).⁴ C26, C27 and C28 were refined with positional constraints. C27 is disordered in two positions with occupancy 0.25, C26 y C28 were refined with an occupancy factor of 0.5. All other non-hydrogen atoms were assigned anisotropic displacement parameters and refined without positional constraints. All hydrogen atoms were constrained to ideal geometries and refined with fixed isotropic displacement parameters. Refinement proceeded smoothly to give the final residuals. Complex neutral-atom scattering factors were used.⁵

1. SMART diffractometer control software, Bruker Analytical X-ray Instruments Inc., Madison, WI, 2000.
2. SAINT integration software, Siemens Analytical X-ray Instruments Inc., Madison, WI, 2000.
3. G. M. Sheldrick. *SADABS: A program for absorption correction with the Siemens SMART system*; University of Göttingen: Germany, 2001.
4. *SHELXTL program system version 6.1*; Bruker Analytical X-ray Instruments Inc., Madison, WI, 1998.
5. *International Tables for Crystallography*, Kluwer, Dordrecht, 1992, vol. C.

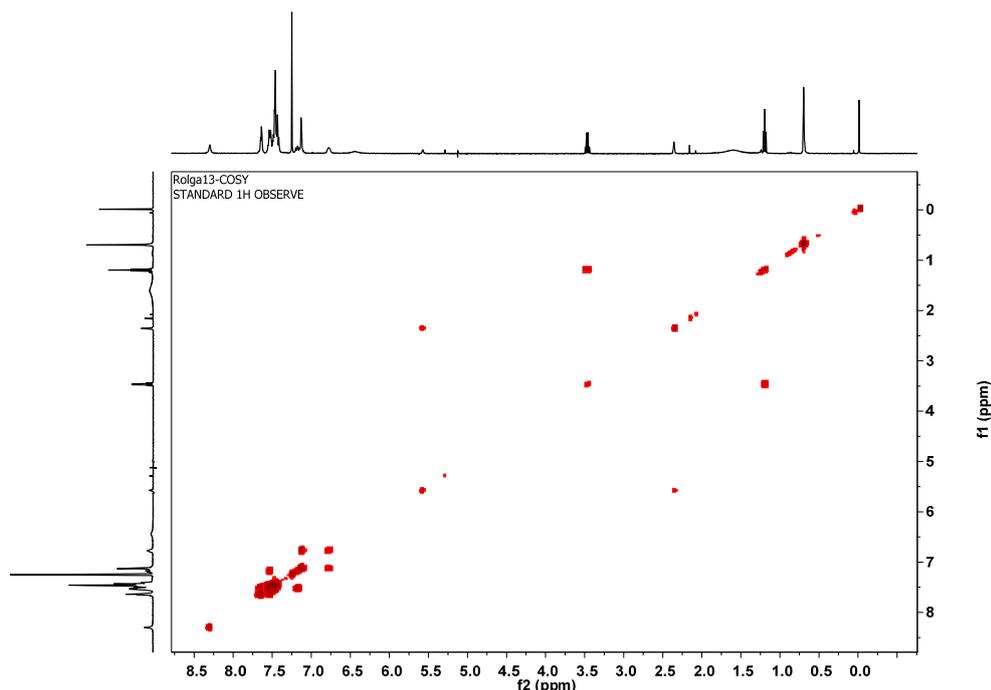


X-ray diffraction, Pd{2-[(2-diphenylphosphanylbenzylidene)(*o*-phenolate)amine]Cl

[Pd{2-[(2-diphenylphosphanylbenzylidene)(*o*-phenol)amine]ClMe} (1b).

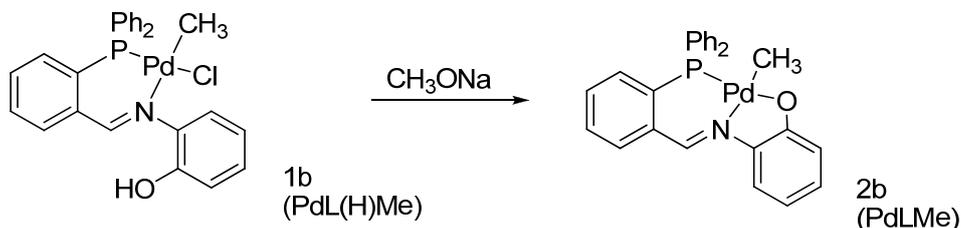


[PdClMe(cod)] (0.130 g, 4.90 mmol) and ligand **L3** (0.188 g, 4.92 mmol) were dissolved in dichlorometane (15 mL) and stirred for 1 hour at room temperature. Then the solvent was evaporated, the residue was filtered under reduced pressure and washed with ether. A yellow solid (0.223 g, 4.15 mmol, 85%) was obtained. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 0.71 (d, 3H, $J_{\text{H-P}} = 2.7$ Hz, Pd-CH₃), 6.79 (br, -OH), 7.14 (m, 2H), 7.19 (m, 1H), 7.46 (m, 10H, Ph₂), 7.54 (m, 3H), 7.65 (m, 2H), 8.31 (br, 1H, HCN); ^{31}P NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 39.38; IR (KBr) $\tilde{\nu}$ = 1622 (C=N), 3606 cm^{-1} (OH); elemental analysis calcd (%) for C₂₆H₂₃ClNOPPd: C, 58.01; H, 4.31; N, 2.60; found: C, 57.84; H, 4.47; N, 2.59.

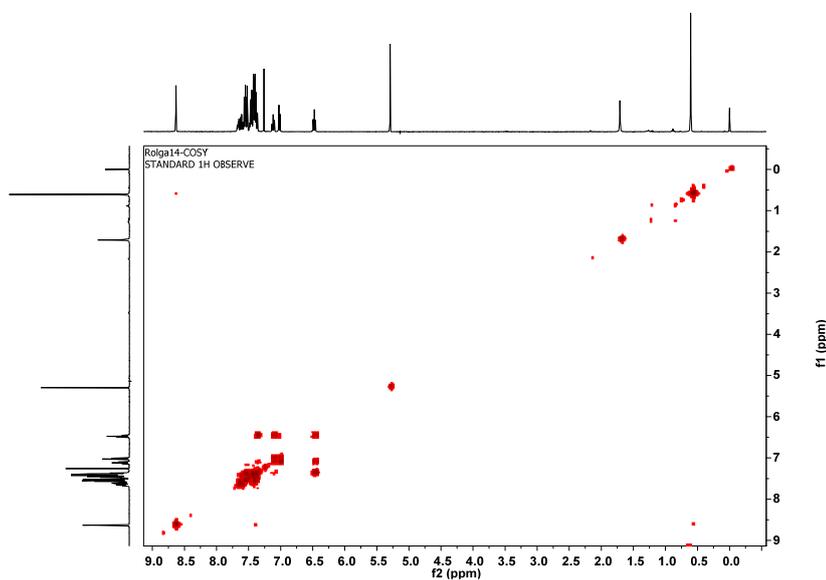


COSY of Pd{2-[(2-diphenylphosphanylbenzylidene)(*o*-phenol)amine]ClMe

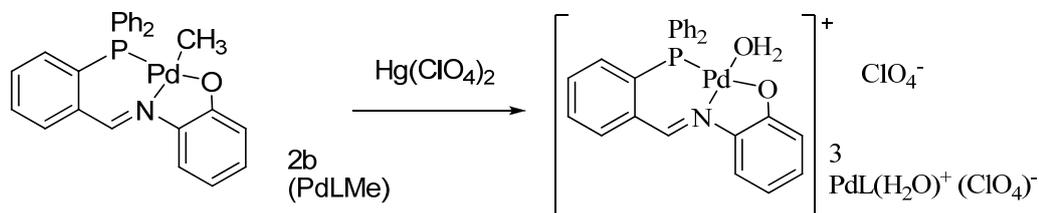
[Pd{2-[(2-diphenylphosphanylbenzylidene)(*o*-phenolate)amine]Me} (2b):



Complex **1b** (0.101 g, 1.88 mmol) was dissolved in dichlorometane (10 mL). A 0.29 M solution of NaMeO in MeOH (0.65 mL, 1.89 mmol) was added under stirring. Then the solvent was evaporated and the residue dissolved in dichlorometane and filtered through Kieselgur. The filtrate was concentrated under reduced pressure and precipitated with hexane. The precipitate was filtered under reduced pressure and washed with ether. A red solid (0.058 g, 1.16 mmol, 62%) was obtained. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 0.60 (d, 3H, $J_{\text{H-P}} = 2.7$ Hz, CH_3), 6.47 (ddd, 1H, $J_{\text{H-H}} = 1.4, 6.9$ Hz), 7.02 (dd, 1H, $J_{\text{H-H}} = 1.5, 8.4$ Hz), 7.12 (m, 1H), 7.43 (m, 9H), 7.55 (m, 4H), 7.61 (m, 1H), 7.66 (m, 1H), 8.63 (s, 1H, HCN); ^{31}P NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 41.35; IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 1099 (C-O), 1581 cm^{-1} (C=N); elemental analysis calcd (%) for $\text{C}_{25}\text{H}_{19}\text{ClNOPPd}$: C, 62.23; H, 4.42; N, 2.79; found: C, 62.09; H, 4.23; N, 2.72.



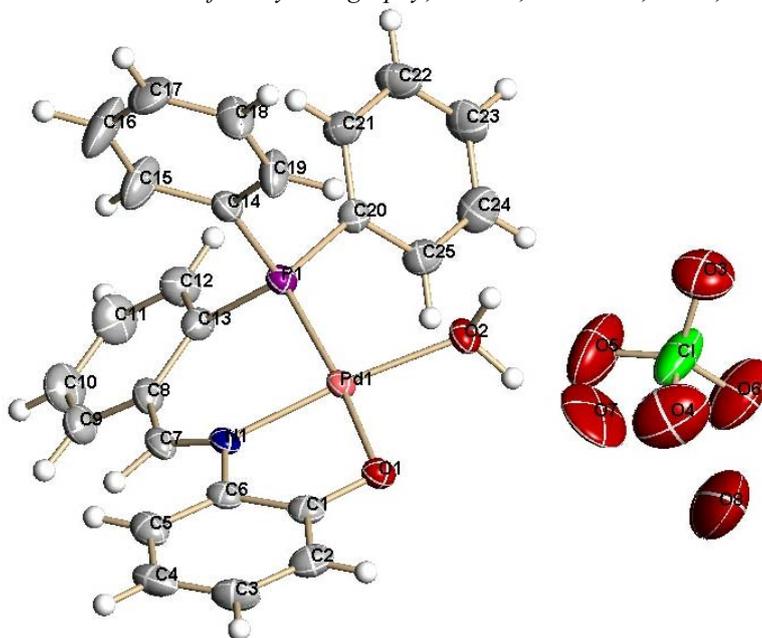
COSY of Pd{2-[(2-diphenylphosphanylbenzylidene)(*o*-phenolate)amine]Me



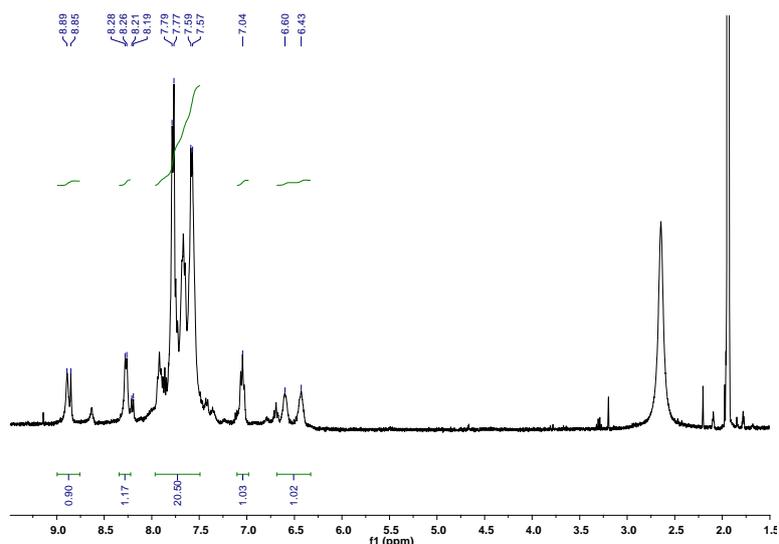
Complex **1b** (0.014 g, 0.028 mmol) was dissolved in MeOH (2 mL). A solution of Hg(ClO₄)₂ (0.013 g, 0.03 mmol) in MeOH (1 mL) was added dropwise and left for 12 days until red needles crystallized. Alternatively, complex **3** (0.015 g, 0.030 mmol) and Hg(ClO₄)₂ (0.016 g, 0.039 mmol) were dissolved in acetonitrile (3 mL) and left for 12 days until a purple solid was obtained. Single crystals, suitable for X-ray diffraction, were grown by slow diffusion in ether/methanol from a solution of the complex [3(H₂O)]ClO₄ in methanol. ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ = 8.89 (s, 1H), 8.22 (m, 1H), 7.94 (t, 1H, *J*_{H-H} = 5.3 Hz), 7.72 (m, 13H), 7.17 (t, 1H, *J*_{H-H} = 5.3 Hz), 6.82 (d, 1H, *J*_{H-H} = 6.5 Hz), 6.62 (t, 1H, *J*_{H-H} = 7.1 Hz); ¹H NMR (400 MHz, CD₃CN): δ = 8.89 (s, 1H), 8.27 (m, 1H), 7.95 (m, 1H), 7.70 (m, 13H), 7.05 (m, 1H), 6.60 (d, 1H, *J*_{H-H} = 4.2 Hz), 6.43 (d, 1H, *J*_{H-H} = 4.2 Hz); ³¹P NMR (400 MHz, CD₃OD): δ = 32.26; elemental analysis calcd (%) for C₂₅H₂₁ClNO₆PPd(2H₂O): C, 46.89; H, 3.94; N, 2.19; found: C, 46.68; H, 4.12; N, 2.06. Crystal data for [6(H₂O)]ClO₄, C₂₅H₂₁ClNO_{7.50}PPd, *M* = 628.25, monoclinic, C2/c, *a* = 18.345(2) Å, *b* = 22.576(3) Å, *c* = 14.7100(17) Å, α = 90°, β = 122.192(2)°, γ = 90°; *V* = 5155.7(11) Å³, *Z* = 8, *D*_{calc} = 1.619 g cm⁻³, μ(Mo-Kα) = 0.933 mm⁻¹. Purple prism, (0.30 x 0.20 x 0.20) mm³. 24303 measured reflections, 4531 independent (*R*_{int} = 0.0428), 3884 observed (*I* > 2σ(*I*)). *R*₁ = 0.0596, *wR*₂ = 0.1529 (all data). CCDC 675181. **X-Ray Diffraction Structure Report for [3(H₂O)]ClO₄ (CCDC 675181):** Crystallographic data are presented in Tables 1-5. A single crystal of [3(H₂O)]ClO₄ was mounted on a glass fibre. X-ray measurements were made using a Bruker SMART CCD area-detector diffractometer with Mo-Kα radiation (λ = 0.71073 Å).¹ Intensities were integrated² from several series of exposures, each exposure covering 0.3° in ω, and the total data set being

a sphere. Absorption corrections were applied, based on multiple and symmetry-equivalent measurements.³ The structure was solved by direct methods and refined by least squares on weighted F^2 values for all reflections (see Table 1).⁴ All non-hydrogen atoms were assigned anisotropic displacement parameters and refined without positional constraints. Hydrogen atoms **H(2A)** and **H(2B)** were located in the electron density difference map, assigned isotropic displacement parameters and refined with positional constraints. All other hydrogen atoms were constrained to ideal geometries and refined with fixed isotropic displacement parameters. Oxygen atoms **O7** and **O8** were refined without hydrogen atoms. Refinement proceeded smoothly to give the final residuals. Complex neutral-atom scattering factors were used.⁵

1. SMART diffractometer control software, Bruker Analytical X-ray Instruments Inc., Madison, WI, 2000.
2. SAINT integration software, Siemens Analytical X-ray Instruments Inc., Madison, WI, 2000.
3. G. M. Sheldrick. *SADABS: A program for absorption correction with the Siemens SMART system*; University of Göttingen: Germany, 2001.
4. *SHELXTL program system version 6.1*; Bruker Analytical X-ray Instruments Inc., Madison, WI, 1998.
5. *International Tables for Crystallography*, Kluwer, Dordrecht, 1992, vol. C.

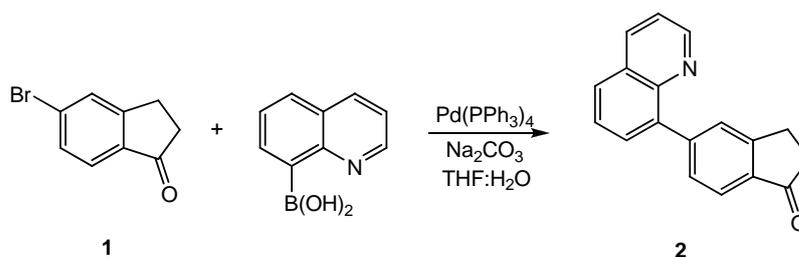


X-ray diff. [Pd{2-[(2-diphenylphosphanylbenzylidene)(*o*-phenolate)amine]H₂O} ClO₄



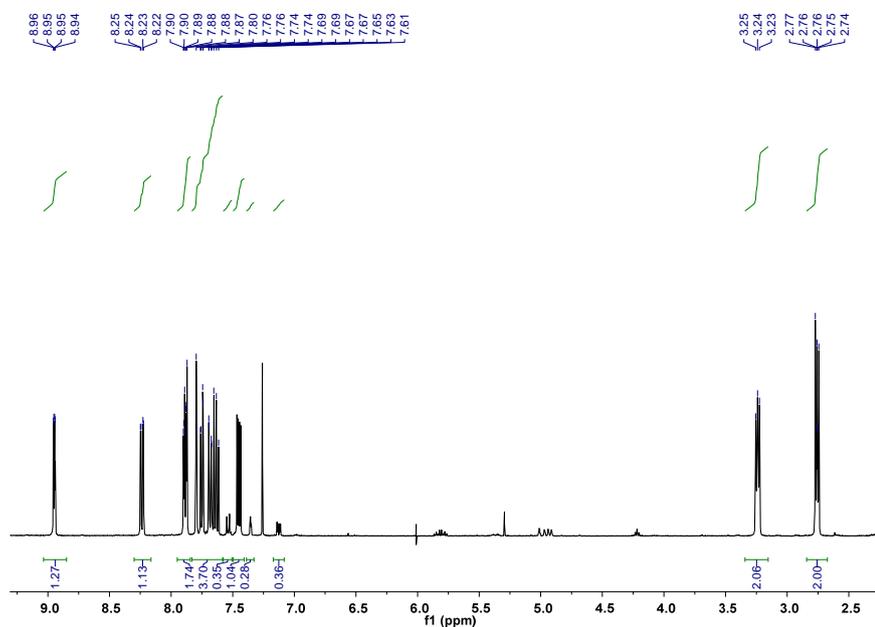
¹H NMR [Pd{2-[(2-diphenylphosphanylbenzylidene)(*o*-phenolate)amine}H₂O] ClO₄

Synthesis of 5-(8-quinolinyl)indan-1-one **2**

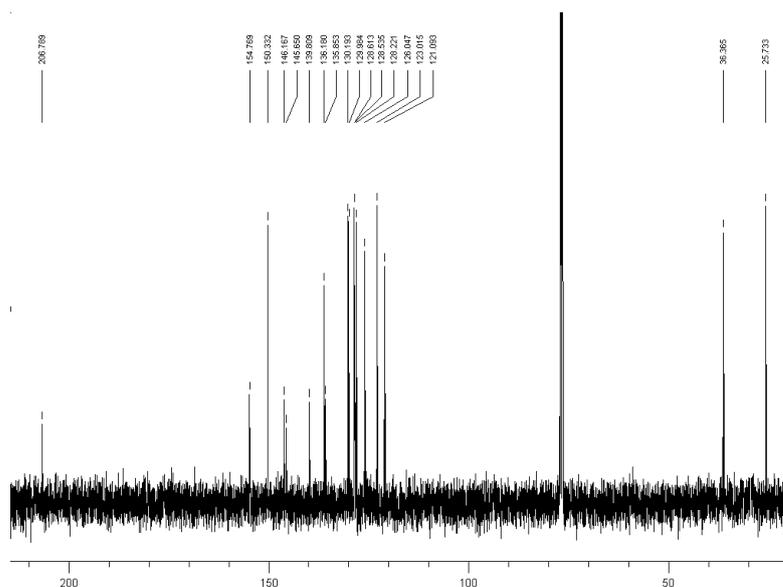


Pd(PPh₃)₄ (4 mg, 0.002 mmol) was added under nitrogen to a solution of 5-bromo-1-indanone **1** (180 mg, 0.866 mmol) in tetrahydrofuran (20 mL) and the mixture was stirred for 30 minutes at room temperature. Then solid 8-quinolinboronic acid (150 mg, 0.866 mmol) and sodium carbonate (460 mg, 4.335 mmol) dissolved in H₂O (5 mL) were added and the mixture was heated under reflux for 6 h. Then the solvent was evaporated under reduced pressure and the residue was added to water (20 mL) and extracted with CH₂Cl₂ (3 x 30 mL). The combined organic extracts were dried (Na₂SO₄) and evaporated and the residue was purified by flash chromatography (silica, 3 x 30 cm), from CH₂Cl₂ to CH₂Cl₂:AcOEt (10:1), to get 5-(8-quinolinyl)indan-1-one **2** as a light yellow solid (220 mg, 98 %), mp 148-150 °C. IR (KBr, cm⁻¹): 1702 (C=O), 1603, 1494, 1429, 1305, 1251,

1032, 827, 803, 789, 772. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 8.95 (dd, $J = 4.2$ Hz, $J = 1.6$ Hz, 1H), 8.23 (dd, $J = 8.2$ Hz, $J = 1.6$ Hz, 1H), 7.89 (dd, $J = 8.0$ Hz, $J = 1.6$ Hz, 1H), 7.88 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.80 (s, 1H), 7.75 (dd, $J = 7.0$ Hz, $J = 1.6$ Hz, 1H), 7.70-7.61 (m, 2H), 7.45 (dd, $J = 8.0$ Hz, $J = 4.0$ Hz, 1H), 3.24 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H, CH_2), 2.73 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H, CH_2). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 206.79 (CO), 154.77, 150.33, 146.16, 145.65, 139.80, 136.18, 135.85, 130.19, 129.98, 128.61, 128.53, 128.22, 126.04, 123.01, 121.09, 36.36 (CH_2), 25.73 (CH_2). EIMS m/z (%): 260 ($\text{M}^+ + 1$, 10), 259 (M^+ , 55), 258 ($\text{M}^+ - 1$, 100), 230 ($\text{M}^+ - \text{CO}$, 22), 203 (18), 149 (8), 97 (9), 87 (10), 71 (10), 57 (17). HRMS: Calculated for $\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{NO}$: 259.0997, found: 259.0987. Anal. Calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{NO}$: C: 83.38; H: 5.05; N: 5.40. Found: C: 83.24; H: 5.12; N: 5.29.

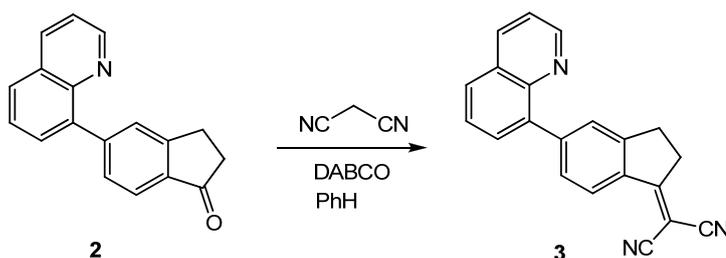


^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) of 5-(8-quinolinyl)indan-1-one



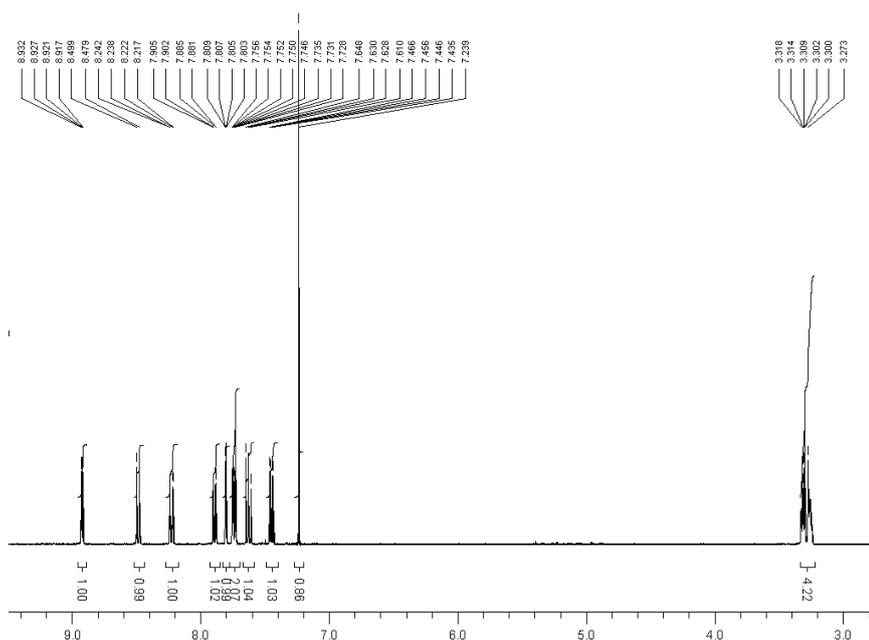
^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) of 5-(8-quinolinyl)indan-1-one

Synthesis of 1-dicyanomethylene-5-(quinolin-8-yl)indene **3**

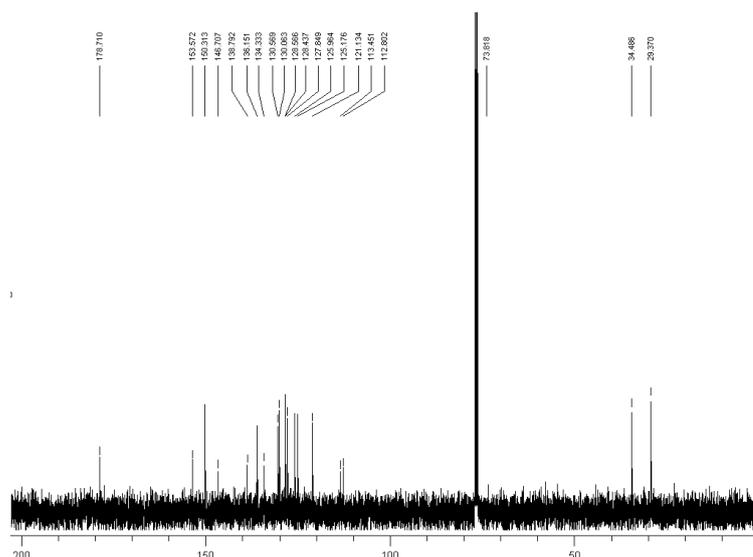


Malononitrile (183 mg, 2.8 mmol) and DABCO (109 mg, 1.0 mmol) were added under nitrogen to 5-(quinolin-8-yl)indan-1-one **2** (210 mg, 0.8 mmol) dissolved in benzene (10 mL). The mixture was heated under reflux for 5 h and then added to water (30 mL), stirred for 5 minutes and extracted with dichloromethane (5 x 20 mL). The combined organic extracts were dried (Na_2SO_4) and the solvent evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography (silica, 3 x 30 cm), from CH_2Cl_2 to CH_2Cl_2 :AcOEt (1:1), to get 1-dicyanomethylene-5-(quinolin-8-yl)indene **3** as a yellow solid (166 mg, 66%) fluorescent under the UV light $\lambda = 366$ nm, mp 178-179 °C. IR (KBr, cm^{-1}): 2355, 2335, 2222 (CN), 1562, 1336, 888, 820, 789, 752. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 8.92 (dd, $J = 4.2$ Hz, $J = 1.6$ Hz, 1H), 8.48 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 8.23

(dd, $J = 8.2$ Hz, $J = 1.6$ Hz, 1H), 7.89 (dd, $J = 8.2$ Hz, $J = 1.6$ Hz, 1H), 7.80 (m, 1H), 7.76-7.72 (m, 2H), 7.63 (dd, $J = 8.0$ Hz, $J = 7.2$ Hz, 1H), 7.45 (dd, $J = 8.0$ Hz, $J = 4.0$ Hz, 1H), 3.28 (m, 4H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 179.01, 153.87, 150.63, 147.77, 147.03, 139.12, 136.45, 134.66, 130.89, 130.37, 128.88, 128.17, 126.28, 125.49, 121.45, 116.03, 115.16 (CN), 113.46 (CN), 73.72, 34.81 (CH_2), 29.69 (CH_2). EIMS m/z (%): 308 ($\text{M}^+ + 1$, 10), 307 (M^+ , 55), 306 ($\text{M}^+ - 1$, 100), 281 (3), 279 (12), 242 (18), 197 (18), 172 (8), 144 (12), 120 (6), 57 (8). HRMS: Calculated for $\text{C}_{21}\text{H}_{13}\text{N}_3$: 307.1109, found: 307.1115. Anal. Calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{13}\text{N}_3$: C: 82.06; H: 4.26; N: 13.67; Found: C: 82.13; H: 4.18; N: 13.58.

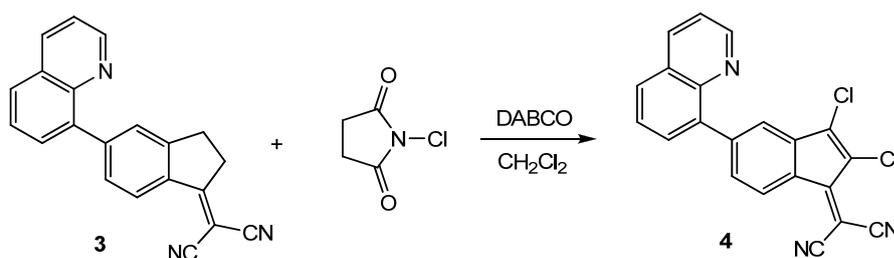


^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) of 1-dicyanomethylene-5-(quinolin-8-yl)indene



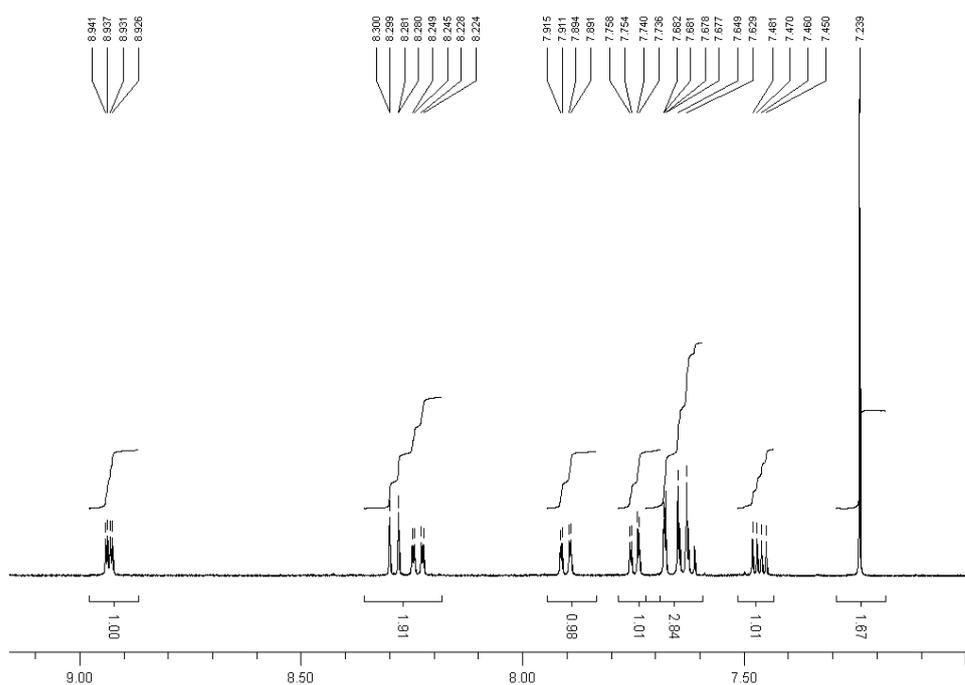
^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) of 1-dicyanomethylene-5-(quinolin-8-yl)indene

Synthesis of 2,3-dichloro-1-dicyanomethylene-5-(quinolin-8-yl)indene 4

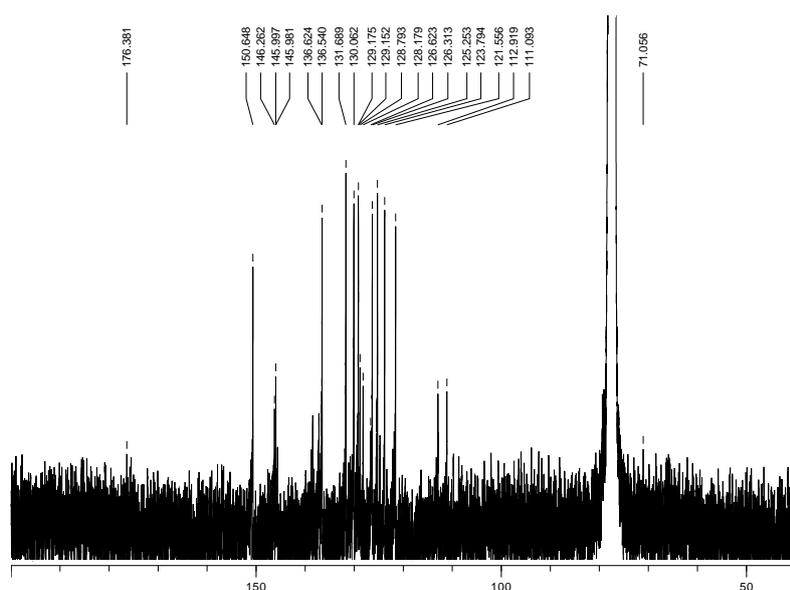


N-Chlorosuccinimide (134 mg, 2.9 mmol) and DABCO (112 mg, 1.5 mmol) in dichloromethane (5 mL) were added to a solution of 1-dicyanomethylene-5-(quinolin-8-yl)indene **3** (91 mg, 0.3 mmol) in dichloromethane (20 mL). The mixture was stirred for 30 minutes at room temperature, then added to water (30 mL) and extracted with dichloromethane (3 x 30 mL). The combined organic extracts were dried (Na_2SO_4) and the solvent evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography (silica, 3 x 30 cm) from CH_2Cl_2 :AcOEt (20:1) to CH_2Cl_2 :AcOEt (1:10), to get 2,3-dichloro-1-dicyanomethylene-5-(quinolin-8-yl)indene **4** as a reddish solid (77 mg, 70 %), mp >250 °C. IR (KBr, cm^{-1}): 2358, 2338, 2222 (CN), 1572, 1558, 1528, 1494, 1343, 1258, 1094, 1025, 820, 789, 752, 687, 663. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 8.93 (dd,

$J = 7.0$ Hz, $J = 1.6$ Hz, 1H), 8.29 (dd, $J = 7.6$ Hz, $J = 4.0$ Hz, 1H), 8.23 (dd, $J = 8.4$ Hz, $J = 1.6$ Hz, 1H), 7.90 (dd, $J = 8.4$ Hz, $J = 1.6$ Hz, 1H), 7.75 (dd, $J = 7.2$ Hz, $J = 1.6$ Hz, 1H), 7.75 (dd, $J = 1.6$ Hz, $J = 0.4$ Hz, 1H) 7.64 (m, 1H), 7.63 (m, 1H), 7.47 (dd, $J = 8.4$ Hz, $J = 4.4$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 176.38, 150.64, 146.26, 145.99, 145.98, 136.62, 136.54, 131.68, 130.06, 129.17, 128.15, 128.79, 128.17, 126.62, 126.31, 125.25, 123.79, 121.55, 112.91 (CN), 111.09 (CN), 71.05. EM (EI) m/z (%): 374 ($\text{M}^+ + 1$, 73), 373 (M^+ , 51), 372 ($\text{M}^+ - 1$, 100), 338 ($\text{M}^+ - \text{Cl}$, 40), 302 ($\text{M}^+ - 2\text{Cl}$, 22), 275 (8), 196 (11), 69 (12). HRMS: Calculated for $\text{C}_{21}\text{H}_9\text{Cl}_2\text{N}_3$: 373.0174, found: 373.0125. Anal. Calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_9\text{Cl}_2\text{N}_3$: C: 67.40; H: 2.42; N: 11.23. Found: C: 67.34; H: 2.49; N: 11.18.

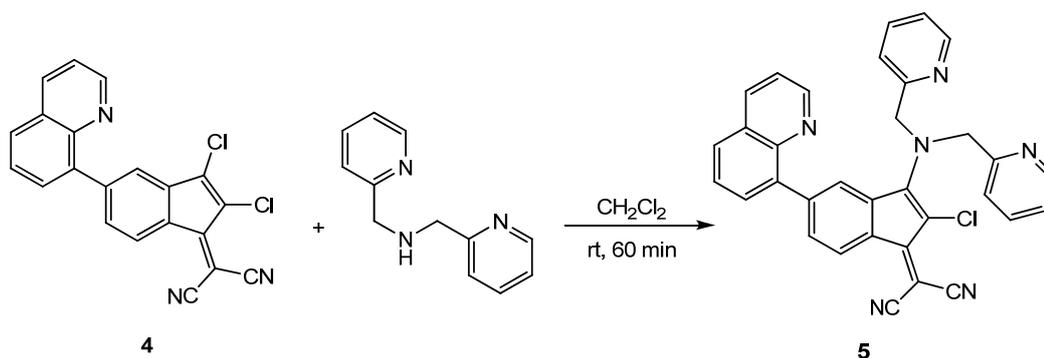


^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) of 2,3-dichloro-1-dicyanomethylene-5-(quinolin-8-yl)indene

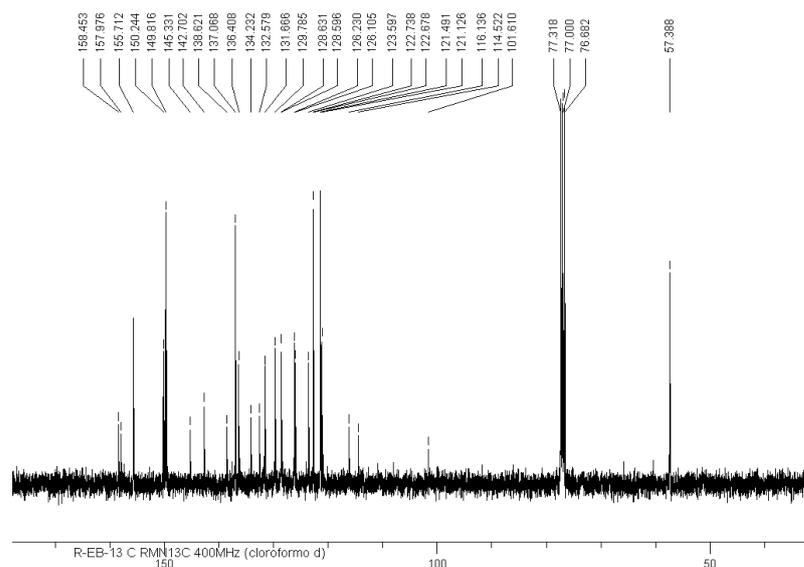


^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz): 2,3-dichloro-1-dicyanomethylene-5-(quinolin-8-yl)indene

Synthesis of 3-[di-(2-picolinyl)amino]-1-dicyanomethylene-2-chloro-5-(quinolin-8-yl)indene 5

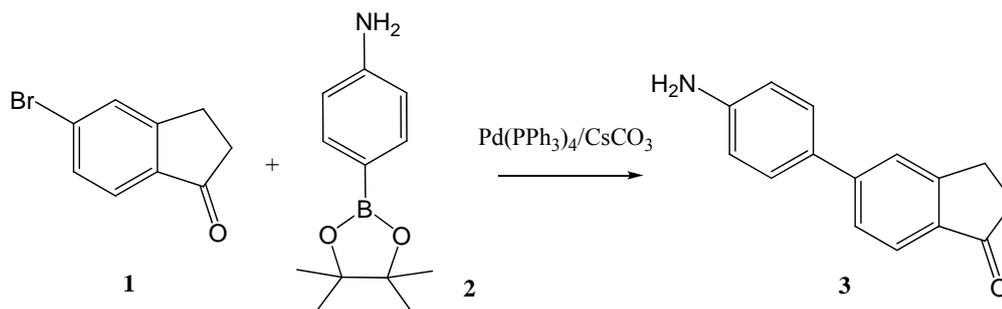


Di-(2-picolyl)amine (68 μL , $\rho=1.107$ g/mL, 0.4 mmol) was added to a solution of 2,3-dichloro-1-dicyanomethylene-5-(quinolin-8-yl)indene **4** (47 mg, 0.1 mmol) in CH_2Cl_2 (25 mL), the mixture was stirred at room temperature for 60 minutos and then added to water (50 mL) and extracted with CH_2Cl_2 (3 x 30 mL). The combined organic extracts were dried (Na_2SO_4) and the solvent evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography (silica, 3 x 30 cm) from CH_2Cl_2 :AcOEt (1:1) to CH_2Cl_2 :AcOEt (1:10), to get 3-[di-(2-picolinyl)amino]-1-dicyanomethylene-2-



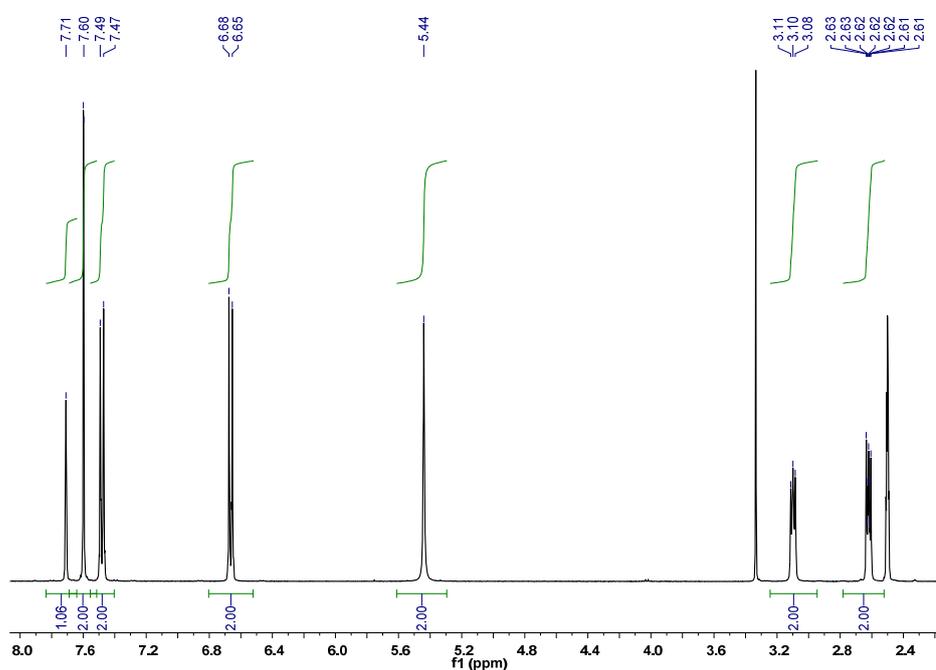
^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) of 3-[di-(2-picolinyl)amino]-1-dicyanomethylene-2-chloro-5-(quinolin-8-yl)indene

Synthesis of 5-(4-aminophenyl)indan-1-one

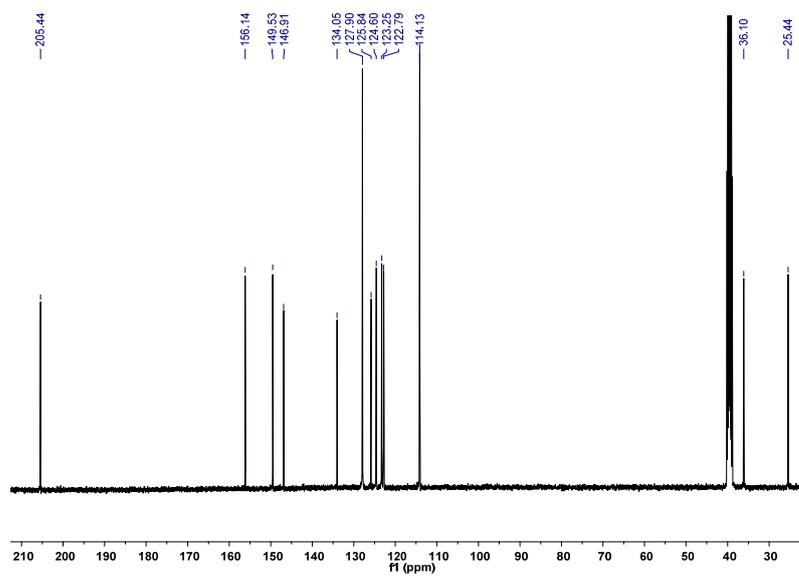


$\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ 54 mg (0.047 mmol) was added under nitrogen to a solution of 5-bromo-1-indanone **1** (100 mg 0.470 mmol) in toluene/butanol 4:1 mixture (15 mL) and the mixture was stirred for 30 minutes at room temperature. Then solid 4-aminobenzeneboronic pinacol ester **2** (103 mg, 0.470 mmol) and cesium carbonate (463 mg, 1.42 mmol) dissolved in H_2O (2 mL) were added and the mixture was heated under reflux for 16 h. Then the solvent was evaporated under reduced pressure and the residue was added to water (20 mL) and extracted with CH_2Cl_2 (3 x 30 mL). The combined organic extracts were dried (Na_2SO_4) and evaporated and the residue was purified by flash chromatography (silica, 3 x 30 cm), CH_2Cl_2 , to get 5-(4-aminophenyl)indan-1-one **3** as a

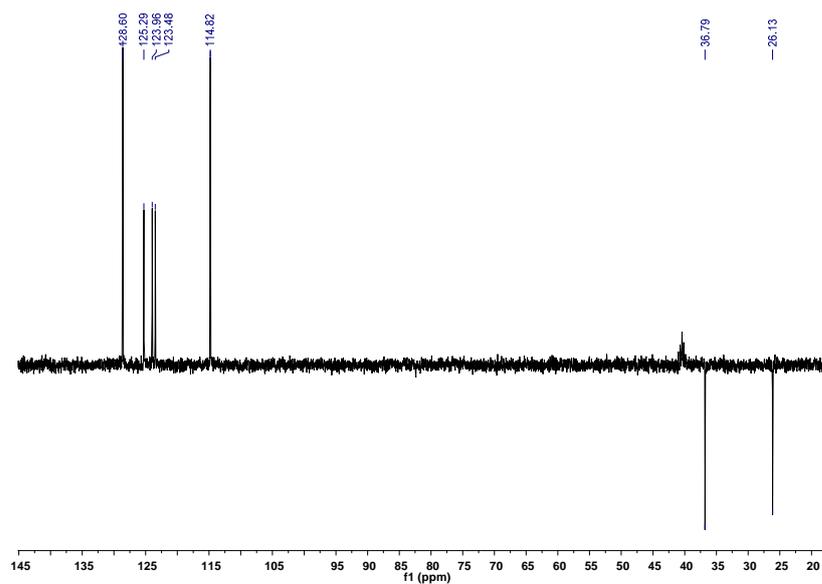
light yellow solid (95 mg, 91 %), mp 250-251 °C. IR (KBr, cm^{-1}): 3429 and 3335 (NH_2), 1678 and 1592 ($\text{C}=\text{O}$), 1297 and 1278, 811. ^1H NMR ($\text{DMSO-}d_6$, 400MHz) 7.71 (s, 1H, ArH), 7.60 (s, 2H, ArH), 7.48 (d, $J = 6$ Hz, 2H, ArH), 6.68 (d, $J = 6$ Hz, 2H, ArH), 5.44 (s, br, exch, 2H, NH_2), 3.10 (m, 2H, CH_2), 2.61 (m, 2H, CH_2). ^{13}C NMR ($\text{DMSO-}d_6$, 100MHz) δ : 205.44 ($\text{C}=\text{O}$), 156.14 (C-NH_2), 149.53, 146.91, 134.05, 127.90 (CH), 125.84, 124.60 (CH), 123.25 (CH), 122.79 (CH), 114.13 (CH), 36.10 (CH_2), 25.44 (CH_2). ME (EI) m/z (%): 224 (M^++1 , 17), 223 (M^+ , 100), 195 (18), 167 (8), 152 (9), 139 (4), 117 (7), 96 (3). HRMS (EI): calcd. for $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{NO}$: 223.0997 (M^+); found: 223.0997. Anal. Calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{NO}$: C, 80.69; H, 5.87; N, 6.27. Found: C: 80.44; H: 5.95; N: 6.11.



^1H -NMR spectrum ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz) of 5-(4-aminophenyl)indan-1-one

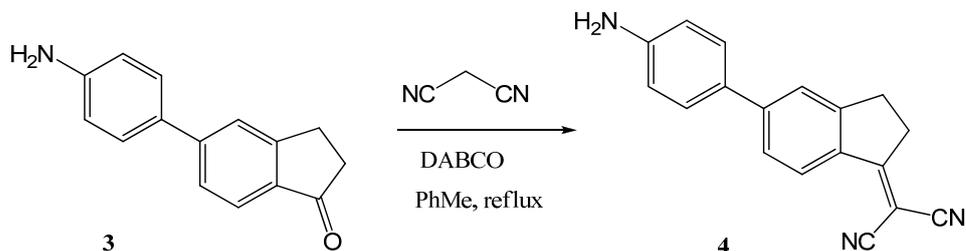


^{13}C -NMR spectrum (DMSO- d_6 , 100 MHz) of 5-(4-aminophenyl)indan-1-one

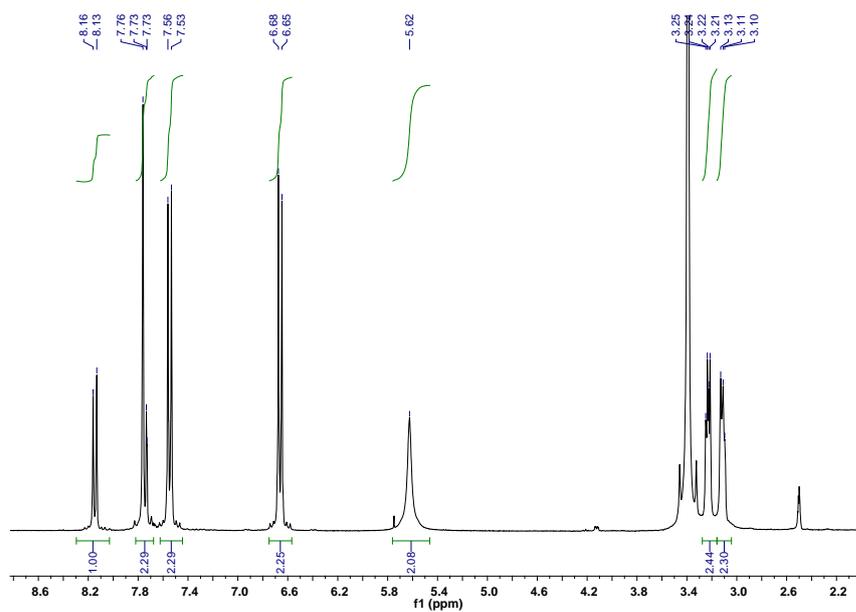


DEPT-NMR spectrum (DMSO- d_6 , 100 MHz) of 5-(4-aminophenyl)indan-1-one

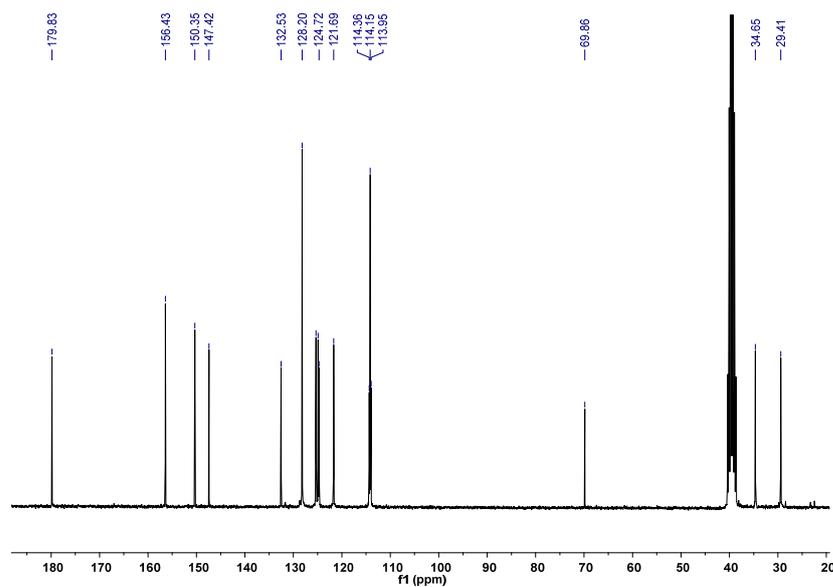
Synthesis of 1-dicyanomethylene-5-(4-aminophenyl)indane **4**



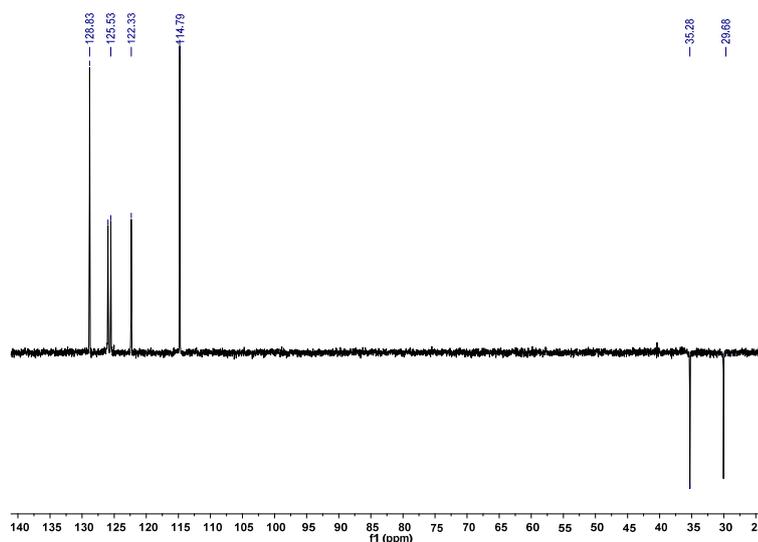
Malononitrile (50 mg 0.76 mmol) and DABCO (30 mg, 0.23 mmol) were added under nitrogen to 5-(4-aminophenyl)indan-1-one **3** (50 mg, 0.23 mmol) dissolved in toluene (10 mL). The mixture was heated under reflux for 2 h and then added to water (30 mL), stirred for 5 minutes and extracted with dichloromethane (5 x 20 mL). The combined organic extracts were dried (Na₂SO₄) and the solvent evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography (silica, 3 x 30 cm), CH₂Cl₂, to get 1-dicyanomethylene-5-(4-aminophenyl)indane **4** as an orange solid (59 mg, 95 %), mp 320-322 °C (decomp). IR (KBr, cm⁻¹): 3491 and 3382 (NH₂), 2221 (CN), 1627, 1600 and 1561 (C=C). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): 8.14 (d, *J* = 9 Hz, 1H, ArH), 7.75 (m, 2H, ArH), 7.54 (d, *J* = 9 Hz, 2H, ArH), 6.66 (d, *J* = 9 Hz, 2H, ArH), 5.62 (s, br, exch, 2H, NH₂), 3.23 (m, 2H, CH₂), 3.23 (m, 2H, CH₂). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz): 179.83, 156.43, 150.35, 147.42, 132.53, 128.20 (CH), 125.34 (CH), 124.90 (CH), 124.72, 121.69 (CH), 114.36 (CN), 114.15 (CH), 113.95 (CN), 69.96 (C(CN)₂), 34.66 (CH₂), 29.41 (CH₂). ME (EI) *m/z* (%): 272 (M⁺+1, 20), 271 (M⁺, 100), 243 (3), 214 (2), 206 (1), 204 (2), 189 (2), 135 (2). HRMS (EI): calcd. for C₁₈H₁₃N₃: 271.1109 (M⁺); found: 271.1108. Anal. Calcd for C₁₈H₁₃N₃: C, 79.68; H, 4.83; N, 15.49. Found: C: 79.77; H: 4.97; N: 15.35.



¹H NMR spectrum (DMSO-*d*₆, 300 MHz) of 1-dicyanomethylene-5-(4-aminophenyl)indane

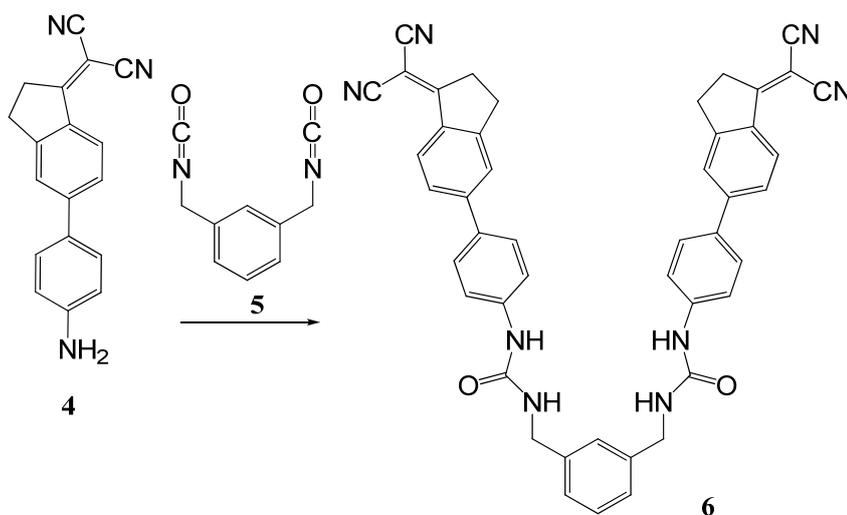


¹³C NMR spectrum (DMSO-*d*₆, 75 MHz) of 1-dicyanomethylene-5-(4-aminophenyl)indane



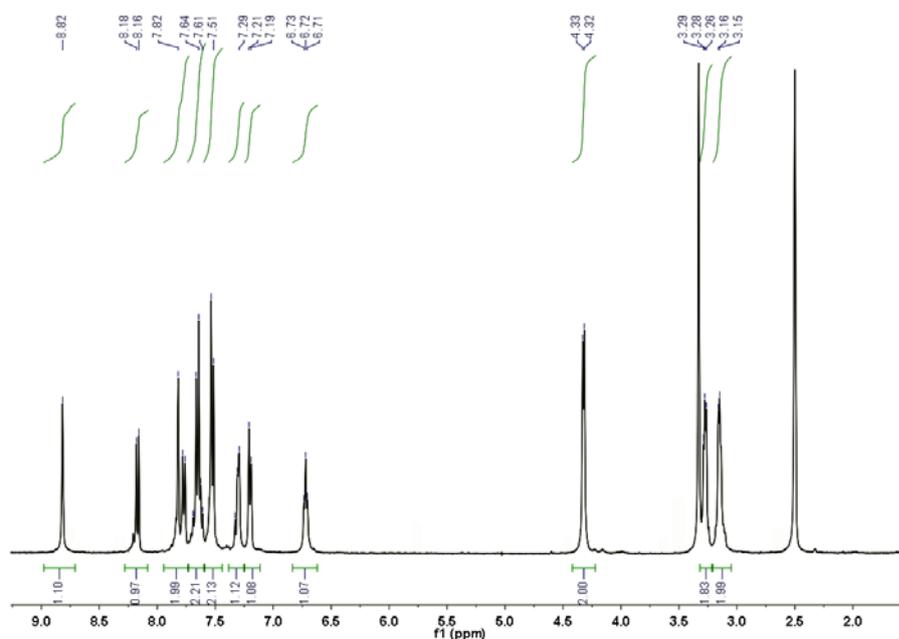
DEPT-NMR spectrum (DMSO- d_6 , 75 MHz) of 1-dicyanomethylene-5-(4-aminophenyl)indane

Synthesis of 1,3-bis[4-(1-dicyanomethyleneindan-5-yl)phenylureidomethyl]benzene **6**

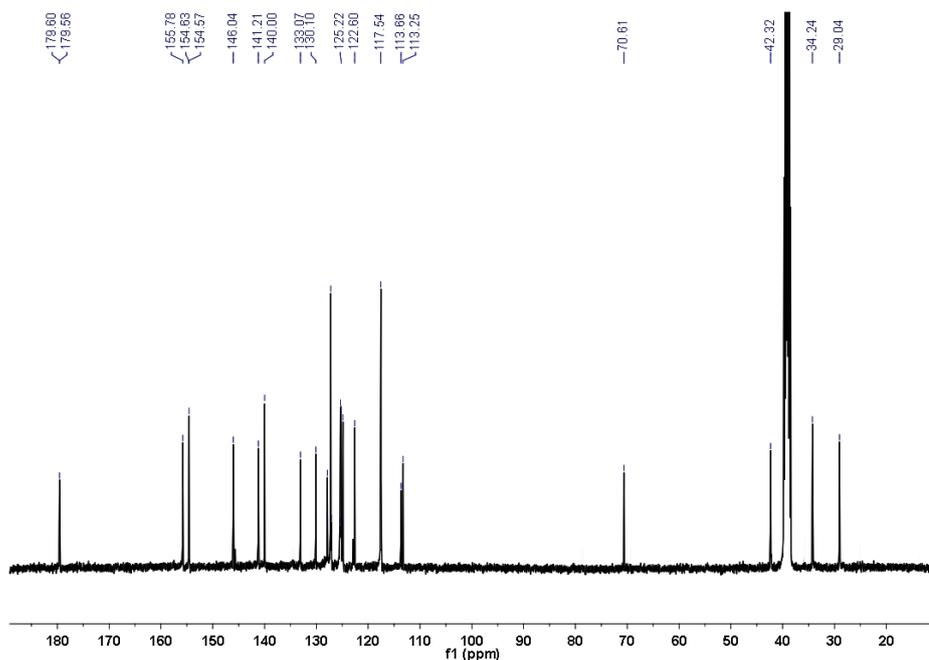


1-Dicyanomethylene-5-(4-aminophenyl)indane **4** (100 mg, 0.38 mmol) was added to *m*-xylylene diisocyanate **5** (15 μ L, 0.095 mmol) dissolved in CHCl_3 (20 mL) and the mixture was stirred at room temperature for 24 h. Then a second portion of *m*-xylylene diisocyanate (15 μ L, 0.095 mmol) was added and the mixture was stirred for additional 24 h. The solid formed after this time was filtered off, washed with CHCl_3 (2 portions of 2

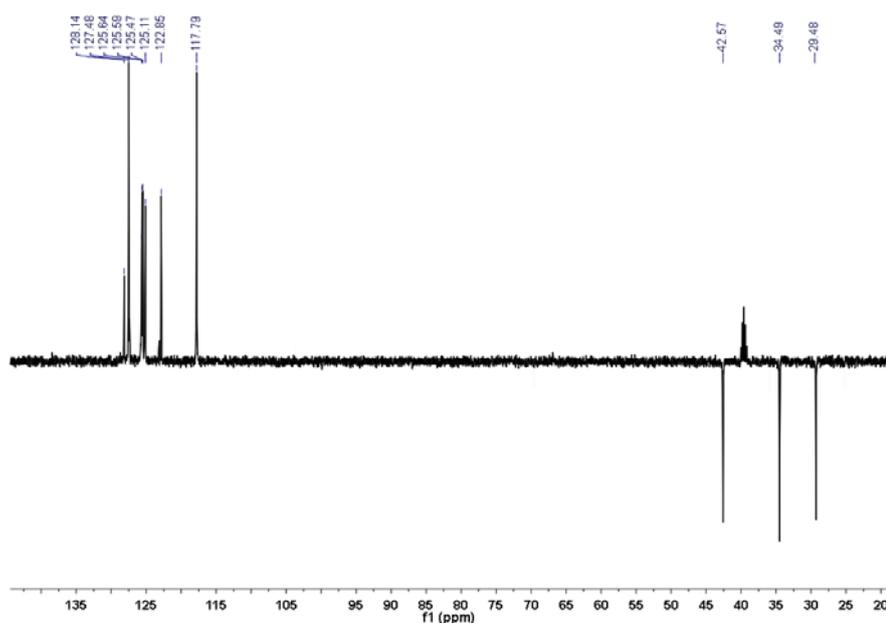
mL) and dried under reduced pressure. Compound **6** was obtained as a yellow solid (104 mg, 75%), mp 212-214°C. IR (KBr, cm^{-1}): 3328 (br, NH), 2221 ($\text{C}\equiv\text{N}$), 1658, 1604 and 1557 ($\text{C}=\text{O}$), 1320, 1219, 1184. ^1H NMR ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz): 8.82 (s, 2H, NH) 8.17 (d, $J = 6$ Hz, 2H, ArH), 7.82 (s, 2H, ArH), 7.79 (d, $J = 6$ Hz, 2H, ArH), 7.65 (d, $J = 6$ Hz, 4H, ArH), 7.52 (d, $J = 6$ Hz, 4H, ArH), 7.29 (m, 2H, ArH), 7.20 (m, 2H, ArH), 6.71 (t, $J = 6$ Hz, 2H, NH), 4.32 (d, $J = 6$ Hz, 4H, CH_2), 3.28 (m, 4H, CH_2), 3.15 (m, 4H, CH_2). ^{13}C NMR ($\text{DMSO-}d_6$, 100 MHz): 179.60, 155.78, 154.63, 146.04, 141.21, 140.00, 133.07, 130.10, 128.22 (CH), 127.58 (CH), 125.72, 125.67 (CH), 125.55 (CH), 125.22 (CH), 122.60 (CH), 117.54 (CH), 113.66 (CN), 113.25 (CN), 70.61, 42.32 (CH_2), 34.24 (CH_2), 29.04 (CH_2). MS (FAB) m/z (+): 731.40 ($\text{M}^+ + 1$). ESI MS m/z (%): 753.28 ($\text{M} + \text{Na}^+$), 731.29 ($\text{M}^+ + 1$). Anal. Calcd for $\text{C}_{46}\text{H}_{34}\text{N}_8\text{O}_2$: C, 75.60; H, 4.69; N, 15.33. Found: C, 75.42; H, 4.84; N, 15.09.



^1H NMR spectrum ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz) of 1,3-bis[4-(1-dicyanomethyleneindan-5-yl)phenylureidomethyl]benzene

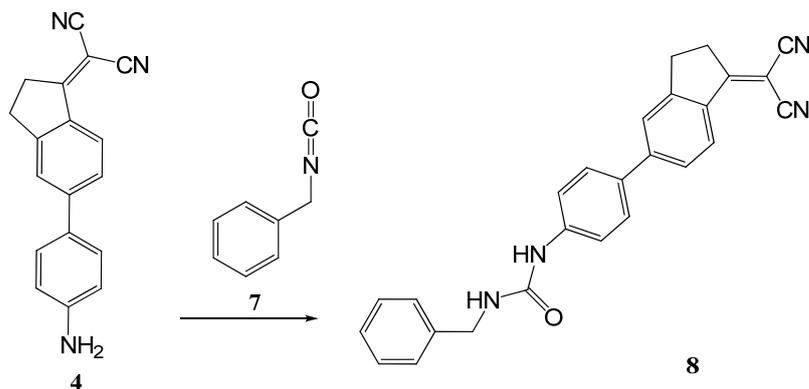


^{13}C NMR spectrum (DMSO- d_6 , 100 MHz) of 1,3-bis[4-(1-dicyanomethyleneindan-5-yl)phenylureidomethyl]benzene

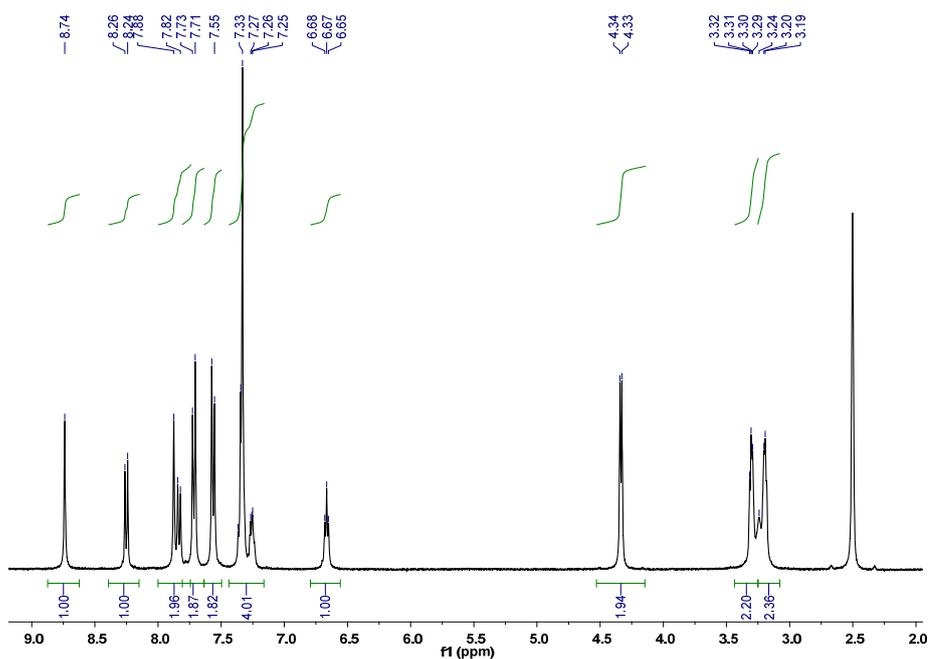


DEPT-NMR spectrum (DMSO- d_6 , 100 MHz) of 1,3-bis[4-(1-dicyanomethyleneindan-5-yl)phenylureidomethyl]benzene

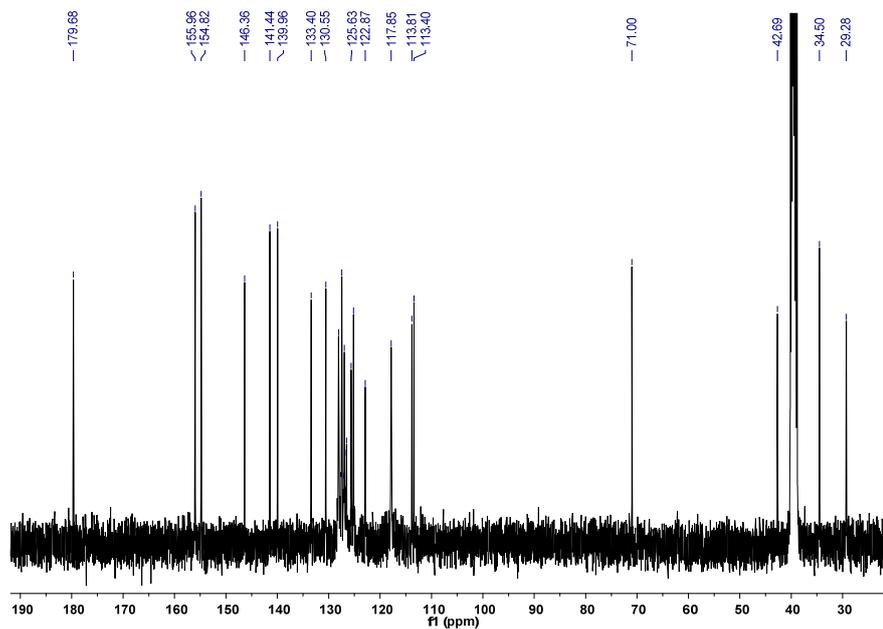
Synthesis of 1-benzyl-3-[4-(1-(dicyanomethyleneindan-5-yl)phenyl)urea] 8:



1-Dicyanomethylene-5-(4-aminophenyl)indane **4** (50 mg, 0.18 mmol) was added to benzyl isocyanate **7** (25 mg, 0.18 mmol) dissolved in CHCl_3 (10 mL) and the mixture was stirred at room temperature for 48 h. Hexane (2 mL) was then added and the solid formed was filtered off, washed with CHCl_3 (2 portions of 2 mL) and dried. Compound **8** was obtained as a yellow solid (56 mg, 75%), mp 189-190 °C. IR (KBr, cm^{-1}) 3336 (br, NH), 2221 ($\text{C}\equiv\text{N}$), 1639 and 1565 ($\text{C}=\text{O}$), 1328, 1227. ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz): 8.74 (s, 1H, NH) 8.25 (d, $J = 8$ Hz, 1H, ArH), 7.87 (s, 1H, ArH), 7.83 (d, $J = 8$ Hz, 1H, ArH), 7.71 (d, $J = 8$ Hz, 2H, ArH), 7.56 (d, $J = 8$ Hz, 2H, ArH), 7.34-7.32 (m, 4H, ArH), 7.25 (m, 1H, ArH), 6.66 (t, $J = 6$ Hz, 1H, NH), 4.33 (d, $J = 6$ Hz, 2H, CH_2), 3.30 (m, 2H, CH_2), 3.19 (m, 2H, CH_2). ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 100 MHz): 179.68, 155.96, 154.82, 146.36, 141.44, 139.96, 133.40, 130.55, 128.08, 127.44, 126.96, 126.57, 125.63, 125.17, 122.87 (CH_{Ar}), 117.85, 113.81 (CN), 113.40 (CN), 71.00, 42.69 (CH_2), 34.50 (CH_2), 29.28 (CH_2). MS (FAB) m/z (+): 405.06 (M^++1). MS (EI) m/z (%): 404 (M^+ , 10), 297 (95), 271 (100). HRMS (EI): calcd. for $\text{C}_{26}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}$: 404.1637 (M^+); found: 404.1633. Anal. Calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}$: C, 77.21; H, 4.98; N, 13.85. Found: C, 77.06; H, 5.12; N, 13.67.

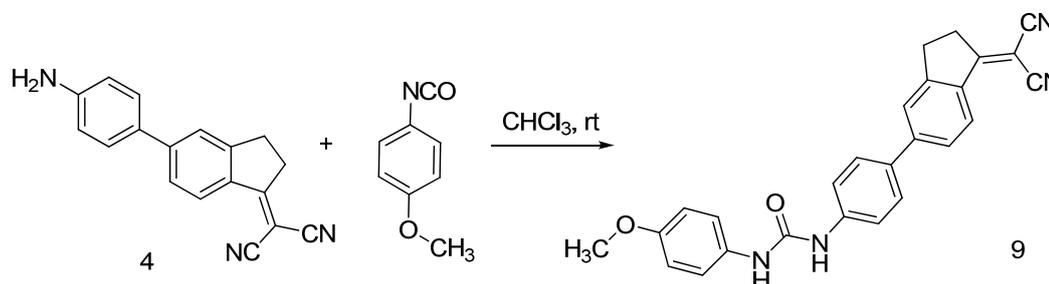


^1H NMR spectrum (DMSO- d_6 , 400 MHz) of 1-benzyl-3-[4-(1-(dicyanomethyleneindan-5-yl)phenyl]urea

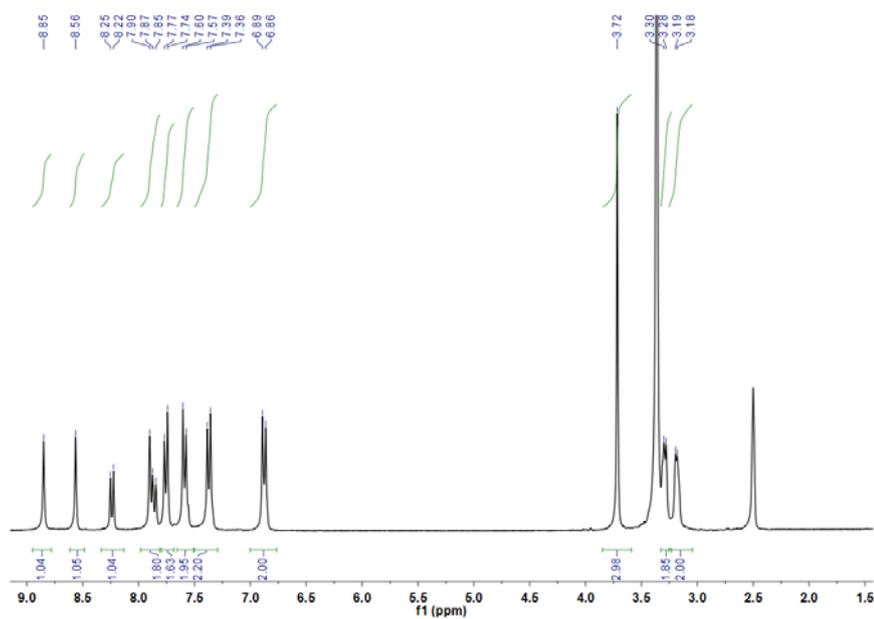


^{13}C NMR spectrum (DMSO- d_6 , 100 MHz) of 1-benzyl-3-[4-(1-(dicyanomethyleneindan-5-yl)phenyl]urea

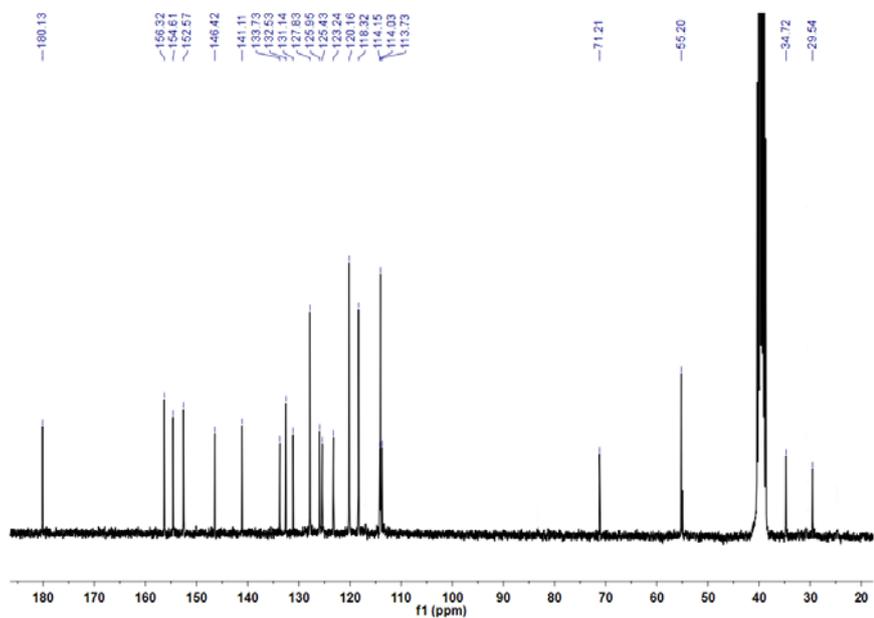
Synthesis of 1-(4-methoxyphenyl)-3-[4-(1-(dicyanomethyleneindan-5-yl)-phenyl]urea **9**



1-Dicyanomethylene-5-(4-aminophenyl)indane **4** (150 mg, 0.55 mmol) was added to *p*-methoxyphenyl isocyanate (82 mg, 0.55 mmol) dissolved in CHCl_3 (10 mL) and the mixture was stirred at room temperature for 48 h. Cyclohexane (3 mL) was then added and the solid formed was filtered off, washed with CHCl_3 (2 portions of 2 mL) and dried. Compound **9** was obtained as a dark yellow solid (172 mg, 74%), mp 232-233 °C. IR (KBr, cm^{-1}) 3320 (br, NH), 2221 ($\text{C}\equiv\text{N}$), 1658, 1596 and 1557 ($\text{C}=\text{O}$), 1510, 1239, 1184, 1029, 823. ^1H NMR ($\text{DMSO-}d_6$, 300 MHz): 8.85 (s, 1H, NH), 8.56 (s, 1H, NH), 8.23 (d, $J = 9$ Hz, 1H, ArH), 7.90 (s, 1H, ArH), 7.86 (d, $J = 9$ Hz, 1H, ArH), 7.76 (d, $J = 9$ Hz, 2H, ArH), 7.58 (d, $J = 9$ Hz, 2H, ArH), 7.37 (d, $J = 9$ Hz, 2H, ArH), 6.87 (d, $J = 9$ Hz, 2H, ArH), 3.82 (s, 3H, CH_3), 3.28 (m, 2H, CH_2), 3.18 (m, 2H, CH_2). ^{13}C NMR ($\text{DMSO-}d_6$, 75 MHz) 180.04, 156.22, 154.52, 152.47, 146.33, 141.02, 133.63, 132.44, 131.05, 127.74 (CH), 125.86 (CH), 125.34 (CH), 123.15 (CH), 120.07 (CH), 118.23 (CH), 114.06 (CN), 113.94 (CH), 113.63 (CN), 71.12, 55.13 (OCH_3), 34.63 (CH_2), 29.45 (CH_2). MS (EI) m/z (%): 421 ($\text{M} + 1$, 3), 420 (M^+ , 11), 297 (100), 271 (87), 149 (17), 123 (31). HRMS (EI): calcd. for $\text{C}_{26}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_2$: 420.1586 (M^+); found: 420.1582. Anal. Calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_2$: C, 74.27; H, 4.79; N, 13.33. Found: C, 74.46; H, 4.92; N, 13.14.

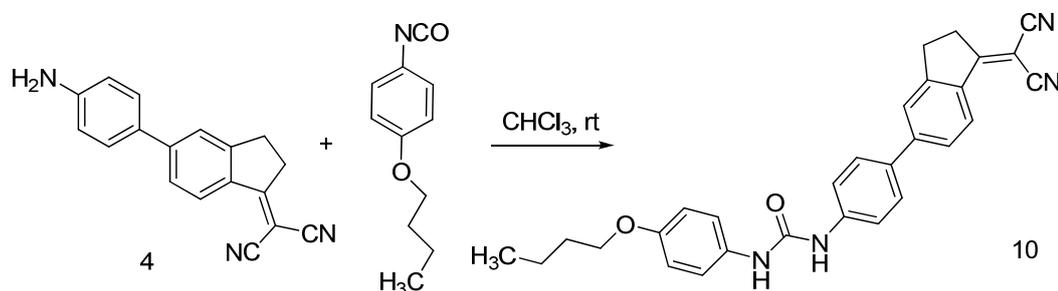


¹H NMR spectrum (DMSO-*d*₆, 300 MHz) of 1-(4-methoxyphenyl)-3-[4-(1-(dicyanomethylene)indan-5-yl)phenyl]urea

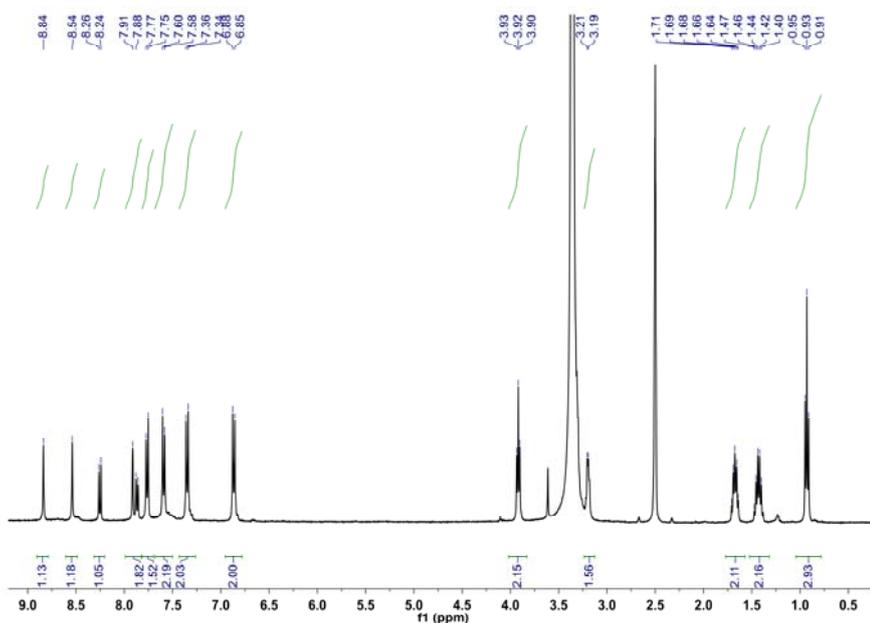


¹³C NMR spectrum (DMSO-*d*₆, 75 MHz) of 1-(4-methoxyphenyl)-3-[4-(1-(dicyanomethylene)indan-5-yl)phenyl]urea

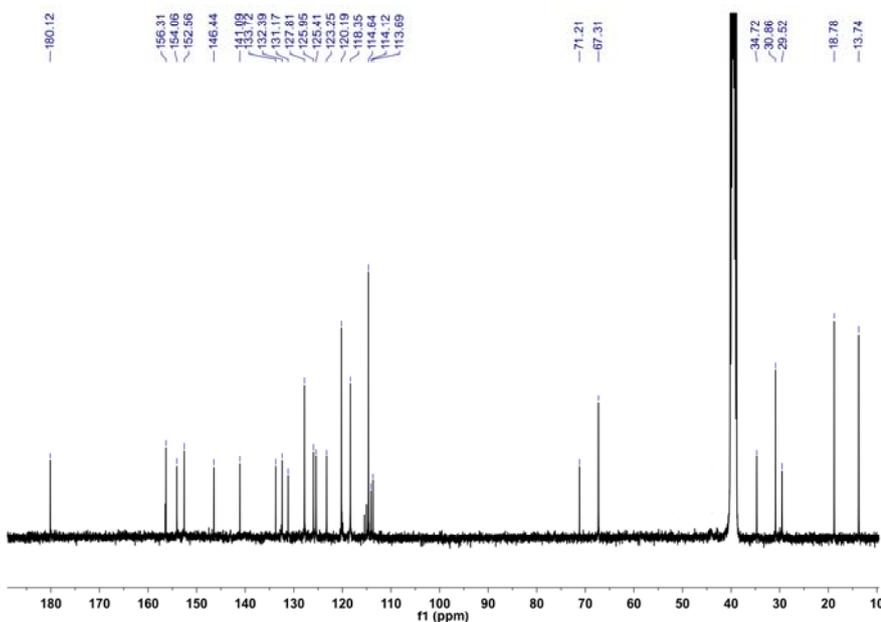
Synthesis of 1-(4-butoxyphenyl)-3-[4-(1-(dicyanomethylene)indan-5-yl)-phenyl]urea **10**



1-Dicyanomethylene-5-(4-aminophenyl)indane **4** (150 mg, 0.55 mmol) was added to *p*-butoxyphenyl isocyanate (105 mg, 0.55 mmol) dissolved in CHCl₃ (10 mL) and the mixture was stirred at room temperature for 48 h. Cyclohexane (3 mL) was then added and the solid formed was filtered off, washed with CHCl₃ (2 portions of 2 mL) and dried. Compound **10** was obtained as a dark yellow solid (145 mg, 57%), mp 184-186 °C. IR (KBr, cm⁻¹): 3297 (br, NH), 2959, 2924, 2854, 2225 and 2194 (C≡N), 1638, 1600 and 1557 (C=O), 1507, 1234, 823. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): 8.84 (s, 1H, NH), 8.54 (s, 1H, NH), 8.25 (d, *J* = 8 Hz, 1H, ArH), 7.90 (s, 1H, ArH), 7.86 (d, *J* = 8 Hz, 1H, ArH), 7.76 (d, *J* = 8 Hz, 2H, ArH), 7.59 (d, *J* = 8 Hz, 2H, ArH), 7.34 (d, *J* = 8 Hz, 2H, ArH), 6.86 (d, *J* = 8 Hz, 2H, ArH), 3.90 (t, *J* = 4H, CH₂), 3.28 (m, 2H, CH₂), 3.18 (m, 2H, CH₂), 1.67 (m, 2H, CH₂), 1.43 (m, 2H, CH₂), 0.92 (t, *J* = 4, 3H, CH₃). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz): 180.03, 156.21, 153.97, 152.47, 146.35, 141.00, 133.63, 132.30, 131.12, 127.71 (CH), 125.86 (CH), 125.32 (CH), 123.16 (CH), 120.10 (CH), 118.26 (CH), 114.54 (CH), 114.03 (CN), 113.60 (CN), 71.12, 67.22 (CH₂O), 34.63 (CH₂), 30.67 (CH₂), 29.43 (CH₂), 18.69 (CH₂), 13.65 (CH₃). MS (ESI) *m/z* (%): 463 (M + 1, 12)

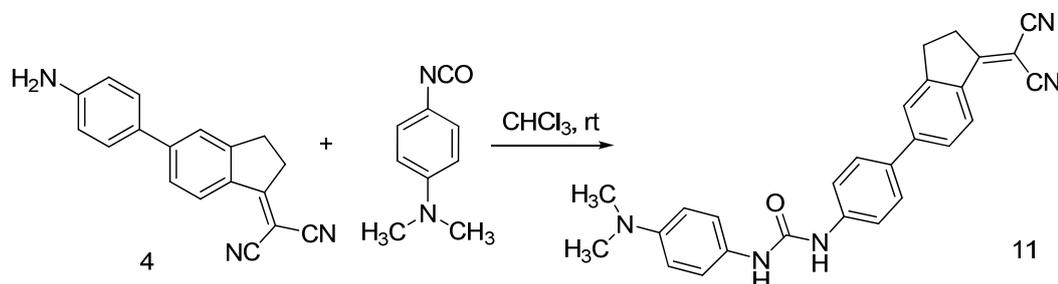


^1H NMR spectrum (DMSO- d_6 , 400 MHz) of 1-(4-butoxyphenyl)-3-[4-(1-(dicyanomethylene-indan-5-yl)phenyl)]urea

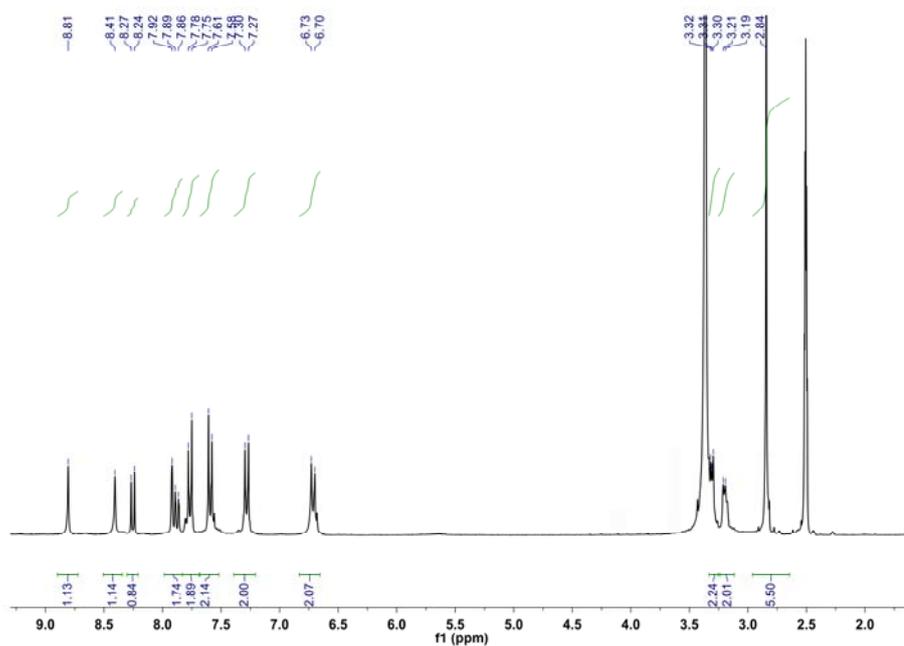


^{13}C NMR spectrum (DMSO- d_6 , 100 MHz) of 1-(4-butoxyphenyl)-3-[4-(1-(dicyanomethylene-indan-5-yl)phenyl)]urea

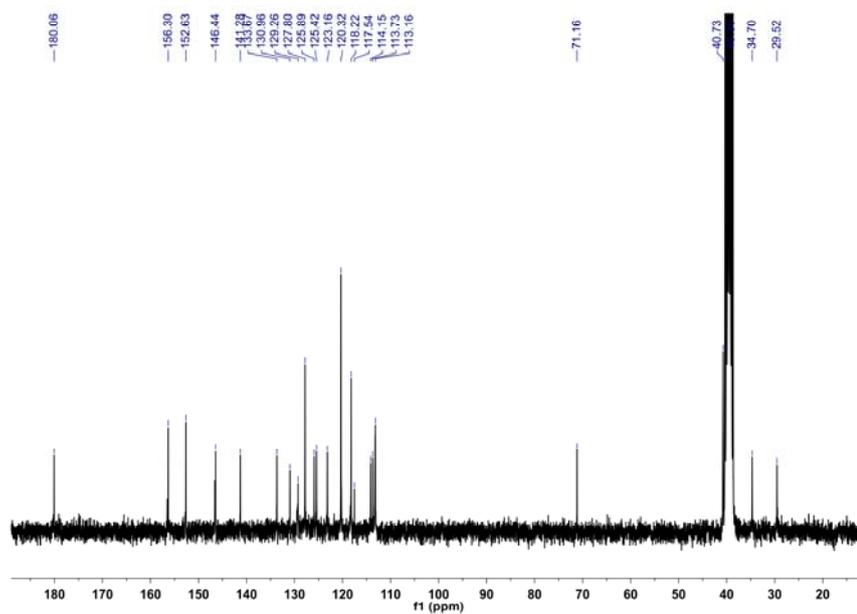
Synthesis of 1-[4-(*N,N*-dimethylamino)phenyl]-3-[4-(1-(dicyanomethylene)indan-5-yl)phenyl]urea **11**



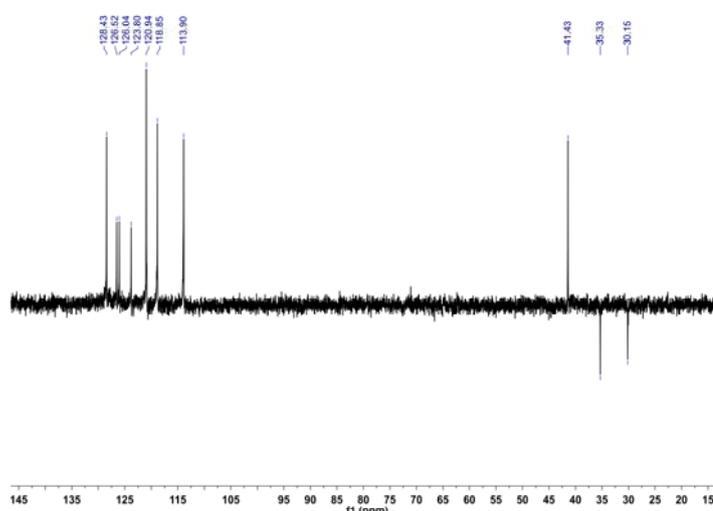
1-Dicyanomethylene-5-(4-aminophenyl)indane **4** (150 mg, 0.55 mmol) was added to *p*-*N,N*-dimethylaminophenyl isocyanate (89 mg, 0.55 mmol) dissolved in CHCl₃ (10 mL) and the mixture was stirred at room temperature for 48 h. Cyclohexane (3 mL) was then added and the solid formed was filtered off, washed with CHCl₃ (2 portions of 2 mL) and dried. Compound **11** was obtained as a dark yellow solid (160 mg, 67%), mp 178-179 °C. IR (KBr, cm⁻¹): 3320 (br, NH), 2221 and 2194 (C≡N), 1654, 1596, 1565 and 1518 (C=O), 1320, 1242, 1185, 823. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): 8.81 (s, 1H, NH), 8.41 (s, 1H, NH), 8.25 (d, *J* = 9 Hz, 1H, ArH), 7.92 (s, 1H, ArH), 7.88 (d, *J* = 9 Hz, 1H, ArH), 7.76 (d, *J* = 9 Hz, 2H, ArH), 7.60 (d, *J* = 9 Hz, 2H, ArH), 7.29 (d, *J* = 9 Hz, 2H, ArH), 6.72 (d, *J* = 9 Hz, 2H, ArH), 3.30 (m, 2H, CH₂), 3.20 (m, 2H, CH₂), 2.84 (s, 6H, 2×CH₃). ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz): 180.06, 156.49, 152.63, 146.60, 141.28, 133.67, 130.96, 129.26, 127.80 (CH), 125.89 (CH), 125.42 (CH), 123.16 (CH), 120.32 (CH), 118.22 (CH), 117.54, 114.15 (CN), 113.73 (CN), 113.16 (CH), 71.07, 40.64 (N[CH₃]₂), 34.61 (CH₂), 29.43 (CH₂). MS (EI) *m/z* (%): 433 (M⁺, 5), 297 (100), 271 (92), 162 (35), 136 (37). HRMS (EI): calcd. for C₂₇H₂₃N₅O: 433.1903 (M⁺); found: 433.1907. Anal. Calcd for C₂₇H₂₃N₅O: C, 74.81; H, 5.35; N, 16.16. Found: C, 74.68; H, 5.22; N, 15.93.



^1H NMR spectrum (DMSO- d_6 , 300 MHz) of 1-[4-(*N,N*-dimethylamino)phenyl]-3-[4-(1-(dicyanomethyleneindan-5-yl)phenyl)urea]

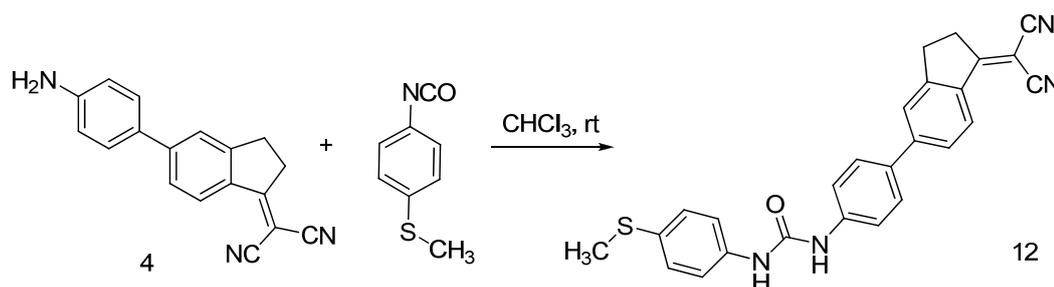


^{13}C NMR spectrum (DMSO- d_6 , 75 MHz) of 1-[4-(*N,N*-dimethylamino)phenyl]-3-[4-(1-(dicyanomethyleneindan-5-yl)phenyl)urea]



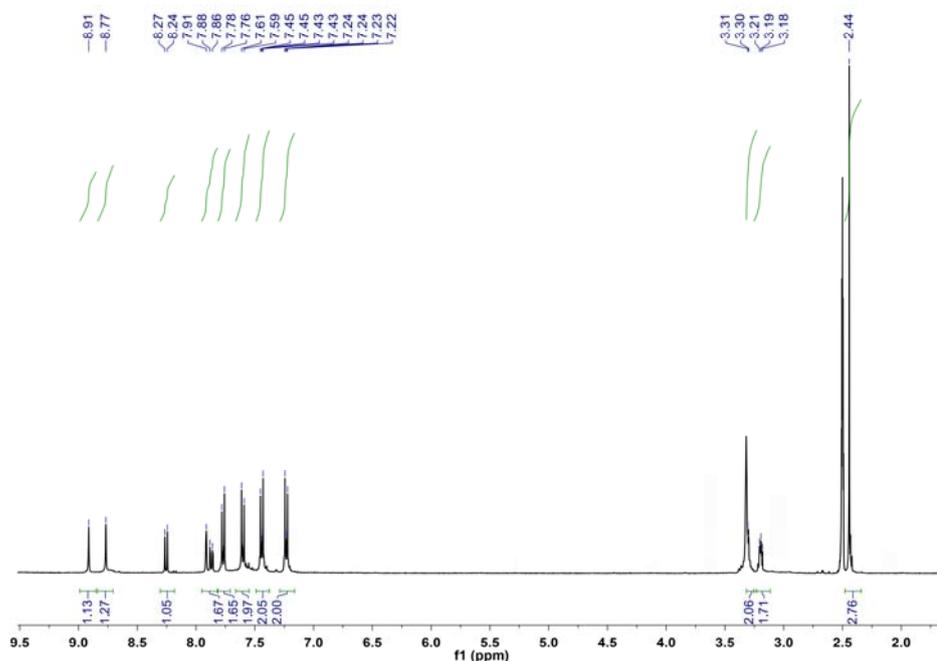
DEPT (DMSO-*d*₆, 75 MHz) of 1-[4-(*N,N*-dimethylamino)phenyl]-3-[4-(1-(dicyanomethylene)indan-5-yl)phenyl]urea

Synthesis of 1-(4-methylthiophenyl)-3-[4-(1-(dicyanomethylene)indan-5-yl)phenyl]urea **12**

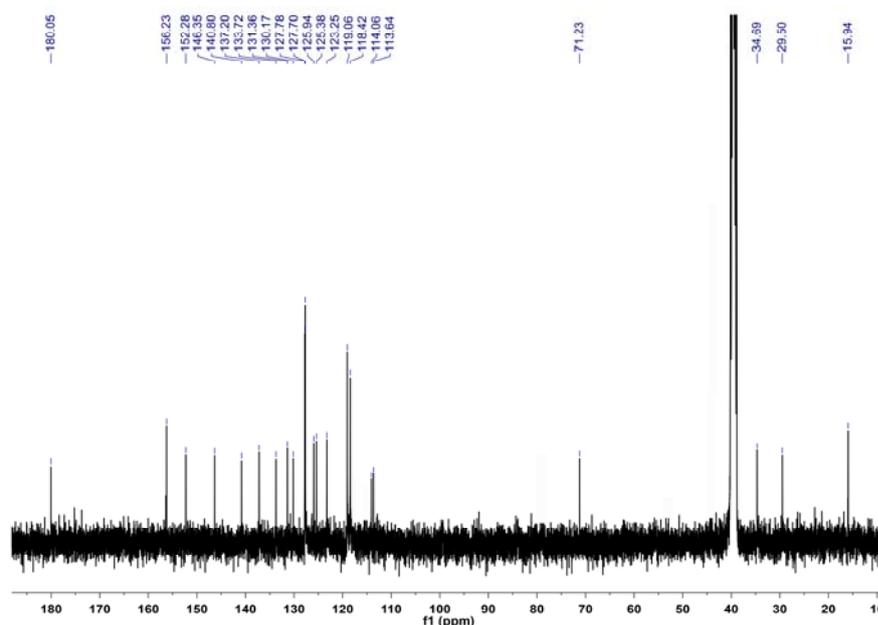


1-Dicyanomethylene-5-(4-aminophenyl)indane **4** (150 mg, 0.55 mmol) was added to *p*-methylthiophenyl isocyanate (91 mg, 0.55 mmol) dissolved in CHCl₃ (10 mL) and the mixture was stirred at room temperature for 48 h. Cyclohexane (3 mL) was then added and the solid formed was filtered off, washed with CHCl₃ (2 portions of 2 mL) and dried. Compound **12** was obtained as a dark yellow solid (173 mg, 72%), mp 209-210 °C. IR (KBr, cm⁻¹): 3317 (br, NH), 2221 and 2194 (C≡N), 1654, 1596 and 1546 (C=O), 1495, 1324, 1281, 1192, 827. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): 8.91 (s, 1H, NH), 8.77 (s, 1H, NH), 8.25 (d, *J* = 8 Hz, 1H, ArH), 7.91 (s, 1H, ArH), 7.87 (d, *J* = 8 Hz, 1H, ArH), 7.77 (d, *J* = 8 Hz, 2H, ArH), 7.60 (d, *J* = 8 Hz, 2H, ArH), 7.44 (d, *J* = 8 Hz, 2H, ArH), 7.23 (d, *J* =

8 Hz, 2H, ArH), 3.30 (m, 2H, CH₂), 3.19 (m, 2H, CH₂), 2.44 (s, 3H, CH₃). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz): 180.05, 156.23, 152.28, 146.35, 140.80, 137.20, 133.72, 131.36, 130.17, 127.78 (CH), 127.70 (CH), 125.94 (CH), 125.38 (CH), 123.25 (CH), 119.06 (CH), 118.42 (CH), 114.06 (CN), 113.64 (CN), 71.23, 34.69 (CH₂), 29.50 (CH₂), 15.94 (CH₃). MS (EI) *m/z* (%): 436 (M⁺, 7), 297 (100), 271 (93), 165 (32). HRMS (EI): calcd. for C₂₆H₂₀N₄OS: 436.1358 (M⁺); found: 436.1359. Anal. Calcd for C₂₆H₂₀N₄OS: C, 71.54; H, 4.62; N, 12.83. Found: C, 71.41; H, 4.78; N, 12.66.

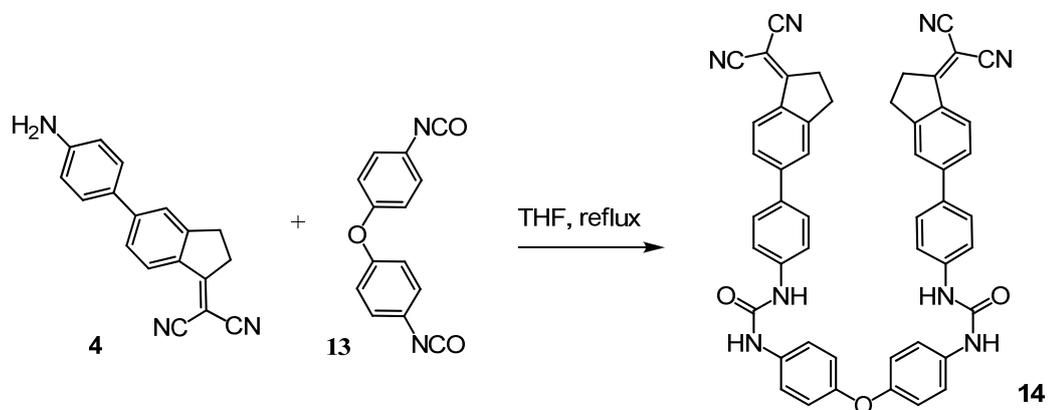


¹H NMR spectrum (DMSO-*d*₆, 400 MHz) of 1-(4-methylthiophenyl)-3-[4-(1-(dicyanomethyleneindan-5-yl)phenyl)]urea



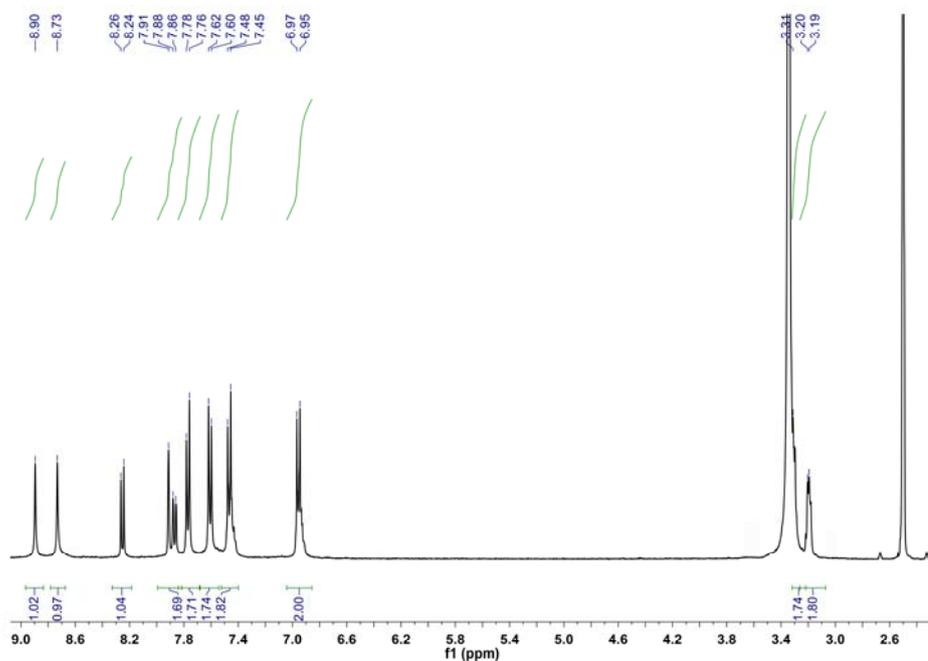
^{13}C NMR spectrum ($\text{DMSO-}d_6$, 100 MHz) of 1-(4-methylthiophenyl)-3-[4-(1-(dicyanomethyleneindan-5-yl)phenyl)urea]

Synthesis of 4,4'-bis-{N-[4-(1-(dicyanomethyleneindan-5-yl)phenyl)-[N'-ureido]]diphenylether 14

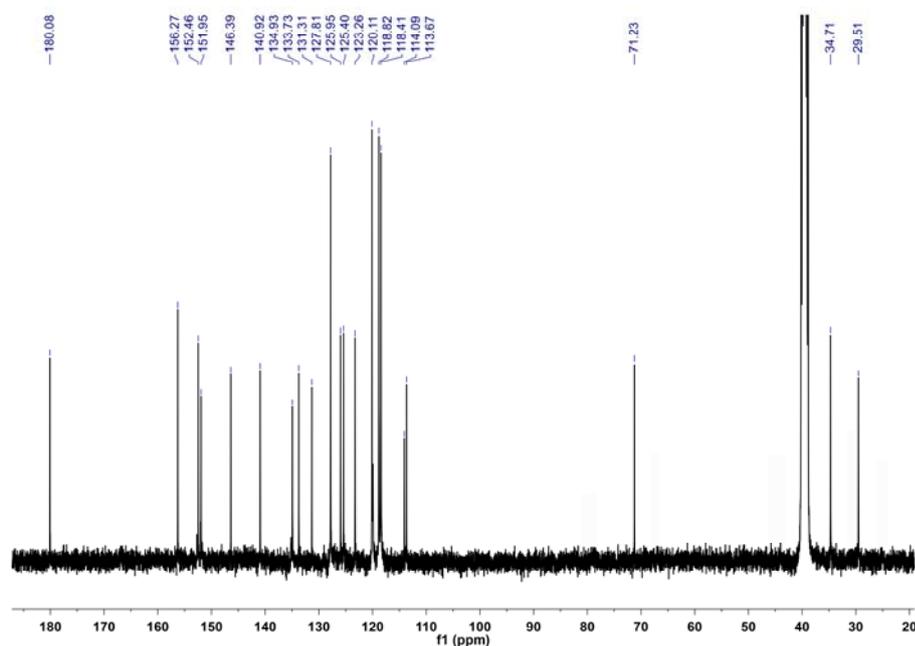


1-Dicyanomethylene-5-(4-aminophenyl)indane **4** (300 mg, 1.10 mmol) was added to 4,4'-diisocyanatodiphenylether (139 mg, 0.55 mmol) dissolved in CHCl_3 (20 mL) and the mixture was stirred at room temperature for 48 h. Cyclohexane (6 mL) was then added and the solid formed was filtered off, washed with CHCl_3 (2 portions of 4 mL) and dried.

Compound **14** was obtained as a dark yellow solid (337 mg, 77%), mp >250 °C. IR (KBr, cm^{-1}): 3316 (br, NH), 2221 ($\text{C}\equiv\text{N}$), 1654, 1598 and 1557 ($\text{C}=\text{O}$), 1510, 1239, 1184, 827. ^1H NMR ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz): 8.90 (s, 2H, NH), 8.73 (s, 2H, NH), 8.25 (d, $J = 8$ Hz, 2H, ArH), 7.91 (s, 2H, ArH), 7.87 (d, $J = 8$ Hz, 2H, ArH), 7.77 (d, $J = 8$ Hz, 4H, ArH), 7.61 (d, $J = 8$ Hz, 4H, ArH), 7.46 (d, $J = 8$ Hz, 4H, ArH), 6.96 (d, $J = 8$ Hz, 4H, ArH), 3.30 (m, 4H, CH_2), 3.19 (m, 4H, CH_2). ^{13}C NMR ($\text{DMSO-}d_6$, 100 MHz) 1780.08, 156.27, 152.46, 151.95, 146.39, 140.92, 134.93, 133.73, 131.31, 127.81 (CH), 125.95 (CH), 125.40 (CH), 123.26 (CH), 120.11 (CH), 118.82 (CH), 118.41 (CH), 114.09 (CN), 113.67 (CN), 71.23, 34.71 (CH_2), 29.51 (CH_2). MS (ESI) m/z (%): 795 ($M + 1$, 15). Anal. Calcd for $\text{C}_{50}\text{H}_{34}\text{N}_8\text{O}_3$: C, 75.55; H, 4.31; N, 14.10. Found: C, 75.39; H, 4.47; N, 13.92.

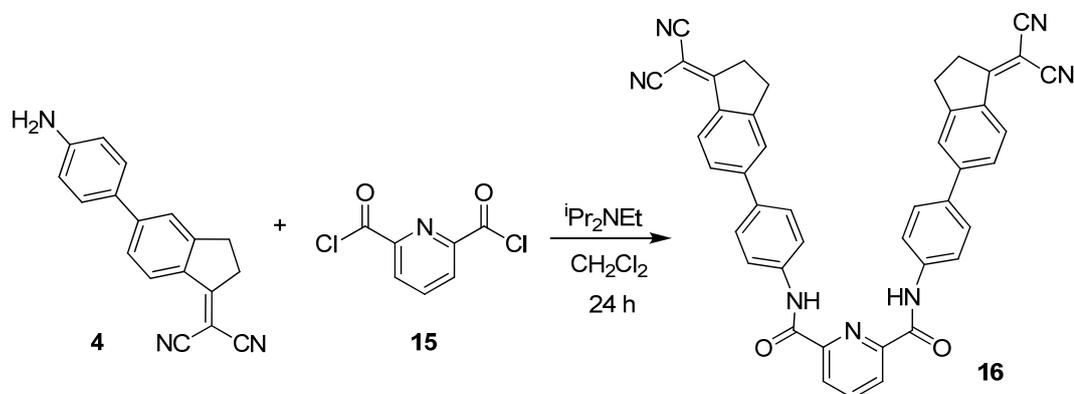


^1H NMR spectrum ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz) of 4,4'-bis-{*N*-[4-(1-(dicyanomethylene)indan-5-yl)-phenyl]-[*N'*-ureido]}diphenylether



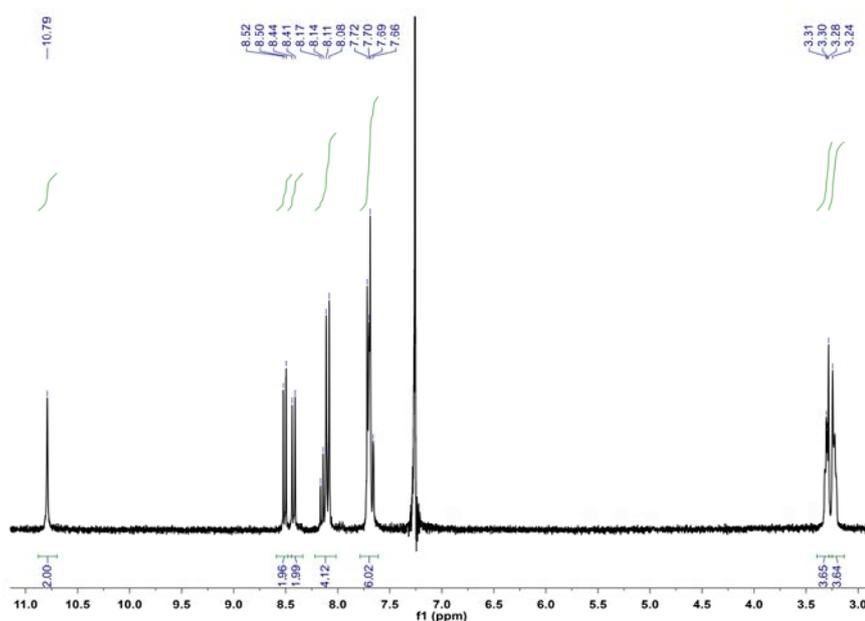
^{13}C NMR spectrum (DMSO- d_6 , 100 MHz) of 4,4'-bis-{N-[4-(1-(dicyanomethyleneindan-5-yl)phenyl)]-[N'-ureido]}diphenylether

Synthesis of *N,N'*-bis-[4-(1-(dicyanomethyleneindan-5-yl)phenyl)]pyridine-2,6-dicarboxamide **16**

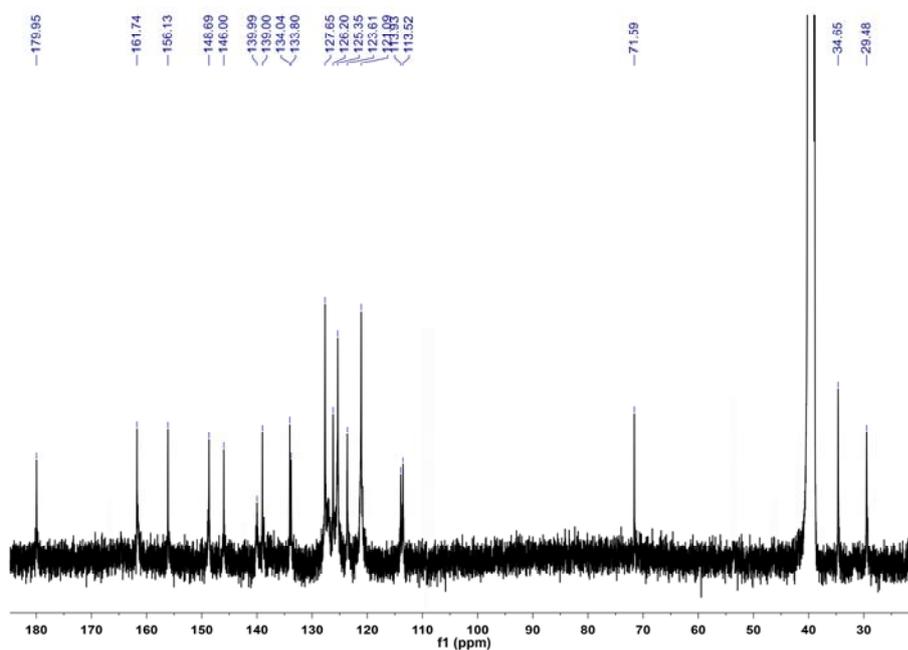


2,6-Pyridinedicarbonyl dichloride (75 mg, 0.37 mmol) dissolved in dichloromethane (10 mL) was added dropwise to a chilled and stirred solution of 1-dicyanomethylene-5-(4-aminophenyl)indane **4** (200 mg, 0.74 mmol) and *N,N'*-diisopropylethylamine (96 mg, 0.74 mmol) in dichloromethane (50 mL). The mixture was

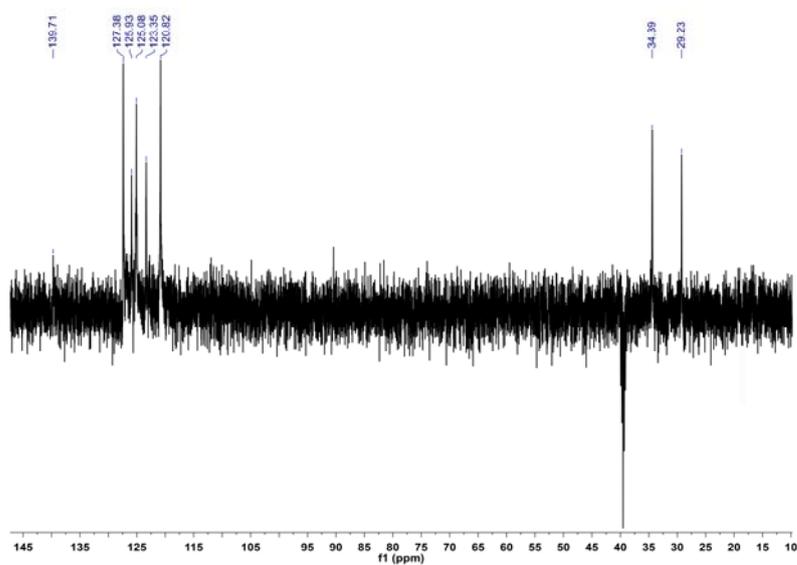
left to warm to room temperature and stirred for 24 hours. The solid formed was filtered off, washed with CHCl_3 (2 portions of 3 mL) and dried. Compound **16** was obtained as a dark yellow solid (197 mg, 79%), mp >250 °C. IR (KBr, cm^{-1}): 3344 (br, NH), 2221 ($\text{C}\equiv\text{N}$), 1682, 1565, and 1526 ($\text{C}=\text{O}$), 1340, 1188, 819. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) 10.79 (s, 2H, NH), 8.51 (d, $J = 12$ Hz, 2H, ArH), 8.42 (d, $J = 12$ Hz, 2H, ArH), 8.16 (d, $J = 12$ Hz, 2H, ArH), 8.10 (d, $J = 8$ Hz, 4H, ArH), 7.72 (m, 8H, ArH), 3.30 (m, 4H, CH_2), 3.18 (m, 4H, CH_2). ^{13}C NMR (DMSO-d_6 , 75 MHz) 179.95, 161.74, 156.13, 148.69, 146.00, 139.99 (CH), 139.00, 134.04, 133.80, 127.65 (CH), 127.05, 126.20 (CH), 125.35 (CH), 123.61 (CH), 121.09 (CH), 113.93 (CN), 113.52 (CN), 71.50, 34.65 (CH_2), 29.48 (CH_2). MS (ESI) m/z (%): 674 ($M + 1$, 12). Anal. Calcd for $\text{C}_{43}\text{H}_{27}\text{N}_7\text{O}_2$: C, 76.66; H, 4.04; N, 14.55. Found: C, 76.49; H, 4.19; N, 14.39.



^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) of *N,N'*-bis-[4-(1-(dicyanomethyleneindan-5-yl)phenyl)pyridine-2,6-dicarboxamide]



^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 75 MHz) of *N,N'*-bis-[4-(1-(dicyanomethyleneindan-5-yl)phenyl)pyridine-2,6-dicarboxamide]



DEPT (DMSO- d_6 , 75 MHz) of *N,N'*-bis-[4-(1-(dicyanomethyleneindan-5-yl)phenyl)pyridine-2,6-dicarboxamide]

7. RESUMEN

Los sensores químicos moleculares, fluorogénicos y cromogénicos han adquirido una gran importancia en el mundo científico; estos sistemas presentan un doble interés, el primero es de tipo básico, se basa en el estudio de las interacciones entre huésped-receptor-colorante en relación a la señalización de procesos de coordinación; el otro campo de interés es la aplicación de estos sistemas y se basa en el desarrollo de sistemas de detección de especies químicas de interés mediante simples cambios de color y/o emisión fluorescente.

Durante los últimos años nuestro grupo de trabajo ha puesto a punto una nueva familia de sondas fluorogénicas intrínsecas muy selectivas, capaces de desarrollar grandes diferencias de fluorescencia en presencia de determinados analitos; en esta Tesis Doctoral se han estudiado una serie de sistemas capaces de realizar una detección selectiva de analitos seleccionados entre miembros de series análogas de biomoléculas, y también sondas colorimétricas capaces de actuar en la detección de especies para las que no existen en la actualidad quimiosensores específicos.

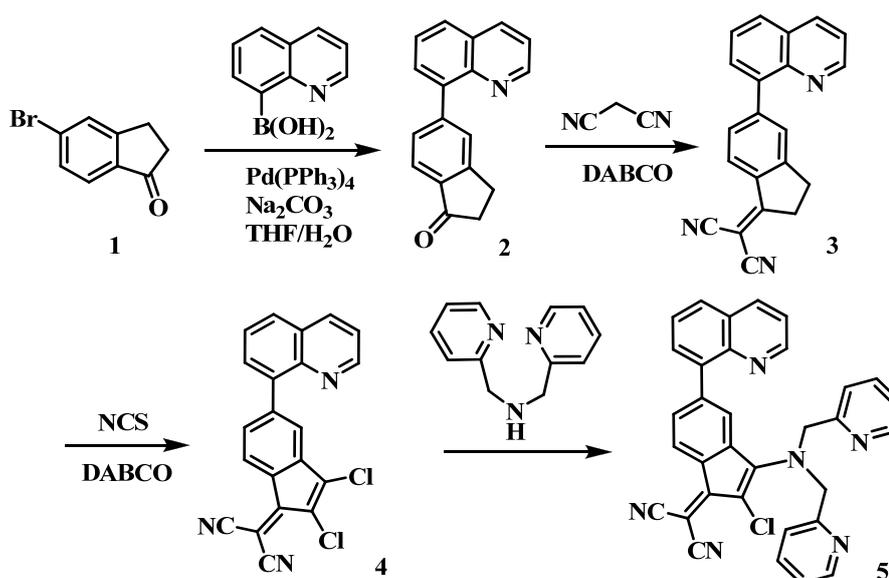
Desarrollo de una sonda cromogénica orientada a la detección y especiación de mercurio(II) y catión metilmercurio(II).

La contaminación medioambiental por derivados de mercurio(II) tiene gran importancia a causa de la enorme cantidad de mercurio que se emite al medio ambiente por la acción humana. De las especies de mercurio metal que pueden encontrarse en el medio ambiente, la que tiene más importancia es el catión metilmercurio(II), que se produce en el medio ambiente por la acción de bacterias a partir de catión mercurio(II) en agua y su principal característica es que tiende a acumularse en organismos vivos.

Se ha realizado el screening de una serie de complejos de paladio, de los cuales se han estudiado sus características como sensores químicos de cationes, encontrándose que uno de ellos es especialmente adecuado para esta función presentando una alta selectividad y sensibilidad frente a Hg^{2+} en distintos disolventes.

una buena selectividad para este catión frente aniones y cationes en disolventes orgánicos apróticos, y en disolventes próticos, así como en medios acuosos o parcialmente acuosos.

Se ha sintetizado un nuevo producto derivado de indeno que posee un grupo fluorogénico, mediante la introducción de un sustituyente quinolina en la posición 5 de la indanona, a través de una reacción de acoplamiento de Suzuki entre el halógeno-derivado y el ácido borónico correspondiente. Después se añadió una unidad receptora capaz de formar quelatos, introducida en la posición 3 del indeno.



El compuesto obtenido cumple con los objetivos propuestos, ya que posee una alta selectividad frente al catión cobre(II) en distintos disolventes, incluso parcialmente acuosos.



$5(\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O } 1:1)$ Ag^+ Ni^{2+} Sn^{2+} Cd^{2+} Zn^{2+} Pb^{2+} Cu^{2+} Fe^{3+} Sc^{3+} Al^{3+} Hg^{2+}

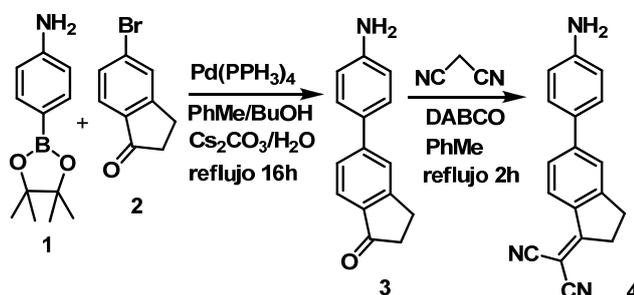


5, 5 + Cu²⁺ (MeCN)

El estudio de los cambios espectroscópicos de dicho compuesto, tanto en sus espectros de absorción en UV-Vis, emisión fluorescente, como en resonancia magnética nuclear, permiten confirmar la selectividad de esta sonda; del mismo modo los cálculos de límites de detección nos indican que puede ser útil para la detección de catión cobre(II) en muestras de origen medioambiental, en el rango de las cantidades traza ($\mu\text{g l}^{-1}$), requeridas por los organismos vivos, mediante espectroscopía de ultravioleta-visible y fluorescencia.

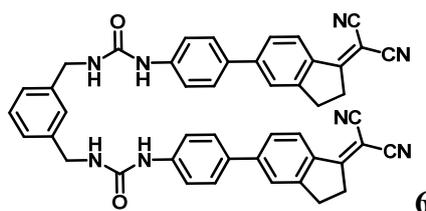
Desarrollo de nuevos protocolos de reconocimiento fluorogénico para la detección selectiva de algunos aminoácidos y sus metabolitos de interés biosanitario.

Se ha realizado el estudio y la síntesis de receptores, capaces de actuar como sondas fluorogénicas en disolución, para la detección de aminoácidos y sus metabolitos de interés biológico. Todos estos nuevos compuestos tienen en común una sustancia fluorescente **4**, sintetizada a partir de una metodología puesta a punto en el grupo de investigación, consistente en una reacción de acoplamiento tipo Suzuki y una condensación de Knoevenagel, obteniéndose así un derivado, que lleva un grupo amina, y que ha mostrado propiedades fluorescentes interesantes.

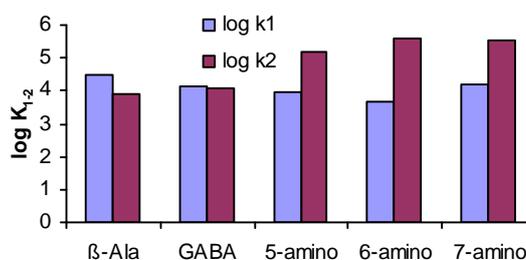


La estructura fluorogénica sintetizada, que lleva un grupo amino, se ha utilizado para la síntesis de todos los receptores, tanto aquellos que están basados en ureas como el que está basado en una bisamida.

Se ha puesto a punto una sonda fluorescente tipo bisurea, capaz de interactuar con derivados de ω -aminoácidos, cambiando la emisión fluorescente amarilla inicial en azul, en función de la distancia entre el grupo amino terminal y el grupo carboxilato del analito, comportándose por tanto como una regla molecular:



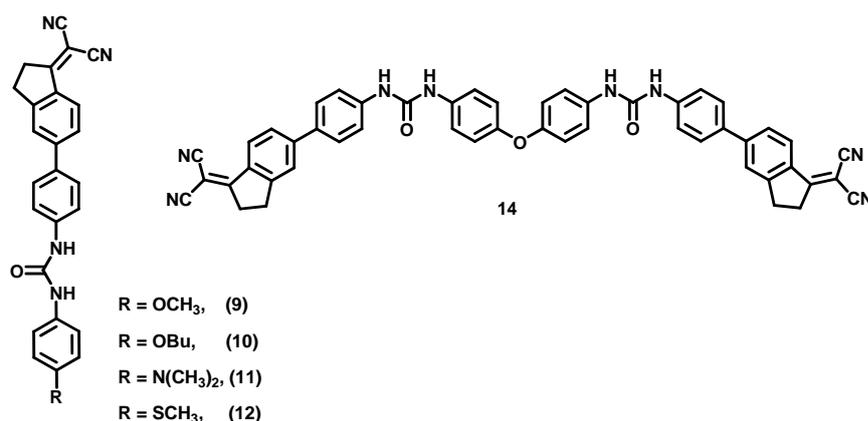
Ref. Ala, β -ala, GABA, 5-am, 6-am, 7-am



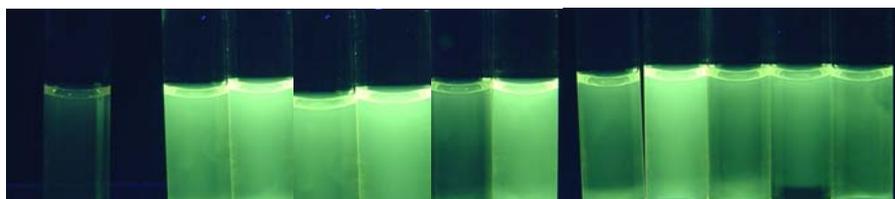
Izquierda: Efecto de la adición de 3 equivalentes de cada uno de los ω -aminoácidos en agua sobre la fluorescencia de una disolución 10^{-4} M de **6** en DMSO: **Ala:** α -alanina, **β -ala:** β -alanina, **GABA:** ácido γ -aminobutírico, **5-am:** ácido 5-aminovalérico, **6-am:** ácido 6-aminohexanoico, **7-am:** ácido 7-aminoheptanoico. **Derecha:** Gráfico de los valores de $\log K_{1,2}$ para los complejos 2:1 formados entre **6** y los ω -aminoácidos.

La bisurea fluorescente es suficientemente selectiva como para que sirva para la detección de metabolitos encontrados en suplementos nutricionales, así como fármacos relacionados con ellos, como pregabalina o gabapentina (de estructura similar a la de los ω -aminoácidos) con límites de detección bajos.

Se han sintetizado una serie de compuestos fluorogénicos con estructuras del tipo bisdiarilureas.



De entre todos ellos se ha puesto a punto una sonda fluorogénica **14** de aminas biogénicas, que funciona generando una elevada fluorescencia en presencia de diversas aminas de origen natural o sintético.

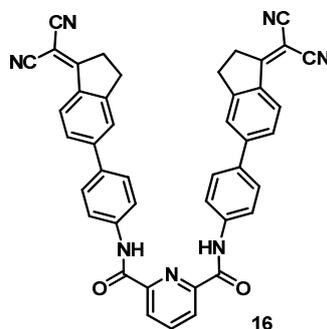


Ref, pu, esp, ser, dop, cist, cad, his, esd, eta, trip, tir.

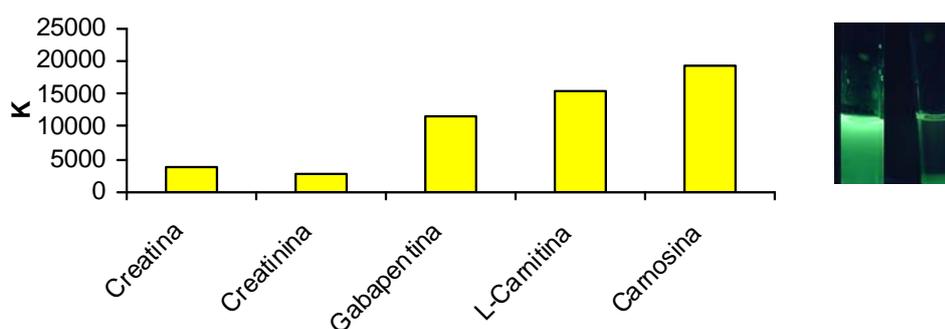
Efecto de la adición sobre una disolución 10^{-4} M de **14** en DMSO de dos equivalentes de cada amina en H_2O : Ref, **pu**: putrescina, **esp**: espermina, **ser**: serotonina, **dop**: dopamina, **cist**: cisteamina, **cad**: cadaverina, **his**: histamina, **esd**: espermidina, **eta**: etanolamina, **trip**: triptamina, **tir**: tiramina ($\lambda_{\text{exc}} = 366 \text{ nm}$).

La fluorescencia generada depende de la estructura de la amina utilizada como analito, observándose que dicha fluorescencia se extingue con el tiempo. Se han estudiado los parámetros característicos del proceso, como la velocidad de formación y de extinción de la fluorescencia y la constante de equilibrio del mismo. Los datos obtenidos permiten hacer un estudio multivariante, basado en componentes principales, que ha permitido identificar cada una de las aminas estudiadas, integrándolas en grupos de características similares.

Se ha puesto a punto una sonda fluorescente tipo bisamida, que ha demostrado ser un buen quimiosensor para la detección fluorogénica de derivados de ω -aminoácidos.



La sonda fluorogénica descrita se comporta también como una regla molecular, extinguiéndose la emisión fluorescente inicial en función de la distancia entre el grupo amonio terminal y el grupo carboxilato del analito.



Representación de las constantes de complejación de **16** (10^{-4} M, DMSO) con los distintos metabolitos y fármacos estudiados (H_2O , $\lambda_{\text{excitación}} = 366$ nm, $\lambda_{\text{máxima}}^{\text{emisión}} = 512$ nm)

Con la ayuda de los estudios espectroscópicos realizados, se ha encontrado que la sonda fluorescente es suficientemente selectiva como para que sirva para la detección de ω -aminoácidos y sus metabolitos, encontrados en suplementos nutricionales, así como fármacos relacionados estructuralmente con ellos, en condiciones fisiológicas tamponadas.

8. SUMMARY

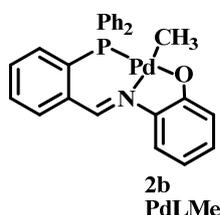
Fluorogenic and chromogenic molecular chemical sensors have become extremely important in the chemical science. These systems are doubly interesting; first from the point of basic research, they study the host-guest interactions, mediated by a dyestuff, oriented to the signalling of coordination processes; second, the applications of these systems is intended to the development of detection systems for selected interesting analytes from simple colour absorption or fluorescent emission changes.

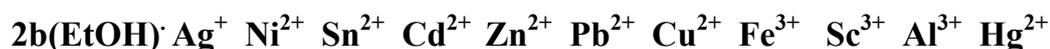
During the last period, the research group has developed a new family of intrinsically fluorogenic probes, very selective and capable of generate large differences in the fluorescent emission in the presence of selected analytes; in this PhD Thesis, I have studied a series of such systems capable of selectively detect a range of analytes from related biomolecular compounds. I have also developed colorimetric probes able to make detection of species for which there are not currently specific chemical sensors.

Development of a chromogenic probe for the detection and speciation of mercury(II) and methylmercury(II) cations.

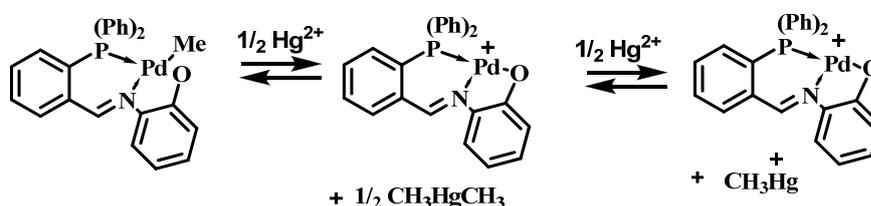
Environmental contamination by mercury(II) derivatives is a matter of concern because of the enormous amount of mercury released to the environment by the human activity. From the mercury metal species that can be found in the environment, methylmercury(II) cation is the most important one; it is produced by environmental bacteria from mercury(II) cation in water and it is bio-accumulated in the living organisms.

With this aim, I have performed a screening of a series of palladium complexes, from them I have studied their characteristics as chemical sensors for cations. I have found that one of them was specially suited for this matter, showing a very high selectivity and sensitivity against mercury(II) cation in a range of diverse solvents.





The detection of mercury(II) cation has been studied by UV-vis titrations, from which I have obtained the titration constants and the detection limits corresponding to every one of the mercury derivatives studied. From the NMR experiments I have identified all intermediates that are responsible for the detection process.



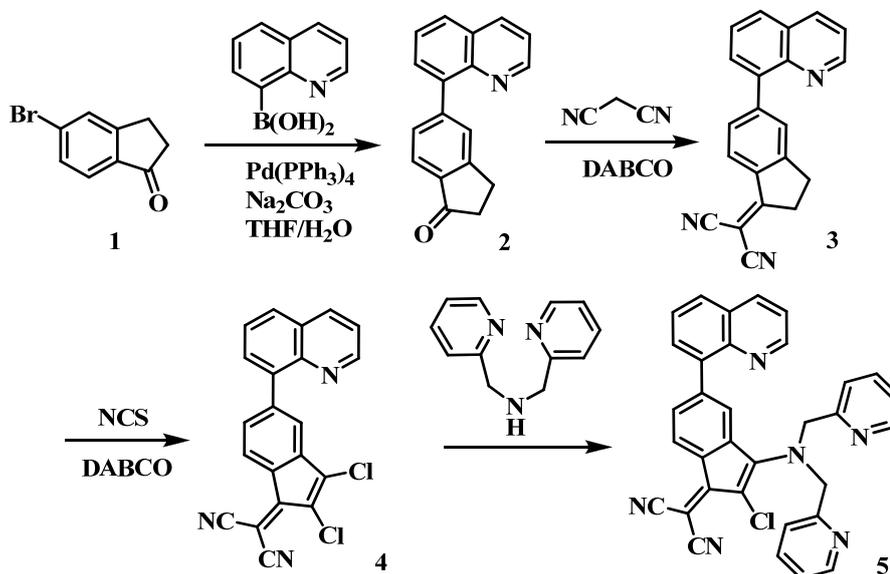
From the study of all these processes I have established a series of equilibrium reactions, from which species of mercury(II) and methylmercury(II) cations can be identified and quantified in a mixture.

Development of new sensing materials oriented to the fluorogenic detection of copper(II) cation.

The previously developed experience in the synthesis and the knowledge of physico-chemical properties of indene derivatives has allowed the preparation of a new compound that has shown interesting applications as chemical sensor, in addition to a very good selectivity for copper(II) cation in comparison to the rest of cations, being insensitive to anions. All these characteristics are also performed in protic as well as aprotic solvents and in mixed organic aqueous solvents.

The synthesis of the new fluorogenic indene derivative has been performed by introduction of a quinoline substituent in the 5 position of indanone. This process was

performed by Suzuki coupling between the halogen derivative and the corresponding boronic acid. Then a receptor unit, able to perform complexation of metal cations, was introduced in the 3-position of the indene nucleus.



The synthesized compound accomplished the expected objectives, showing a very high selectivity for the copper(II) cation in different solvents, including mixtures of organic and aqueous solvents.



5(CH₃CN:H₂O 1:1): **Ag**⁺ **Ni**²⁺ **Sn**²⁺ **Cd**²⁺ **Zn**²⁺ **Pb**²⁺ **Cu**²⁺ **Fe**³⁺ **Sc**³⁺ **Al**³⁺ **Hg**²⁺

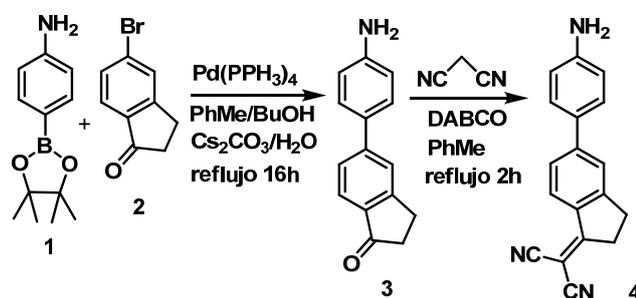


5, **5** + **Cu**²⁺ (MeCN)

The study of spectroscopic changes of the synthesized compound, by using UV-vis absorption spectroscopy, Fluorescent emission spectroscopy and nuclear magnetic spectroscopy, has permitted to confirm the selectivity of the molecular probe. The detection limits indicated that the molecular probe can be employed for the detection of copper(II) cation in samples from environmental origin, in the range of trace amounts ($\mu\text{g l}^{-1}$), required by living organisms, measured by ultraviolet-visible spectroscopy and fluorescence spectroscopy.

Development of new protocols for the fluorogenic sensing for the selective detection of selected aminoacids and their metabolites having a bio-sanitary interest.

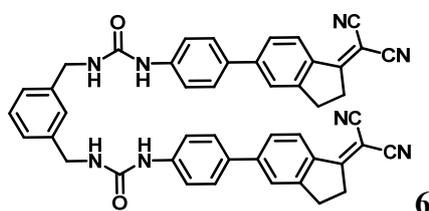
I have performed the design and synthesis of chemical receptors, able to act as fluorogenic probes in solution, for the detection of aminoacids and their metabolites of biological interest. All these new compounds share as a common characteristic the existence of a fluorescent compound **4**, synthesized by a new methodology developed in the research group, consisting of a Suzuki coupling reaction followed by a Knoevenagel condensation, that gives rise to an amino-derivative with interesting fluorescent properties.



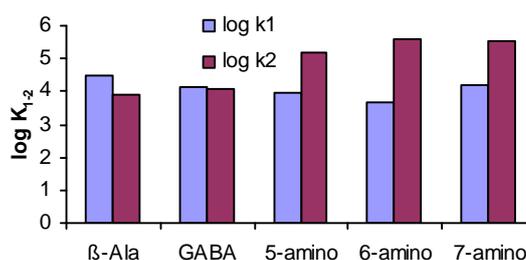
The synthesized fluorescent structure, carrying an amino group, has been employed for the synthesis of all receptors of aminoacids, some of them as urea derivatives, and another one as a bis-amide derivative.

First, I have synthesized and studied a fluorescent probe having a bisurea group, able to interact with ω -aminoacids and their derivatives. This fluorescent probe effectively showed a modification of the initial yellow fluorescent emission into blue as a function of

the distance between the amino terminal group and the carboxylate group from the analyte, thus behaving as a molecular ruler.



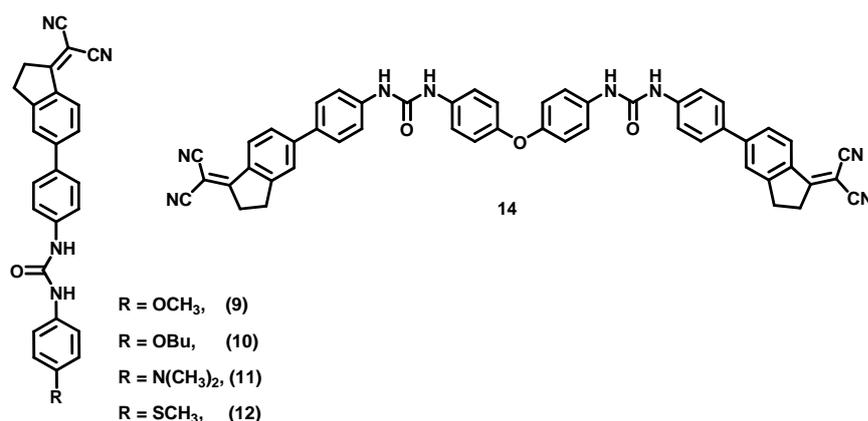
Ref. Ala, β -ala, GABA, 5-am, 6-am, 7-am



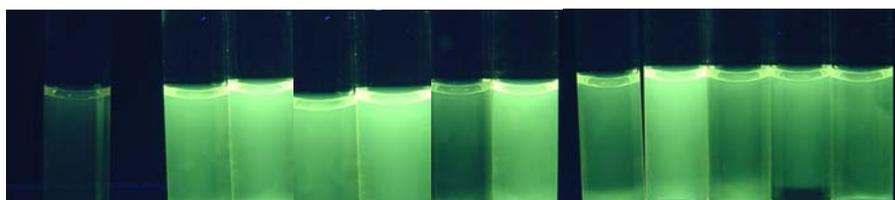
Left: effect of the addition of 3 equivalents of every ω -aminoacid in water on the fluorescence of a 10^{-4} solution of **6** in DMSO: **Ala**: α -alanine, **β -ala**: β -alanine, **GABA**: γ -aminobutyric acid, **5-am**: 5-aminovaleric acid, **6-am**: 6-aminohexanoic acid, **7-am**: 7-aminoheptanoic acid. **Right:** Plot of $\log K_{1-2}$ values for the 2:1 complexes between **6** and ω -aminoacids.

The fluorescent bisurea is sufficiently selective for the detection of metabolites found in nutritional supplements, as well as drugs related to them, such as pregabalin and gabapentine, which have a structure related to ω -aminoacids, with very low detection limits.

Then I have synthesized a series of fluorogenic compounds having in common a bis-diarylurea structure.



From all these compounds, I have studied a fluorogenic probe **14** for biogenic amines, which works by generating a very high fluorescence in the presence of a range of natural or synthetic amine derivatives.

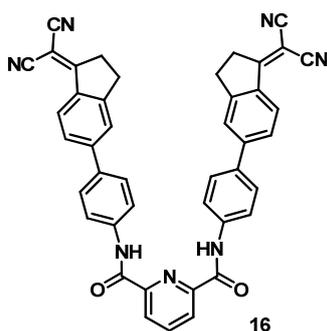


Ref, pu, esp, ser, dop, cist, cad, his, esd, eta, trip, tir.

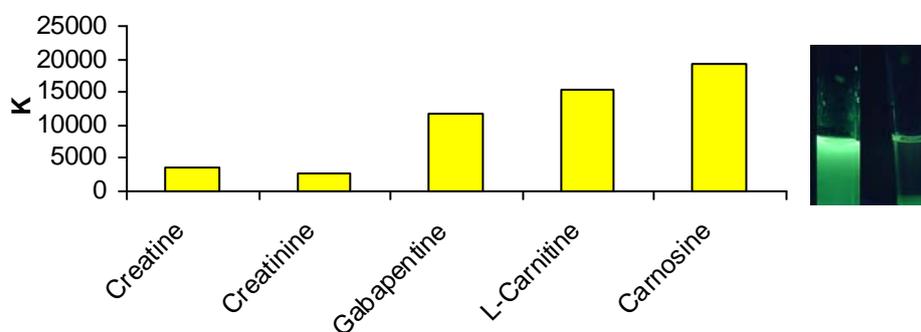
Effect of the addition of 2 equivalentes of every amine to a 10^{-4} solution of **14** in DMSO: **Ref**, **pu**: putrescine, **esp**: espermine, **ser**: serotonine, **dop**: dopamine, **cist**: cisteamine, **cad**: cadaverine, **his**: histamine, **esd**: espermidine, **eta**: ethanolamine, **trip**: triptamine, **tir**: tiramine ($\lambda_{\text{exc}} = 366 \text{ nm}$).

The generated fluorescence depended on the structure of the analyte amine, showing that the fluorescence faded with time. I have studied the characteristic parameters of the process, such as formation and extinction rates of the fluorescence, and the equilibrium constants. The obtained data permitted to perform a multivariate study, based on the principal components, which has permitted to identify every one of the studied amines, by integrating them in groups of similar characteristics.

I have also studied a fluorescent probe with a bisamide structure, which has shown to be a good chemical sensor for the fluorogenic detection of ω -aminoacid derivatives.



The described fluorescent probe behave as a molecular ruler, extinguishing the initial fluorescent emission as a function of the distance between the ammonium terminal group and the carboxylate group of the analyte.



Plot of the complexation constants of **16** (10^{-4} M, DMSO) with the diverse metabolites and drugs studied (H_2O , $\lambda_{\text{excitation}} = 366$ nm, $\lambda_{\text{maximum emission}} = 512$ nm)

From the spectroscopic studies, I have found that the fluorescent probe is sufficiently selective for the detection of ω -aminoacids and their metabolites, such as those found in nutritional supplements, and the related drugs that have structural similarities, all in buffered solutions.

9. CONCLUSIONS

From the experimental results obtained during the performance of this work, I have extracted the following conclusions:

1.- I have performed the screening of a series of palladium complexes, from which I have studied their characteristics as chemical sensors of cations, from this study I have found that one of them was especially suited for the chemical sensing of cations, showing a very high selectivity and sensitivity for mercury(II) cation in a range of different solvents.

2.- The study of the detection processes of mercury(II) and methylmercury(II) cations has permitted the discovery of a series of reaction equilibriums, from which the species of mercury(II) and methylmercury(II) cations can be identified and quantified, permitting also the quantification of both species in a mixture of them.

3.- A new chromogenic and fluorogenic OFF-ON probe has been developed, permitting the naked eye detection of copper(II) cation in mixtures of acetonitrile and water, in conditions of complete selectivity and nanomolar sensitivity.

4.- The molecular probe developed for copper(II) cation can be useful for the detection of copper(II) cation in samples from environmental origin, in the range of trace amounts ($\mu\text{g l}^{-1}$), required by living organisms, by ultraviolet-visible spectroscopy and emission fluorescence spectroscopy.

5.- I have studied a fluorogenic probe having a bis-urea structure, which is able to recognize ω -aminoacids and behaves as a molecular ruler, changing the initial yellow fluorescence emission into blue as a function of the distance between the terminal ammonium group and the carboxylate group of the analyte.

6.- The fluorescent probe is sufficiently selective for the detection of ω -aminoacids and their metabolites, such as found in nutritional supplements, as well as drugs related to them, such as pregabalin and gabapentin, from their pharmaceutical preparations.

7.- From a series of fluorogenic compounds, having a structure of bis-diarylethers, I have studied a fluorogenic probe for biogenic amines, which works generating a high fluorescent emission in the presence of a range of amines from natural or synthetic origin, in which the generated fluorescence depends on the structure of the employed amine, and results to be extinguished on time, being the emission formation and extinction different for every studied amine.

8.- The studied fluorogenic probe is able to discriminate between the diverse biogenic amines or their synthetic mimics, which is capable to detect by fluorescent emission, due to the weight that every component studied has in the principal components analysis, and this characteristic is applied to highly interesting amines from their pharmacological or biological point of view, such as synthetic amphetamines, with extremely low limits of detection.

9.- I have studied a fluorescent probe, having a bis-amide structure, suitable for the detection of ω -aminoacids, which also behaves as a molecular ruler, diminishing the initial fluorescent emission as a function of the distance between the ammonium terminal group and the carboxylate group of the analyte.

10.- The fluorescent probe is sufficiently selective to be used for the detection of ω -aminoacids and their metabolites, such as found in nutritional supplements, as well as drugs structurally related to them, from their commercial pharmaceutical formulations, being possible to detect the analytes in physiologically buffered solutions.

ANEXO. I

ABREVIATURAS UTILIZADAS EN ESTA MEMORIA

A	absorbancia
Å	10^{-10} m
c	cuartete
CD ₃ CN	acetonitrilo deuterado
CD ₃ OD	etanol deuterado
DABCO	1,4-diazobicyclo[2.2.2]octano
d	doblete
dd	doble doblete
dc	doble cuartete
DMSO	dimetilsulfóxido
D ₂ O	agua deuterada
EM	espectrometría de masas
eq	equivalente
ESI-MS	espectrometría de masas mediante ionización con electrospray
EtOH	etanol
Et ₂ O	éter dietílico
FAB	Fast Atom Bombardent (técnica de bombardeo con átomos rápidos)
FRET	(Förster resonant energy transfer) fluorescencia con transferencia resonante de energía
GABA	ácido gamma-aminobutírico
Hz	hercios

ANEXO I

HOMO	orbital molecular ocupado de mayor energía
HPLC	cromatografía líquida de alta eficiencia
I	intensidad de fluorescencia
IR	infrarrojos
<i>J</i>	constante de acoplamiento
kg	kilogramo
LED	diodo emisor de luz
LUMO	orbital molecular desocupado de menor energía
M	concentración molar
m	multiplete
M ⁺	ión molecular
m/z	masa por unidad de carga
MCM	mobile crystalline material
MeCN	acetonitrilo
mg	miligramo
NCS	n-clorosuccinimida
nm	10 ⁻⁹ m
nM	milimolar
PET	transferencia electrónica fotoinducida
p.f.	punto de fusión
pM	pico molar
ppb	partes por billón
ppm	partes por millón

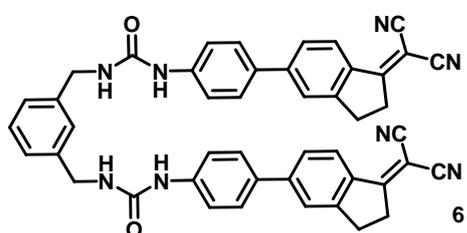
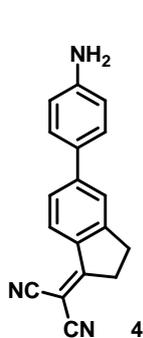
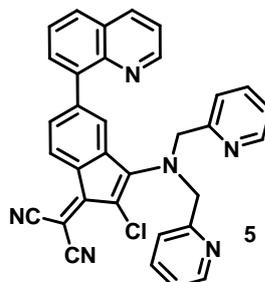
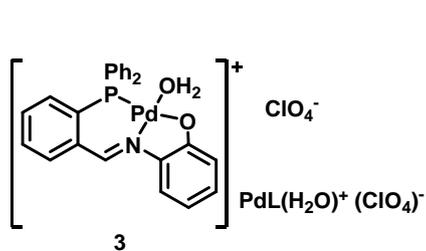
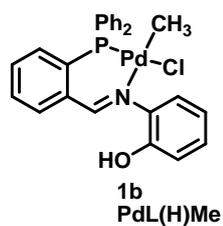
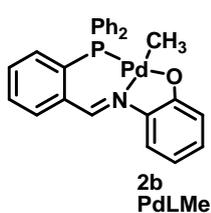
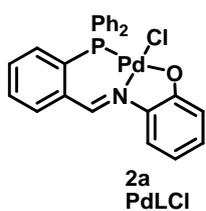
PVC	policloruro de vinilo
RMN	resonancia magnética nuclear
s	singulete
t	triplete
THF	tetrahidrofurano
TTF	tetratriafulvaleno
UV	ultravioleta
V	volumen
Vis	visible
X	fracción molar
μl	microlitro
μM	micromolar
λ	longitud de onda
δ	desplazamiento químico
ε	coeficiente de extinción molar
Φ	rendimiento cuántico

ABREVIATURAS DE LOS ANALITOS ESTUDIADOS

Ala	α -alanina
anf	anfetamina
Arg	arginina
Asn	asparagina
Asp	ácido aspártico
cad	cadaverina
Carnit	L-carnitina
cist	cisteamina
Creat	creatina
Cys	cisteína
dop	dopamina
eph	efedrina
esd	espermidina
esp	espermina
eta	etanolamina
Gln	glutamina
Glu	ácido glutámico
His	histidina
his	histamina
Leu	leucina
Lys	lisina
MDA	3,4-metilendioxianfetamina
MDMA	3,4-metilendioximetanfetamina
Met	metionina
peh	pseudoefedrina

Phe	fenilalanina
Pro	prolina
pu	putrescina
Sarc	sarcosina
Ser	serina
ser	serotonina
Thr	treonina
tir	tiramina
trip	triptamina
Trp	triptófano
Tyr	tirosina
β -ala	β -alanina
5-am	ácido 5-aminovalerico
6-am	ácido 6-aminohexanoico
7-am	ácido 7-aminoheptanoico

ANEXO. II

R = OCH₃, (9)

R = OBu, (10)

R = N(CH₃)₂, (11)R = SCH₃, (12)