

VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Facultat de Química

Instituto Interuniversitario de Reconocimiento Molecular y Desarrollo

Tecnológico (IDM) y Departamento de Química Orgánica

DOCTORADO EN QUÍMICA



DISEÑO, SÍNTESIS Y EVALUACIÓN DE QUIMIOSENSORES ÓPTICOS PARA LA DETECCIÓN DE PERÓXIDOS Y OTRAS ESPECIES BIOLÓGICAMENTE ACTIVAS

Presentada por:

Estefanía Almenar Sánchez

Dirigida por:

Margarita Parra Álvarez

Pablo Gaviña Costero

València, enero de 2024

Margarita Parra Álvarez, Catedrática del Departamento de Química Orgánica de la Universitat de València y Pablo Gaviña Costero, Catedrático del Departamento de Química Orgánica de la Universitat de València

CERTIFICAN,

Que el trabajo titulado **“Diseño, síntesis y evaluación de quimiosensores ópticos para la detección de peróxidos y otras especies biológicamente activas”** ha sido desarrollado por Estefanía Almenar Sánchez bajo su dirección en el Instituto Interuniversitario de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico (IDM) en la Universitat de València, para optar al grado de Doctor en Química y autorizan la presentación de esta Tesis Doctoral para que se cumplan los trámites reglamentarios.

València, enero 2024.

Margarita Parra Álvarez

Pablo Gaviña Costero

"Por convención el color, por convención lo dulce, por
convención lo salado, pero en realidad existen sólo átomos y
vacío"

Demócrito

Agraïments

Llegados a este punto vuelvo la vista atrás y veo el largo camino recorrido. Un camino que comenzó en cuarto de carrera cuando el Catedrático Pablo Gaviña consiguió reconciliarme con la rama más bonita de la química.: la orgánica. 3 años después comencé la tesis doctoral.

En primer lugar, quiero agradecer la supervisión y el apoyo durante todo el tiempo que ha durado la realización de esta Tesis a mis directores Margarita Parra y Pablo Gaviña. Seguidamente, quiero agradecerle a Ana M. Costero la oportunidad de desarrollar la Tesis en su grupo de investigación. Además, quiero darle las gracias a Salvador Gil, por sus consejos durante toda la tesis.

En segon lloc, m'agradaria donar les gràcies als meus companys de laboratori. Gràcies per ensenyar-me tota la química possible, però també per ensenyar-me a valorar la nostra llengua. Gràcies per fer del laboratori un lloc de treball d'allò més excepcional. Gràcies a tots els companys que heu passat pel 4.34. Gràcies Kathe per permetre que seguira una de les teues línies d'investigació. Gràcies Raül per inspirar-me a emprendre més enllà de la ciència. Gràcies Almu per ensenyar-me totes les tècniques alternatives del laboratori i per cedir-me el teu "tron". Gràcies Dani per obligar-me a eixir de la meua zona de confort com quan em feies córrer abans de menjar. Amb el que em queixava i mira'm ara! Gràcies Carlos per ser un company excepcional en un altre àmbit més de la meua vida. Gracias Tania por tu energía y tu ímpetu, por ser un soplo de aire nuevo y revolucionario. A ti, Mariana, casi que te pido perdón por haberte dejado sola ante el peligro nada más llegar. Gracias también a la gente del "otro lado del muro" Andrea, Alberto, Elena y en especial a Silvia. También quiero dar las gracias a todos y cada uno de los técnicos de laboratorio por hacernos el trabajo más fácil.

Gracias también a todos y cada uno de los TFGs y TFM's que habéis compartido vitrina conmigo. Gracias por confiar en mí para guiaros. En especial quiero agradecer a Gisela, a Marta, a Antonio y a María toda vuestra ayuda. Os he pensado muchísimo escribiendo esta tesis.

No puedo olvidarme de mis compañeros de Máster, en especial de Dan, Fer y el Bilder. Gracias también a mis compañeros de Reakiro S.L. y del ICIQ.

También quiero agradecer a mi familia, en especial a mis padres Pepa y Vicente, su apoyo incondicional. No puedo olvidarme de Inés, Julia y Clemente, moltes gràcies de tot cor per tot. Gracias a ti Carlos (me la juego con el copyright) “perquè fins i tot hui, estàs ací”.

La vida muchas veces te lleva a tomar decisiones que son como saltar al vacío. Saltar sabiendo que ellas y ellos están ahí por si me caigo es más fácil: Gracias a Clara, Lucía y Marta por ser refugio y por inspirarme a ser la mejor versión de mí misma. Gracias al NT, por ser la familia más grande que tengo. A mis tres gaviotas y a mi polluelo favorito del mundo. Y a toda la familia JOSCO. Gracias a mi equipo de remo y mis compañeros de montaña por evitar que el sedentarismo me haya matado ya. Gracias a la gente que ha llegado a mi vida estos últimos meses. En especial muchas gracias a Cristian por dejarme verte evolucionar, estoy infinitamente orgullosa de ti. Gracias a Pablo por ser el mejor compañero de cafés y biblioteca de toda la Marina Baixa y por calmar las tempestades de mi mente con tu voz y tu silencio. Y, por supuesto a Juan, por sacarme de la zona de confort y enseñarme otra parte del mundo que me queda por descubrir.

Gracias a ti Phy por seguir intentándolo siempre y no darte por vencida.

Resumen

El trabajo realizado durante esta Tesis Doctoral se puede dividir en dos bloques. En el primero se aborda el diseño, síntesis y caracterización de un sensor basado en ciclodextrinas funcionalizadas con un fluoróforo para la detección de explosivos peroxídicos. Los explosivos peroxídicos para los que el sensor es eficiente son el diperoxido de diacetona (DADP) y triperóxido de triacetona (TATP).

El segundo bloque está dedicado al diseño, síntesis y evaluación de sensores cromo-/fluorogénicos para la detección de distintos neurotransmisores. Este bloque se ha dividido en tres capítulos los cuales tratarán de la detección de distintos neurotransmisores a partir de diferentes sondas sensoras.

Así, en el primer capítulo de este bloque se desarrolla un sensor de monóxido de carbono a partir de un precursor de cumarina que en presencia de éste da lugar a la aparición de fluorescencia.

En el segundo capítulo de este bloque se aborda el estudio de un sistema quimiosensor basado en nanopartículas de oro funcionalizadas con ciclodextrinas para detectar la presencia de serotonina en medios acuosos a bajas concentraciones de serotonina, detectándose ésta a través de cambios en el espectro visible.

Por último, en el tercer capítulo se aborda el diseño y síntesis de distintos quimiosímetros basados en BODIPYs, que son moléculas altamente fluorescentes, para la detección de catecolaminas: dopamina, adrenalina y noradrenalina.

Resum

El treball realitzat durant esta Tesi Doctoral es pot dividir en dos blocs. En el primer s'aborda el disseny, síntesi i caracterització d'un sensor basat en ciclodextrines funcionalitzades amb un fluorófor per a la detecció d'explosius peroxídics. Els explosius peroxídics per als quals el sensor és eficient són el diperoxid de diacetona (DADP) i triperóxid de triacetona (TATP).

El segon bloc està dedicat al disseny, síntesi i avaluació de sensors cromo-/fluorogénics per a la detecció de diferents neurotransmissors. Este bloc s'ha dividit en tres capítols els quals tractaran de la detecció de diferents neurotransmissors a partir de diferents sondes sensores.

Així, en el primer capítol d'este bloc es desenvolupa un sensor de monòxid de carboni a partir d'un precursor de cumarines que en presència d'este dona lloc a l'aparició de fluorescència.

En el segon capítol d'este bloc s'aborda l'estudi d'un sistema quimiosensors basats en nanopartícules d'or funcionalitzades amb ciclodextrines per a detectar la presència de serotonina en medis aquosos a baixes concentracions de serotonina, detectant-se esta a través de canvis en l'espectre visible.

Finalment, en el tercer capítol es van estudiar diferents quimiodosímetres basats en BODIPYs, molècules altament fluorescents, per a la detecció de catecolamines: dopamina, adrenalina i noradrenalina.

Abstract

The work carried out during this Doctoral Thesis can be divided into two blocks. The first one deals with the design, synthesis and characterization of a sensor based on cyclodextrins functionalized with a fluorophore for the detection of peroxidic explosives. The peroxidic explosives for which the sensor is efficient are diacetone diperoxide (DADP) and triacetone triperoxide (TATP).

The second block is dedicated to the design, synthesis and evaluation of chromo-/fluorogenic sensors for the detection of different neurotransmitters. This block has been divided into three chapters which will deal with the detection of different neurotransmitters from different sensor probes.

Thus, in the first chapter of this block a carbon monoxide sensor is developed from a coumarin precursor that in the presence of carbon monoxide gives rise to the appearance of fluorescence.

The second chapter of this block deals with the study of a chemosensor system based on gold nanoparticles functionalized with cyclodextrins to detect the presence of serotonin in aqueous media at low concentrations of serotonin, which is detected through changes in the visible spectrum.

Finally, in the third chapter, different chemodosimeters based on highly fluorescent BODIPYs, were studied for the detection of catecholamines: dopamine, adrenaline and noradrenaline.

Abreviaturas

°C	Grados centígrados
¹ H-RMN	Resonancia magnética nuclear de protón
¹³ C-RMN	Resonancia magnética nuclear de carbono
α-CD	α-Ciclodextrina
β-CD	β-Ciclodextrina
γ-CD	γ-Ciclodextrina
φ	Rendimiento cuántico de fluorescencia
Abs	Absorbancia
AuNPs	Nanopartículas de oro
BODIPY	4,4-Difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno
CCF	Cromatografía de capa fina
CD/CDs	Ciclodextrina/ Ciclodextrinas
CDI	N,N'-carbonildiimidazol
Cys	Cisteína
d	Doblete
DADP	Diperóxido de diacetona
DCM	Diclorometano
dd	Doble doblete
DDQ	2,3-Dicloro-5,6-Diciano-1,4-Benzoquinona
DLS	Dynamic Light Scattering
DMF	N,N-dimetilformamida
DMSO-	Dimetilsulfóxido deuterado
d ₆	
DSP	Succinimidilo
eq.	Equivalentes
FTIR	Espectroscopía de infrarrojos de transformada de Fourier
GSH	Glutación
h	Hora
Hcy	Homocisteína
IR	Infrarrojo
J	Constante de acoplamiento RMN
LOD	Límite de detección
m	Multiplete
Min	Minuto
NALC	N-acetil-L-cisteína
NP	Nanopartículas

NT	Neurotransmisor
PBS	Tampón fosfato Salino
$\text{Pd}(\text{OAc})_2$	Acetato de paladio
PETN	Tetranitrato de pentaeritritol
Ppb	Partes por billón
Ppm	Partes por millón
q	Quintuplete
RMN	Resonancia magnética nuclear
Rpm	Revoluciones por minuto
r.t.	Temperatura ambiente
S	Singlete
T	Triplete
TATP	Trióxido de triacetona
TFA	Ácido trifluoroacético
TFAA	Anhídrido trifluoroacético
TEM	Microscopio electrónico de transmisión
TNT	Trinitrotolueno
UV-Vis	Ultravioleta-visible
λ_{abs}	longitud de onda de absorción
λ_{em}	longitud de onda de emisión
λ_{exc}	longitud de onda de excitación

ÍNDICE

Capítulo 1: Introducción general.....	1
1.1. Química supramolecular y quimiosensores	3
1.2 Mecanismos de señalización de los sensores ópticos.....	8
1.3 Explosivos peroxídicos.....	15
1.4 Neurotransmisores.....	18
1.4.1 Monóxido de carbono	20
1.4.2 Serotonina	22
1.4.3 Catecolaminas: dopamina, adrenalina y noradrenalina ...	23
Capítulo 2: Objetivos.....	25
Capítulo 3: Detección fluorogénica de explosivos peroxídicos empleando ciclodextrinas funcionalizadas con derivados de dansilo	28
3.1. Introducción	29
3.2 Objetivos	38
3.3 Resultados y discusión	40
3.3.1. Síntesis de los explosivos peroxídicos	40
3.3.2 Estudios previos de complejación de los explosivos peroxídicos con ciclodextrina.....	42
3.3.3 Diseño y síntesis de los quimiosensores fluorescentes	44
3.3.4 Evaluación de la sensibilidad y selectividad de los quimiosensores en la detección de TATP y DADP.....	53
3.4. Conclusiones.....	60
3.5. Procedimiento experimental	62
Capítulo 4: Quimiodosímetro para detección fluorogénica de monóxido de carbono, basado en una reacción de carbonilación catalizada por paladio	74
4.1 Introducción	76
4.1.1 Detección de monóxido de carbono	76
4.1.2. Cumarinas.....	77

4.1.2.1. Aplicaciones de cumarinas como sondas fluorescentes.	79
4.1.2.2 Síntesis de cumarinas mediante reacciones de carbonilación	82
4.2 Objetivos	86
4.3 Resultados y discusión	88
4.3.1 Síntesis de 2-vinilfenoles	88
4.3.1 Estudio del empleo de los 2-vinilfenoles 18 y 23 y Pd(II) como posibles sondas para la detección de CO.	93
4.3.2 Segunda aproximación al diseño de un quimiodosímetro de CO: Empleo de un complejo preformado entre el 2-vinilfenol, Pd(II) y fenantrolina.	100
4.3.2.1 Síntesis de los complejos.	101
4.3.2.2 Ensayos del empleo de los complejos 28 y 29 como posibles sondas para la detección fluorescente de CO.	102
4.4 Conclusiones.	110
4.5 Procedimiento experimental.	112
4.5.1 Síntesis de moléculas precursoras	112
4.5.2 Procedimiento para la generación de CO	119
4.5.3 Ensayos de detección de CO	120
Capítulo 5: Quimiosensores para la detección colorimétrica de serotonina basados en nanopartículas de oro funcionalizadas con ciclodextrinas	122
5.1. Introducción	124
5.1.1. Síntesis y funcionalización de las AuNPs	126
5.1.2. Propiedades de las nanopartículas de oro.	129
5.1.3. Aplicaciones de las AuNPs en detección colorimétrica.	132
5.2 Objetivos	138
5.3 Resultados y discusión	140

5.3.1 Funcionalización de las ciclodextrinas	140
5.3.2 Síntesis y funcionalización de nanopartículas de oro	148
5.3.3 Estudio de la interacción de las AuNPs con neurotransmisores	154
5.4 Conclusiones.....	164
5.5 Procedimiento experimental.....	166
5.5.2 Síntesis.....	167
5.5.3 Síntesis de nanopartículas de oro estabilizadas con citrato (AuNPs).....	171
5.5.4 Procedimiento general de funcionalización de las AuNPs	171
5.5.5 Ensayos de reconocimiento y detección.....	172
Capítulo 6: Detección fluorogénica de catecolaminas empleando derivados de BODIPY.....	174
6.1. Introducción	176
6.1.1. Estructura y síntesis de BODIPYs	177
6.1.2 Aplicaciones de derivados de BODIPY en detección	181
6.2 Objetivos	188
6.3 Resultados y discusión	190
6.3.1 Diseño del dosímetro	190
6.3.2 Primera aproximación	192
6.3.3 Segunda aproximación: empleo de espaciadores entre el grupo aldehído y el núcleo de BODIPY.....	198
6.3.4 Tercera aproximación: Funcionalización del BODIPY con un éster de N-hidroxisuccinimida para la formación amidas con las catecolaminas.....	206
6.3.5 Ensayos de funcionalización del BODIPY con un ácido fenilborónico	210
6.3.6 Cuarta aproximación: Introducción de un ácido fenilborónico en la posición <i>meso</i> del núcleo de BODIPY.....	214

6.3.7 Estudios de fluorescencia de los BODIPYs 63 y 64 en presencia de dopamina y otros dioles y aminas.	218
6.4 Conclusiones.....	222
6.5 Procedimiento experimental.....	224
7. Bibliografía	242

Capítulo 1: Introducción general

1.1. Química supramolecular y quimiosensores

La Química Supramolecular surge, como tal, a raíz de las investigaciones Donald J. Cram, Jean-Marie Lehn y Charles J. Pedersen, que recibieron por ello el Premio Nobel en 1987.¹⁻³ La química supramolecular se puede definir como la parte de la química que estudia la estructura y propiedades de las “supramoléculas”, es decir, de las entidades químicas organizadas formadas por dos o más moléculas que se encuentran unidas por enlaces no covalentes. Estas interacciones no covalentes incluyen enlaces de hidrógeno, enlaces de coordinación con metales, fuerzas hidrofóbicas, fuerzas de Van der Waals, interacciones π - π , interacciones electrostáticas, etc. que provocan unas propiedades distintas a las moléculas individuales.⁴

Una de las aplicaciones más relevantes de la Química Supramolecular es el diseño, síntesis y evaluación de sensores moleculares (quimiosensores) y/o sondas moleculares o dosímetros (quimiodosímetros). Los quimiosensores se pueden definir como aquellas moléculas o agregaciones supramoleculares capaces de reconocer la presencia de un analito de forma selectiva y reversible (de forma irreversible en el caso de un quimiodosímetros) provocando un cambio simultáneo de una o más propiedades físicas observables del sistema. En esta tesis nos centraremos en que el reconocimiento molecular se produzca con un cambio en sus propiedades ópticas: color o fluorescencia (quimiosensores y quimiodosímetros cromofluorogénicos) (Figura 1).⁵

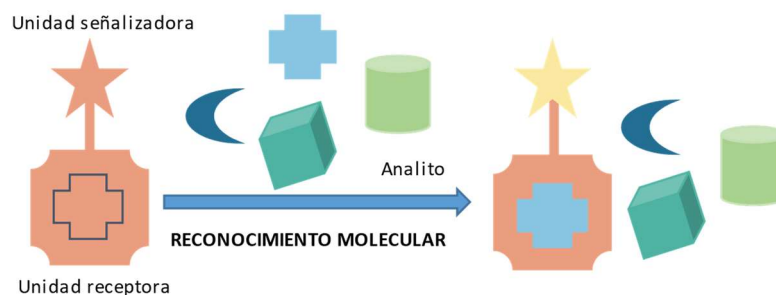


Figura 1: Representación esquemática del reconocimiento molecular selectivo.

En general, todo quimiosensor consta de dos subunidades: una parte de la molécula que produce el reconocimiento específico de un analito, discriminando entre diferentes sustratos (unidad receptora), y otra parte que es capaz de convertir el fenómeno del reconocimiento en una señal física observable y cuantificable (unidad señalizadora).^{6,7} Los quimiosensores ópticos, cromo-/fluorogénicos, ofrecen muchas ventajas sobre otros métodos analíticos clásicos de detección, ya que la instrumentación que requieren es simple, y más económica, se necesita pequeñas cantidades de muestra y, en algunos casos, la detección puede producirse *in situ*.⁸ En el caso de sensores colorimétricos, los cambios de color pueden observarse a simple vista y pueden ser utilizados para determinaciones cualitativas rápidas. En el caso de sensores fluorogénicos, la sensibilidad es muy alta y pueden conseguirse límites de detección realmente bajos.

A la hora de diseñar un quimiosensor óptico podemos encontrarnos con tres aproximaciones diferentes (Figura 2), la elección de una u otra dependerá de varios factores como la selectividad, la naturaleza de la interacción con el analito o el esfuerzo sintético que requiera, entre otros:

- **Aproximación de la unidad receptora-unidad señalizadora:** En esta aproximación ambas unidades están covalentemente unidas en el quimiosensor. La interacción de la unidad receptora con el analito provoca cambios en las propiedades electrónicas de la unidad señalizadora y como consecuencia un cambio en el color o en la emisión de fluorescencia.⁹⁻¹²
- **Aproximación del desplazamiento:** En el quimiosensor la unidad de reconocimiento y la unidad de señalización forman un complejo supramolecular, de manera que la interacción con el analito lleva consigo el desplazamiento simultáneo de la unidad de señalización alojada en el centro de reconocimiento, provocando un cambio observable en sus propiedades físicas.^{13,14}
- **Aproximación del quimiodosímetro:** en esta aproximación el analito produce una reacción química específica e irreversible con el sensor que provoca generalmente la formación o ruptura de enlaces covalentes dando lugar a una nueva especie con propiedades ópticas distintas. En este caso ya no se habla de quimiosensor sino de quimiodosímetro o sonda molecular.^{15,16}

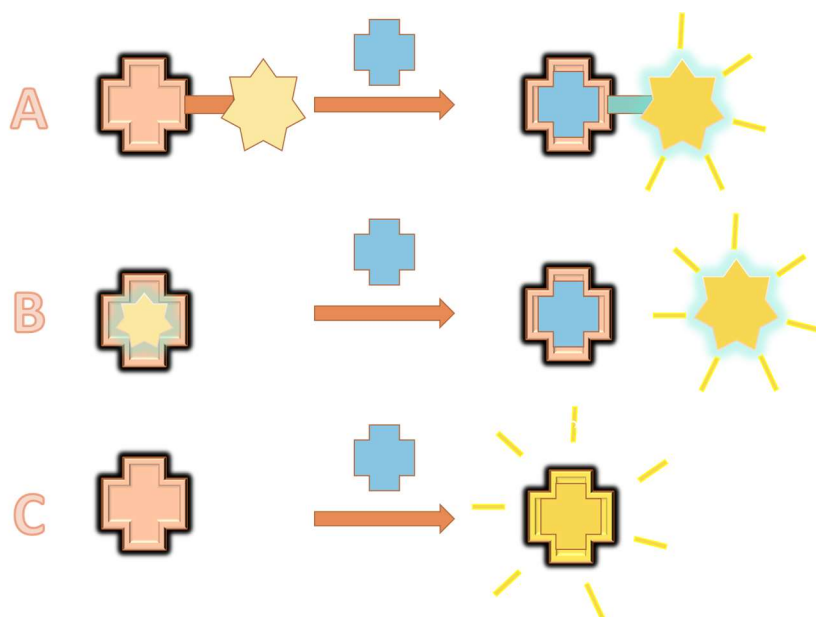


Figura 2: Representación esquemática de las tres formas de aproximación del quimiosensor óptico.

Aunque en la literatura podemos encontrar muchos ejemplos de cada tipo, vamos a ilustrarlos con un solo ejemplo de cada aproximación.

En nuestro grupo hemos desarrollado un quimiosensor fluorogénico selectivo para cationes trivalentes (Fe^{3+} , Cr^{3+} , Al^{3+}), siguiendo la aproximación unidad receptora-unidad señalizadora, que utiliza una unidad señalizadora derivada de fluoresceína y una unidad receptora basada en un derivado del 2-aminoetanol (Figura 3). El cambio en las propiedades fluorescentes del sensor en presencia de los cationes trivalentes se atribuye a los cambios de polaridad del colorante por un aumento de la deslocalización electrónica del sistema dador-aceptor después del proceso de complejación. Los cationes

mono y divalentes no dieron respuesta y se consiguieron límites de detección de 0.2 μM .¹⁷

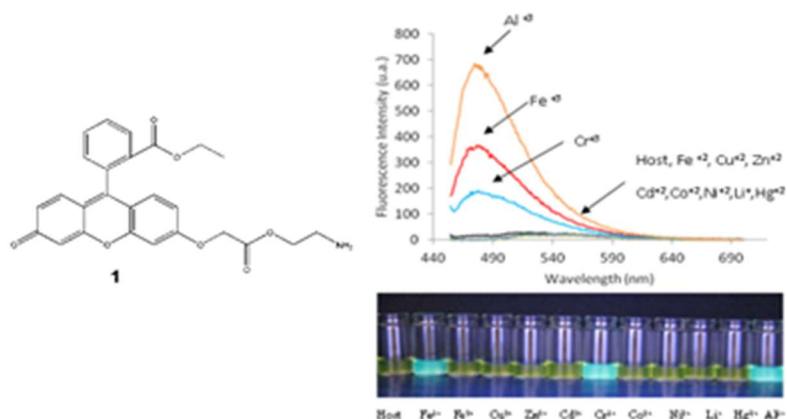


Figura 3: Ligando selectivo para el reconocimiento de cationes trivalentes.¹⁷

Un quimiosensor, basado en la aproximación por desplazamiento es el complejo calix[4]pirrol-4-nitrofenolato sintetizado por P. A. Gale y J. L. Sessler que se muestra en la Figura 4.¹⁸ El complejo supramolecular de partida es incoloro, mientras que en presencia del ion fluoruro, éste desplaza el ion 4-nitrofenolato a la disolución dando lugar a una fuerte coloración amarilla. Este cambio de coloración, indica que el proceso de reconocimiento de iones fluoruro se ha producido.

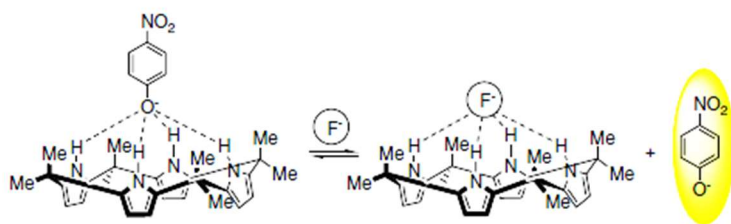


Figura 4: Quimiosensor molecular por desplazamiento para iones fluoruro.¹⁸

Por último, en nuestro grupo de investigación se desarrolló un quimiodosímetro consistente en una unidad de BODIPY, concretamente el 2-formil-8-fenil-1,3,5,7-tetrametilborodipirrometeno, que es capaz de formar oximas por reacción con hidroxilamina, en condiciones muy suaves, en presencia de NO_2 (Figura 5). La transformación del aldehído en su oxima provoca un cambio tanto de color como de fluorescencia en el BODIPY. Este sensor se puede soportar sobre una membrana de óxido de poliestireno y permite detectar la presencia de NO_2 en cantidades de 1 ppm.¹⁹

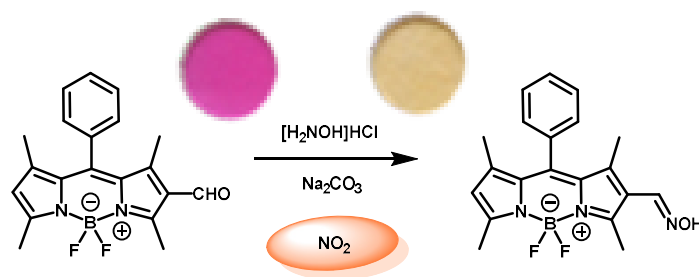


Figura 5: Detección de NO_2 en aire mediante la formación de oximas.¹⁹

1.2 Mecanismos de señalización de los sensores ópticos

Como se ha descrito anteriormente, los quimiosensores ópticos representan un grupo de sensores químicos en los que la radiación electromagnética se utiliza como señal macroscópica del reconocimiento del analito. El sensor óptico puede basarse en varios principios ópticos (absorbancia, reflectancia, luminiscencia,

fluorescencia), cubriendo diferentes regiones de los espectros (UV, visible, IR, NIR). La propiedad física que se modifica no solo es la intensidad de la luz absorbida o emitida, sino también otras propiedades relacionadas, como la vida media del estado excitado, índice de refracción, difracción, etc. Sin embargo, para las aplicaciones de sensores, los métodos más comúnmente aplicados en la detección óptica son los basados en la absorción o emisión de luz.

El color es una percepción visual que se genera en el cerebro para interpretar las señales nerviosas percibidas por los fotorreceptores de la retina ocular. Cada superficie iluminada absorbe algunas de las ondas electromagnéticas que recibe y refleja las demás. Las ondas reflejadas son capturadas por la retina e interpretadas por el cerebro como colores. Las longitudes de onda visibles cubren un rango de 400 a 800 nm aproximadamente (Figura 6).

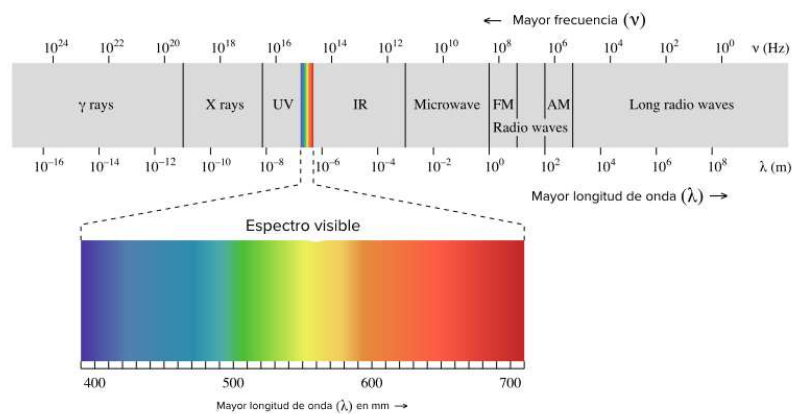


Figura 6: El espectro electromagnético.

La absorción de radiación ultravioleta o visible puede dar lugar a la transición de electrones entre el estado fundamental y los estados excitados de los átomos y/o moléculas.²⁰ Estos electrones, cuando se les imparte energía en forma de radiación de luz, se excitan desde el orbital molecular ocupado más alto (HOMO) hasta el orbital molecular desocupado más bajo (LUMO) y la especie resultante se conoce como estado excitado o estado antienlazante. La mayor parte de la absorción en la espectroscopia UV-Vis en las moléculas orgánicas se produce debido a la transición de electrones $\pi \rightarrow \pi^*$ o las transiciones de electrones $n \rightarrow \pi^*$. El resto de las transiciones resultan demasiado energéticas (Figura 7).

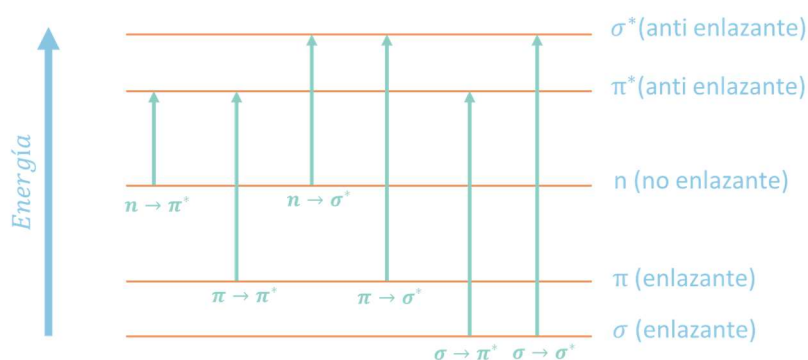


Figura 7: Posibles transiciones electrónicas en las moléculas orgánicas.

Los cambios de absorción UV-Vis como mecanismo de señalización se han utilizado ampliamente porque requieren el uso de equipamiento muy barato o ningún equipo, ya que en muchos casos los cambios de color pueden detectarse a simple vista. Los compuestos orgánicos que se colorean al absorber radiación electromagnética en

el rango visible se han estudiado exhaustivamente sobre todo para poder relacionar la estructura química y el color en los colorantes orgánicos. Muchos colorantes contienen enlaces π en sistemas conjugados, y la distancia energética entre HOMO y LUMO es fundamental para determinar su color. Está bien establecido que cuanto más extendido es el sistema conjugado, más pequeña es la diferencia entre los estados fundamental y excitado, lo que resulta en un cambio de menor energía y la banda de absorción se produce a mayores longitudes de onda.²¹

La longitud de onda de absorción se puede modificar anclando grupos donantes de electrones ($\text{-NR}_1\text{R}_2$, -NHR , -NH_2 , -OH , -OMe , etc.) o aceptores de electrones (-NO_2 , $\text{-SO}_3\text{H}$, -SO_3^- , -COOH , -CN , etc.) al sistema conjugado. Cuando tanto un grupo dador de electrones como un grupo aceptor de electrones están conectados entre sí, a través de un sistema conjugado en una determinada molécula, se puede observar en su espectro de absorción UV-Vis una banda de transferencia de carga (CT), que suele ser intensa y aparecer a longitudes de onda mayores (menor energía). Eso es importante en relación con el diseño de sensores cromogénicos, ya que la interacción del analito con los grupos dadores o aceptores en esos sistemas afecta la posición de la banda de transferencia de carga dando como resultado una modulación de color.

Con respecto a la espectroscopia de fluorescencia, las imágenes de fluorescencia y los indicadores de fluorescencia son hoy en día herramientas indispensables en varios campos de la ciencia y la medicina modernas, incluidos el diagnóstico clínico, la biotecnología,

la biología molecular y la bioquímica, la ciencia de los materiales y la química analítica y ambiental¹²²⁻²⁴ debido a su alta sensibilidad y como consecuencia de sus bajos límites de detección, la viabilidad comercial y su capacidad de detección *in vivo*.²⁵

En la espectroscopía de fluorescencia nos centraremos en el modo de emitir la radiación absorbida desde el estado excitado para volver al estado fundamental S_0 como se muestra en el diagrama de Jablonski (Figura 8). Existen dos vías luminiscentes para la disipación de energía desde un estado excitado: la fosforescencia (donde el estado excitado es de tipo triplete y T_1 y S_0 tienen distinta multiplicidad) y la fluorescencia (donde el estado excitado es de tipo singlete y S_1 y S_0 tienen la misma multiplicidad). Estos dos procesos de relajación de un estado excitado al estado fundamental son radiativos, pero también existen otros mecanismos que no lo son, como la conversión interna (Internal Conversion, IC), el cruce de sistemas (Intersystem Crossing, ISC) o la relajación vibracional (Vibrational Relaxation, VR), mediante los cuales la molécula vuelve a su estado fundamental sin emitir radiación.

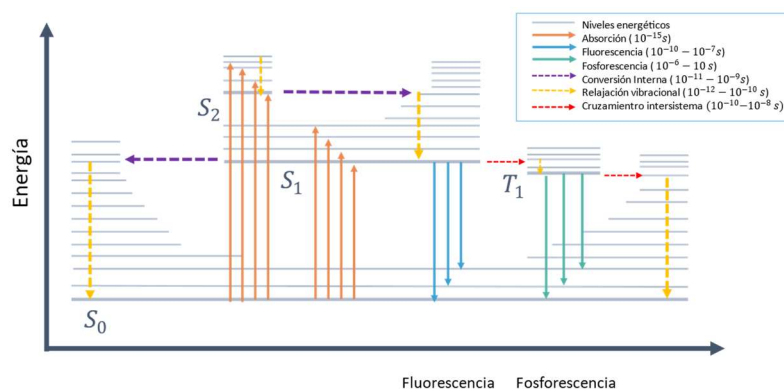


Figura 8: Diagrama de Jablonski.

Existen diferentes mecanismos fotoluminiscentes involucrados en la detección fluorescente de analitos; los más utilizados son:²⁶

- **Transferencia de electrones fotoinducida (PET):** como se describió anteriormente, la fluorescencia en una molécula se observa, cuando un electrón excitado en el orbital LUMO, se relaja al orbital HOMO, liberando el exceso de energía en forma de luz. Pero en el caso del PET (Figura 9) la presencia de otra molécula, o de un grupo funcional de la misma molécula, no conectado electrónicamente con el fluoróforo, que tenga orbitales cercanos en energía a los estados fundamental y excitados del núcleo fluorescente de la molécula estudiada, puede dar lugar a la transferencia de un electrón desde este orbital a un orbital semiocupado del fluoróforo excitado, lo que produce una desactivación no radiativa del estado excitado y conduce a una "extinción" de la fluorescencia (o quenching).^{15,27}

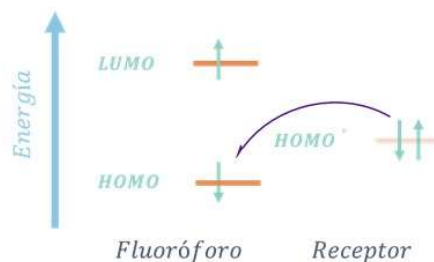


Figura 9: Transferencia de electrones en un proceso PET.

- **Transferencia de Carga Fotoinducida (PCT):** la excitación electrónica implica cierto grado de transferencia de carga, pero en fluoróforos que contienen a la vez grupos donantes y aceptores de electrones, esta transferencia de carga puede ocurrir a largas distancias y asociarse con cargas de momento dipolar importantes, lo que hace que el proceso sea particularmente sensible al entorno del fluoróforo.^{28,29}

- **Formación de Excímeros:** un excímero se puede definir como un complejo formado por la interacción de un fluoróforo en estado excitado con otro fluoróforo de la misma estructura en su estado fundamental.^{6,30} Comparado con el monómero, el excímero típicamente proporciona una banda de emisión amplia y desplazada al rojo. En algunos casos, ambas emisiones (monómero y excímero) se observan simultáneamente.³¹

- **Transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET):** es un proceso no radiativo de transferencia de energía entre un par de fluoróforos diferentes: uno actúa como donante de energía

en su estado excitado y el otro, como aceptor. El donante vuelve al estado fundamental electrónico transfiriendo su energía al aceptor y la emisión observada proviene del fluoróforo aceptor.³²

En resumen, un sensor óptico consiste en un compuesto que incorpora un sitio de unión y un mecanismo de comunicación. En presencia de la molécula diana o analito, el receptor modifica sus propiedades electrónicas mostrando cambios de color y/o fluorescencia.

1.3 Explosivos peroxídicos

Aunque el terrorismo no es nuevo para la comunidad internacional el aumento de los ataques en los últimos años ha convertido la detección de explosivos escondidos en una cuestión de suma importancia. El uso de explosivos ha aumentado tanto en grupos terroristas que ha provocado la demanda de métodos rápidos, fiables y efectivos para la detección de éstos. La estructura química de estas sustancias es muy variada: nitroaromáticos, sales de urea, nitronaminas, ésteres de nitrato, entre otros. Pero en esta tesis nos vamos a centrar en los explosivos peroxídicos.

En atentados como los del “La bomba del zapato” en el vuelo 63 de la compañía American Airlines en 2001, los atentados bomba en el metro y autobuses de Londres en 2005 o los atentados en Sri Lanka en 2019 el explosivo utilizado fue el triperóxido de triacetona (TATP).

El TATP es un explosivo perteneciente al grupo de explosivos peroxídicos y, aunque su poder explosivo no es excesivamente elevado, es uno de los explosivos conocidos más sensibles y fáciles de preparar, a partir de precursores asequibles de manera sencilla.

Los explosivos peroxídicos son aquellos explosivos que contienen en su estructura uno o más enlaces peroxídicos. En este grupo de explosivos destacan el triperóxido de triacetona (TATP) y el diperóxido de diacetona (DADP) ambos sencillos de sintetizar a partir de sustancias accesibles y de bajo coste (acetona, peróxido de hidrógeno y un ácido en cantidades catalíticas) (Figura 10) .

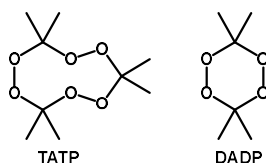


Figura 10: Estructuras TATP y DADP

Atendiendo a su susceptibilidad de ignición (o sensibilidad de iniciación) el TATP es considerado un explosivo primario. Los explosivos primarios, más sensibles que los secundarios (que pueden ser utilizados como detonantes), son utilizados como iniciadores. En concreto, el TATP tiene un poder explosivo similar al TNT: 10 g dan lugar a una expansión de 250 cm³ en el Test de Trauzl en comparación con 300 cm³ del conocido TNT.³³

A pesar de su potencial como explosivo, el TATP no es muy utilizado en el ámbito militar debido a su baja estabilidad química y su sensibilidad al estrés mecánico o la llama, además de su alta volatilidad (cerca de un 66% de pérdida de peso en 2 semanas a temperatura ambiente).³⁴

El TATP es el producto cinético de la reacción entre la acetona y el agua oxigenada, mientras que el DADP es el producto termodinámico. Por ello, en presencia de cantidades catalíticas de ácido, el TATP se acaba transformando en DADP. De hecho, el TATP al ser preparado en presencia de cantidades catalíticas de ácido da lugar espontáneamente al co-producto DADP.³⁵

En estudios posteriores a los atentados perpetrados con estos explosivos, como el de Casablanca en 2003,³⁶ se han encontrado mezclas de ambos compuestos. Esto hace interesante también la detección del DADP.

Tanto el TATP como el DADP pueden ser fácilmente camuflados ya que ambos son sólidos blancos, de aspecto no sospechoso, similares al azúcar e inodoros. Alguno de los productos en los cuales se pueden camuflar estos explosivos son: gel de baño, dentífrico, enjuague bucal, champú, colonia, detergente, güisqui o vinagre entre otros.³⁷ Como consecuencia directa de esto se ha prohibido embarcar con productos susceptibles de camuflar explosivos en cantidades por encima de unos límites establecidos.

A diferencia de otros explosivos convencionales, tanto el TATP como el DADP no poseen ni grupos nitro ni elementos metálicos lo que dificulta su detección mediante métodos convencionales. Además, tampoco exhiben bandas significativas en el espectro de fluorescencia o UV-Vis, lo que dificulta su detección mediante estas técnicas analíticas. Por todo ello, el desarrollo de métodos rápidos y sencillos de detección de estas sustancias es de enorme interés.

1.4 Neurotransmisores

Los neurotransmisores son los mensajeros químicos que permiten transmitir las señales eléctricas de las neuronas. Por lo general, se considera que una sustancia es un neurotransmisor si se sintetiza en la neurona, se encuentra en la terminación presináptica y se libera para unirse a un receptor específico en la célula postsináptica, dando lugar a un efecto biológico y, finalmente, tiene un mecanismo específico para la terminación de su acción. Varios tipos de moléculas, desde gases simples, como el monóxido de nitrógeno (NO), hasta péptidos complejos, como el péptido activador del adenilato ciclasa hipofisaria, cumplen estos criterios y son considerados neurotransmisores.

Los neurotransmisores pueden actuar excitando una determinada acción o como inhibidores, es más, el mismo neurotransmisor puede actuar de una forma u otra dependiendo del contexto ya que pueden interactuar con diferentes receptores.

El primer neurotransmisor que se identificó fue la acetilcolina en 1921 por Otto Loewi y, desde entonces se han descrito más de 100 estructuras diferentes. Según su estructura química se pueden clasificar en varios grupos:

- **Aminas biógenas:** por ejemplo, dopamina, epinefrina, norepinefrina, serotonina, histamina y acetilcolina.
- **Aminoácidos:** principalmente ácido glutámico, ácido aspártico, ácido γ -hidroxibutírico (GABA) y glicina.
- **Péptidos:** como vasopresina, somatostatina, neurotensina y encefalinas.
- **Neurotransmisores gaseosos:** de entre los que destacan el óxido nítrico, monóxido de carbono y sulfuro de hidrógeno.

Para mantener una función cerebral adecuada es necesaria una buena regulación del equilibrio entre la transmisión sináptica (comunicación entre las neuronas) de excitación o de inhibición, que serían el equivalente al acelerador y el freno, respectivamente, del sistema nervioso. Esta regulación tan precisa se logra con la liberación de las dosis adecuadas de neurotransmisores de uno u otro tipo en los puntos de contacto. Cuando ese equilibrio se rompe, aparecen patologías aparentemente tan diferentes como ansiedad, depresión, esquizofrenia, trastorno bipolar o del espectro autista. Alteraciones en el material genético como las duplicaciones pueden dar lugar a la pérdida o ganancia de la función de determinados genes que pueden afectar a ese equilibrio entre los neurotransmisores excitadores e inhibidores por la producción excesiva de proteínas.

En esta tesis nos centraremos en la detección de tres tipos de neurotransmisores en específico. El monóxido de carbono, la serotonina y las aminas biógenas dopamina, adrenalina y noradrenalina.

1.4.1 Monóxido de carbono

El monóxido de carbono (CO) es un gas inodoro e incoloro que es producido principalmente en la combustión parcial de compuestos que contienen carbono. Se trata de una molécula tóxica a altas concentraciones. Esta toxicidad es debida a que es capaz de unirse 200 veces más fuerte que el O_2 a la hemoglobina y la carboxihemoglobina formada ya no es capaz de transportar el oxígeno en la sangre. ³⁸

A pesar de su toxicidad, el cuerpo humano produce CO de manera endógena a través de la degradación de la hemoglobina (Figura 11).

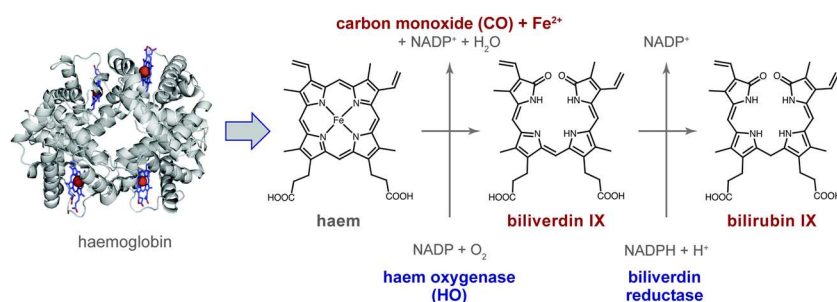


Figura 11: Degradación del grupo hemo de la hemoglobina.

La producción de CO desempeña un papel vital en muchas funciones fisiológicas de mamíferos, como los efectos

antiinflamatorios, antiapoptóticos, anticoagulantes, antihipertensivos y protectores de las células.³⁹ Además se describió que el CO también tiene un rol importante en la neurotransmisión.⁴⁰

La producción de CO en el hipotálamo ha sido asociada con la inhibición de la liberación de ciertas hormonas, mientras que en el cerebro se asocia con la inhibición en la captación de dopamina y glutamato que regulan el tono vascular, la presión arterial y es un factor protector de las neuronas durante la hipoxia, CO ha demostrado regular las vías de señalización de apoptosis en las células cultivadas . En niveles elevados puede contribuir a acelerar enfermedades como el Parkinson o disminuir la concentración de serotonina en las neuronas. Los niveles de CO se correlacionan también con la insuficiencia renal grave , procesos inflamatorios como rinitis alérgica, fibrosis quística, colitis ulcerosa o displasia broncopulmonar .

El porcentaje de carboxihemoglobina (CO-hb) en la sangre sigue siendo en la actualidad el mejor marcador predictivo para extrapolar la cantidad de CO presente en el cuerpo. Sobre esta base, los datos notificados hasta el momento indican que una cantidad de CO-Hb del 15-20%, en la mayoría de los casos, no es perjudicial y puede ser considerado como el "umbral biológico" para la tolerancia de CO en los seres humanos, más allá del cual es probable que se produzca una lesión grave mediada por CO.

1.4.2 Serotonina

La serotonina o 5-hidroxitriptamina (5-HT) (Figura 12) es el principal neurotransmisor del grupo de las indolaminas. Este neurotransmisor es sintetizado a partir del triptófano, un aminoácido esencial ya que no es fabricado por el cuerpo, por lo que debe ser aportado a través de la dieta. El nombre de serotonina viene de que se aisló por primera vez en suero, y su principal característica es su capacidad para causar un aumento de la presión arterial.

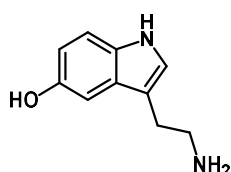


Figura 12: Estructura química de la serotonina o 5-hidroxitriptamina (5-HT).

La serotonina es comúnmente conocida como la hormona de la felicidad, porque los niveles bajos de esta sustancia se asocian a la depresión y la obsesión. Además de su relación con el estado de ánimo, la serotonina desempeña distintas funciones dentro del organismo, entre los que destacan: su papel fundamental en la digestión, el control de la temperatura corporal, su influencia en el deseo sexual o su papel en la regulación del ciclo sueño-vigilia.

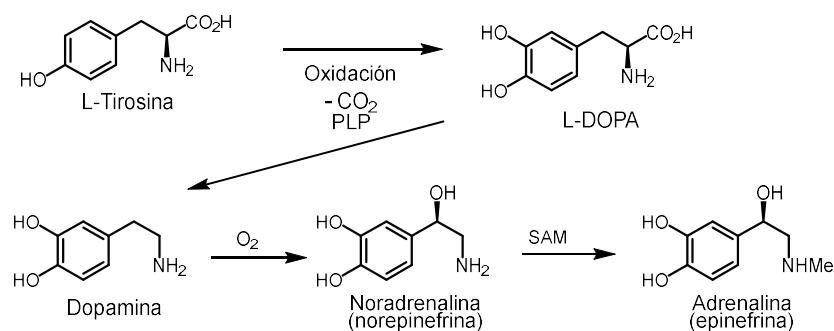
El exceso de serotonina puede provocar un conjunto de síntomas de distinta gravedad, pero en su justa medida, se cree que ayuda a combatir el estrés y la ansiedad. Además, hay maneras naturales de potenciar el poder de la serotonina sobre nuestro sistema

nervioso central, como, por ejemplo, hacer ejercicio moderado, ingerir alimentos compuestos de carbohidratos y/o proteínas...

Aunque se puede determinar los niveles de serotonina plaquetaria, serotonina sérica y serotonina urinaria resulta difícil correlacionarla con determinadas patologías. Los niveles normales de serotonina en sangre en individuos sanos son de entre 101 a 283 ng/mL.

1.4.3 Catecolaminas: dopamina, adrenalina y noradrenalina

Dentro también de las aminas biógenas nos encontramos un subgrupo denominado catecolaminas, por tener la agrupación catecol (1,2-dihidroxibenceno) en su estructura. Es este grupo sus representantes más destacados son la dopamina, adrenalina (o epinefrina) y noradrenalina (o norepinefrina). Todas ellas provienen del aminoácido tirosina que en primer lugar sufre una oxidación aromática para dar la L-DOPA (Esquema 1). Se ha determinado que la biosíntesis de catecolaminas se produce en distintos órganos del cuerpo.



Esquema 1: Biosíntesis de catecolaminas.

Las catecolaminas median en una gran variedad de funciones del sistema nervioso central, como el control motor, el cognitivo, la emoción, el procesamiento de la memoria y la modulación endocrina. La dopamina está implicada en las conductas adictivas y es la causante de las sensaciones placenteras. Sin embargo, entre sus funciones también encontramos la coordinación de ciertos movimientos musculares, la regulación de la memoria, los procesos cognitivos asociados al aprendizaje y la toma de decisiones. La adrenalina cumple tanto funciones fisiológicas (como la regulación de la presión arterial o del ritmo respiratorio y la dilatación de las pupilas) como psicológicas (mantenernos en alerta y ser más sensibles ante cualquier estímulo). La noradrenalina está implicada en distintas funciones del cerebro y se relaciona con la motivación, la ira o el placer sexual.

Las disfunciones en la neurotransmisión de catecolaminas se manifiestan en algunas enfermedades neurológicas y neuropsiquiátricas como Parkinson, Alzheimer, esquizofrenia o hiperactividad. El nivel de estos neurotransmisores, cambiantes en los fluidos biológicos, puede ser un marcador de varios trastornos neurológicos. Estos niveles suelen ser de 150-800 ng/L para la noradrenalina y entre 10 y 50 ng/L para la dopamina y adrenalina.

Capítulo 2: Objetivos generales

El objetivo general perseguido en la presente Tesis Doctoral es el diseño, síntesis y evaluación de quimiosensores y quimiodosímetros de distinta naturaleza para la detección óptica de diversas moléculas de interés. Concretamente, explosivos peroxídicos y neurotransmisores.

- De esta manera, y teniendo en cuenta el trabajo precedente del grupo de investigación en el campo de detección de explosivos, se decidió dedicar la primera parte de esta tesis a explorar el diseño, síntesis y evaluación de un quimiosensor fluorescente para la detección de explosivos peroxídicos, en concreto el diperoxido de diacetona (DADP) y el triperóxido de triacetona (TATP) empleando para ello ciclodextrinas funcionalizadas con un fluoróforo.

- El segundo objetivo, al que se dedicó esta tesis, consistió en el diseño síntesis y evaluación de quimiodosímetros para la detección óptica de neurotransmisores de distinta naturaleza. En particular:

- Quimiodosímetros para la detección fluorescente de monóxido de carbono, basados en la generación de cumarinas en presencia de este analito y Pd(II).
- Quimiosensores para la detección colorimétrica de serotonina, basados en nanopartículas de oro funcionalizadas con ciclodextrinas.
- Estudio del diseño de quimiodosímetros basados en un núcleo de BODIPY para la detección cromo- y/o fluorogénica de catecolaminas (dopamina, epinefrina y norepinefrina).

—

Capítulo 3: Detección fluorogénica de explosivos peroxídicos empleando ciclodextrinas funcionalizadas con derivados de dansilo

3.1. Introducción

Como ya se ha mencionado en la introducción general, la detección directa de TATP por medios convencionales es muy complicada. Aunque existen algunos métodos instrumentales para la detección de TATP como, por ejemplo, espectroscopia infrarroja⁴¹ espectrometría de masas,^{42,43} espectroscopía rotacional,⁴⁴ microbalanzas de cristal de cuarzo⁴⁵ o rayos X⁴⁶, estos métodos físicos resultan en general complejos, requieren mucho tiempo o un tratamiento previo de la muestra, además de un aparataje muy costoso.

Los métodos químicos de detección más desarrollados y con mejores resultados son los métodos indirectos. Estos métodos se basan en la detección del peróxido de hidrógeno generado en la descomposición del TATP. Alguno de estos métodos son ensayos quimiluminiscentes^{43,47} con sensores colorimétricos⁴⁸⁻⁵⁰ y dentro de éstos se han descrito varios arrays.⁵¹ En cambio, para la detección directa de TATP por métodos químicos solo se han publicado los dos sensores ópticos que recogemos a continuación.

Torroba *et al.* han desarrollado una membrana polimérica⁵² y unas nanopartículas de sílice⁵³ funcionalizadas con derivados de piperacina, donde la unidad señalizadora es perilenodiimida (Figura **13**). El proceso de detección del TATP se produce por la oxidación que provoca este explosivo sobre el quimiosensor y que da lugar a un cambio importante en sus propiedades fluorescentes debido a un cambio en la banda de transferencia de carga, tanto en disolución como en fase gas.

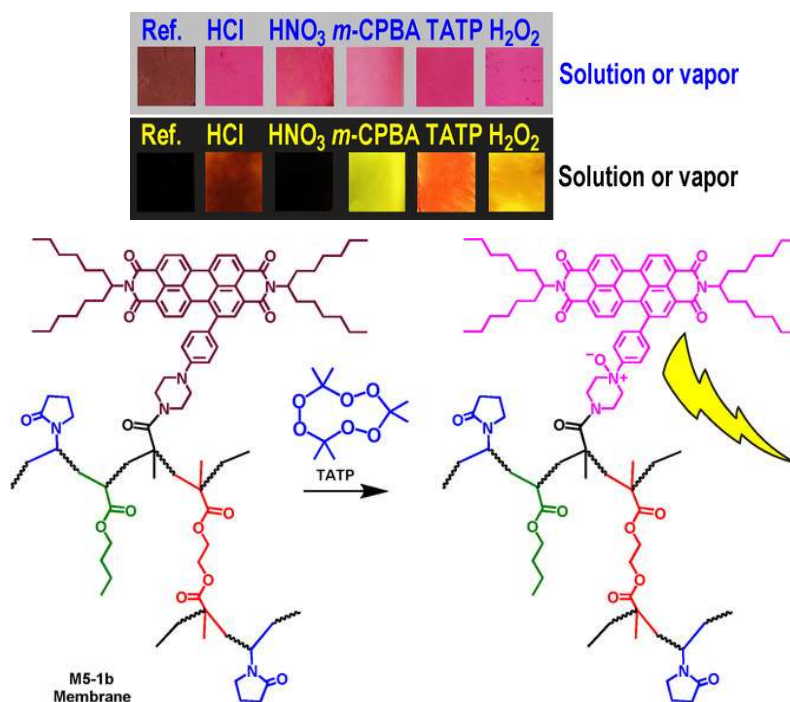


Figura 13: Mecanismo de oxidación propuesto para la detección de TATP con el sensor polimérico.

En el año 2020, Martínez-Máñez et al.⁵⁴ han reportado un material híbrido, consistente en nanopartículas mesoporosas de sílice, cargadas con un colorante (rutenio tris(bipiridina) o sulforodamina B) y “tapadas” con una puerta molecular que consiste en un aptámero/anticuerpo específico para los explosivos TATP, TNT y PETN (Figura 14). Este sistema lo incorporan a unas tiras reactivas que, en presencia de los respectivos explosivos, se abren liberando el colorante de su interior. El resultado es altamente específico y los LoD están en el orden de ppbs.

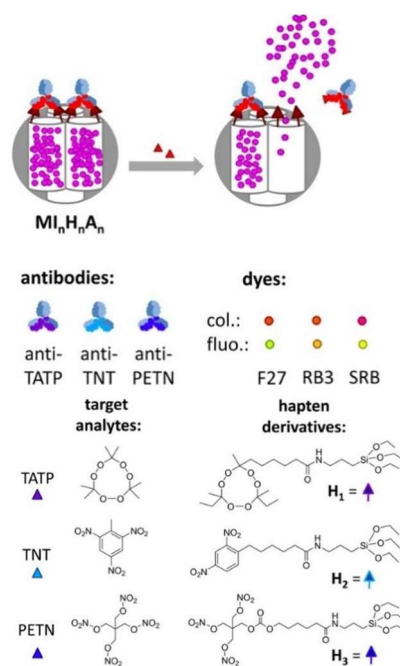


Figura 14: Principio operativo del sensor preparado para la detección selectiva de los explosivos TATP, TNT y PETN.

Ciclodextrinas

Las ciclodextrinas (CDs) son oligosacáridos macrocíclicos compuestos por 6, 7 u 8 unidades de D-glucopiranosas unidas por un enlace α -(1,4) y que se denominan α -, β - y γ -ciclodextrinas respectivamente (Figura 15).

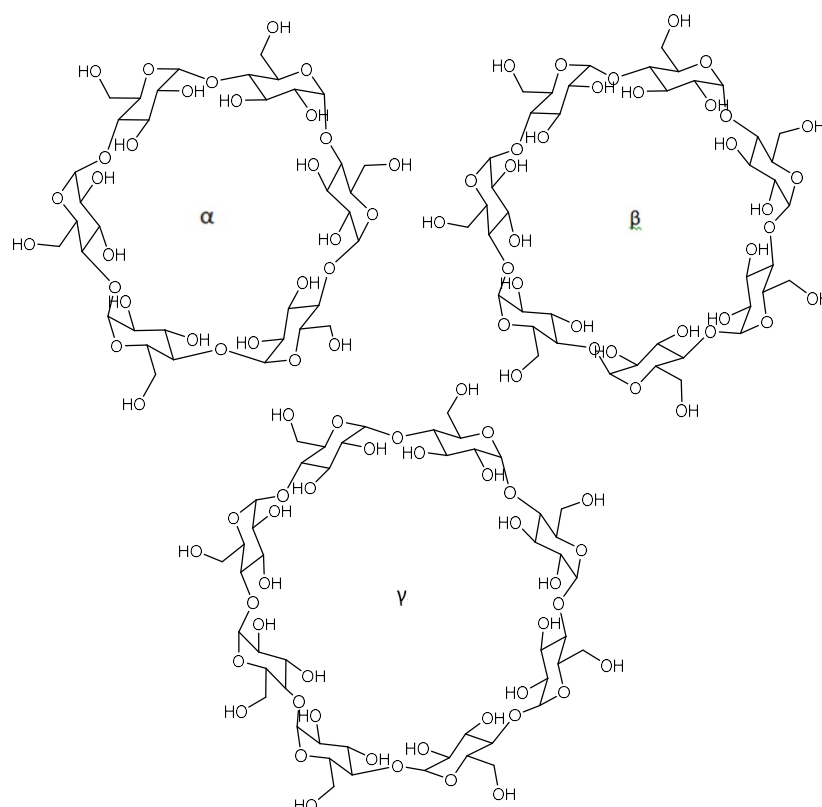


Figura 15: Estructura química del núcleo base de las ciclodextrinas.

Todas las características estructurales y fisicoquímicas de la α -, β - y γ -ciclodextrinas fueron descritas por primera vez en 1954,⁵⁵ pero no fue hasta 1980 cuando empezaron a utilizarse las ciclodextrinas a nivel industrial como moléculas encapsuladoras en la industria alimentaria o la cosmética.⁵⁶ Hoy en día existen muchos medicamentos que contienen complejos de ciclodextrinas para la encapsulación molecular de los fármacos hidrófobos y los inestables.⁵⁷

La ciclodextrina adopta forma de toroide como consecuencia de la conformación de silla que poseen las unidades de glucopiranosas. Los grupos hidroxilos primarios se orientan hacia la parte estrecha del

cono (cara primaria) mientras que los hidroxilos secundarios lo hacen hacia la parte ancha del cono (cara secundaria) (Figura 16).

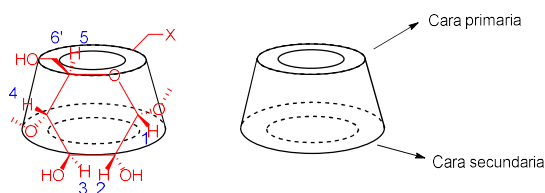


Figura 16: Estructura en forma de cono de las ciclodextrinas.

Como consecuencia de que los grupos hidroxilo libres están situados en el exterior de la superficie de los anillos, las ciclodextrinas son hidrófilas y solubles en agua. Su solubilidad es el resultado de la capacidad de interacción de dichos grupos hidroxilo con el medio acuoso, siendo mayor para la α -ciclodextrina y la γ -ciclodextrina. En el caso de la β -ciclodextrina su solubilidad en agua es menor debido a que los grupos hidroxilo del C2 de cada unidad de glucopiranososa forman puentes de hidrógeno intramoleculares con los grupos hidroxilo del C3 de la unidad de glucopiranososa adyacente. Estos puentes de hidrógeno disminuyen la posibilidad de dar lugar a puentes de hidrógeno con el disolvente lo cual provoca la disminución de la solubilidad en agua (14.5, 1.85 y 23.2 % m/v para la α -, β - y γ -ciclodextrina respectivamente). Las ciclodextrinas son también solubles en disolventes orgánicos apróticos fuertemente polares, como DMSO y DMF. Son estables en disoluciones neutras y básicas, pero se degradan lentamente a pH ácido y en estado sólido se descomponen por encima de 200 °C.

Una de las características principales de estas moléculas es su habilidad para formar complejos de inclusión en disoluciones

acuosas,⁵⁸ complejando en su interior moléculas lipofílicas del tamaño adecuado, en función de las características de cada una (Tabla 1).

Propiedades	α -CD	β -CD	γ -CD
N.º de unidades de glucopiranosas	6	7	8
Peso molecular	972	1135	1297
Solubilidad en agua a 25°C (g/L)	14.5	18.5	23.2
Diámetro externo (Å)	14.6±0.4	15.4±0.4	17.5±0.4
Diámetro interior (Å)	4.7-5.3	6.0-6.5	7.5-8.3
Altura del cono (Å)	7.9±0.1	7.9±0.1	7.9±0.1
Volumen de la cavidad (Å ³)	174	262	427

Tabla 1: Características de la α -, β - y γ -ciclodextrinas.⁵⁹

En los complejos de inclusión una molécula (guest) es incluida en el interior de la ciclodextrina (host). La cavidad interior de la ciclodextrina tiene un carácter lipofílico lo que da lugar a un microambiente en el cual pueden ser incluidas moléculas no polares de tamaño adecuado. Durante este proceso se forman y se rompen enlaces no covalentes.⁶⁰ La fuerza motora de la formación del complejo es la liberación, entrópicamente favorable, de moléculas de agua altamente ordenadas al exterior de la cavidad hidrofóbica. Las moléculas de agua son desplazadas por un sustrato hidrofóbico presente en la disolución disminuyendo así la energía global del sistema.

La unión entre la ciclodextrina y la molécula apolar se encuentra en un equilibrio dinámico. La proporción entre ciclodextrina ocupada y ciclodextrina libre en el equilibrio depende de la constante de unión del complejo “host-guest”.

Las moléculas capaces de formar complejos con las ciclodextrinas son muchas, como gases, compuestos alifáticos o compuestos aromáticos. La habilidad de las CDs para formar complejos de inclusión es función de factores claves como el volumen estérico, que depende del volumen relativo del interior de la ciclodextrina en comparación al de la molécula huésped y, también, de las interacciones entre los diferentes componentes del sistema (ciclodextrina, sustrato o disolvente).

Un ejemplo característico de moléculas que presentan el fenómeno de inclusión dentro de ciclodextrinas son los derivados de adamantano.⁶¹ Estos derivados forman en agua complejos de inclusión muy fuertes con la β -ciclodextrina ($\Delta G^\circ \approx -30$ kJ/mol). Esto es debido a que el adamantano encaja perfectamente en el interior de la cavidad de ciclodextrina y desplaza todas las moléculas de agua.⁶²

Gracias a esta interesante característica de su capacidad para formar complejos de inclusión estables con una amplia variedad de compuestos de distinto peso molecular, las ciclodextrinas han sido muy utilizadas en fenómenos de reconocimiento. Aunque la mayoría de los estudios realizados son con aplicaciones electroquímicas,⁶³ es conocido que el microentorno de los cromóforos y/o fluoróforos puede variar las propiedades de color y fluorescencia de éstos. Por lo cual, es posible formar un complejo de inclusión con un cromóforo y/o fluoróforo con características ópticas determinadas y que en presencia de un analito (guest) capaz de formar complejos más estables con la ciclodextrina, se produzca el desplazamiento del fluoróforo del interior al exterior de la cavidad, modificando así dichas propiedades. El mecanismo de actuación se describe en la Figura 17.⁶⁴

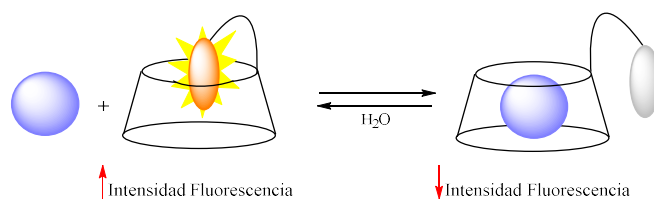


Figura 17: Modo de acción de un sensor de desplazamiento on-off.

En medio acuoso el resto fluorescente se encuentra en el interior de la cavidad apolar de la ciclodextrina, dando lugar a sus propiedades fluorescentes. En presencia de la molécula competitiva el fluoróforo es desplazado fuera de la cavidad, provocando un quenching de la fluorescencia. En general el fluoróforo en el interior de la cavidad presenta una emisión mayor que en su exterior cuando es desplazado al medio acuoso, y ello es indicativo de la presencia del analito.

Varios tipos de fluoróforos orgánicos unidos a ciclodextrinas han sido utilizados en la bibliografía para la construcción de quimiosensores (Figura 18). El grupo dansilo es uno de los más ampliamente utilizados⁶⁵ debido a sus propiedades espectroscópicas⁶⁶ y su afinidad por la β -ciclodextrina.⁶⁷

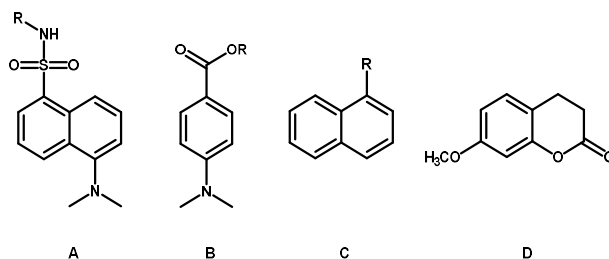


Figura 18: Algunos de los fluoróforos más utilizados en complejos de inclusión con ciclodextrinas. A) Dansilamidas B) 4-(dimetilaminobenzoatos) C) Derivados de naftaleno sustituidos en la posición 1 D) 7-metoxicroman-2-ona

Estudios previos han demostrado que la fluorescencia de la dansilamida es mayor en el medio hidrofóbico del interior de la cavidad de la ciclodextrina que en medio acuoso. En presencia de una molécula (“guest”) con mayor afinidad por la ciclodextrina, el dansilo es desplazado del interior de la cavidad de la ciclodextrina al exterior disminuyendo, por tanto, su fluorescencia. Además, el grupo dansilo presenta la ventaja de poder ser excitado a longitudes alrededor de 350 nm, donde muchos de los compuestos orgánicos no absorben. El grupo de Ueno⁶⁸ llevó a cabo estudios con ciclodextrinas monofuncionalizadas con un derivado de dansilo como sensores fluorescentes capaces de detectar algunos compuestos orgánicos como el ciclopentanol, ciclohexanol, ciclooctanol, alcanfor, 1-adamantol o mentol. Este sensor también mostró sensibilidad a la presencia de esteroides.

También han sido usados otros fluoróforos para formar complejos de inclusión con la β -CD como el dimetilaminobenzoilo,⁶⁹ naftilo⁷⁰ ó 7-metoxicumarina⁷¹ entre otros.

Por otro lado, las estructuras del TATP y del DADP han sido estudiadas por difracción de rayos X. Debido a su tamaño y comparándolo con el tamaño de la cavidad apolar de la β -ciclodextrina, ambas moléculas en principio podrían ser albergadas en el interior de ésta, permitiendo desplazar a un fluoróforo fuera de la cavidad generando un cambio de fluorescencia.

3.2 Objetivos

El objetivo global del presente capítulo es el diseño, síntesis y evaluación de un sensor químico fluorescente para la detección directa de explosivos peroxídicos.

La estrategia se basará en detectar la presencia de los explosivos peroxídicos mediante un cambio en la fluorescencia del sensor como consecuencia de una reacción de desplazamiento. Para ello se propone la síntesis de una β -ciclodextrina funcionalizada con un grupo dansilo y la evaluación de su capacidad como sensor fluorescente de TATP y DADP.

Los objetivos concretos que se plantean son:

- Síntesis de los explosivos peroxídicos TATP y DADP.
- Síntesis y caracterización de diversos derivados de dansilamida con cadenas de grupos funcionales diferentes para su anclaje a la β -ciclodextrina.
- Síntesis y caracterización de la molécula sensor.
- Ensayos de detección de TATP y DADP.
- Estudio de los posibles interferentes.

3.3 Resultados y discusión

3.3.1. Síntesis de los explosivos peroxídicos

El primer paso en este estudio consistió en la síntesis a pequeña escala de los explosivos peroxídicos. Se decidió sintetizar en el laboratorio, por separado, tanto el TATP como el DADP, ya que a pesar de que el TATP es el compuesto que tiene mayor capacidad explosiva, durante la síntesis de TATP siempre se obtienen en mayor o menor grado impurezas de DADP y, por lo tanto, nos interesaba disponer de él para estudiar sus propiedades y su interacción con las sondas.

Síntesis de TATP

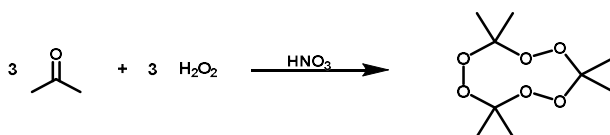
La síntesis de TATP se llevó a cabo optimizando procedimientos ya conocidos.⁷²

En primer lugar, se hizo reaccionar cantidades equimolares de acetona y peróxido de hidrógeno (35% v/v) en presencia de cantidades catalíticas de un ácido inorgánico, para la obtención TATP, como producto mayoritario, y DADP, como producto minoritario.

Dado que el TATP es el producto cinético de la reacción y el DADP el producto termodinámico, la síntesis se llevó a cabo en frío (en un baño de hielo) para favorecer la síntesis de TATP.

Para llevar a cabo la selección del ácido se probó la reacción con H_2SO_4 , HCl , y HNO_3 obteniéndose rendimientos de 51 %, 21 % y 60 % respectivamente. Por ello, en todas las síntesis posteriores se utilizó el HNO_3 (Esquema 2).

Dado que en las muestras reales de TATP siempre hay presencia de pequeñas cantidades de DADP y que en las síntesis realizadas siempre la cantidad de DADP estaba por debajo del 5% (según RMN), no se purificó el crudo de la reacción.

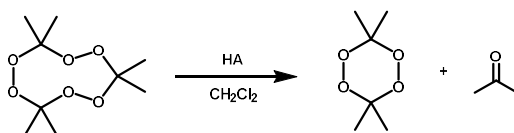


Esquema 2: Obtención del TATP.

Síntesis de DADP

Aprovechando que el DADP es el producto termodinámico de la reacción, su síntesis se llevó a cabo mediante la descomposición de TATP en un disolvente orgánico, en presencia de cantidades catalíticas de ácido p-toluensulfónico.⁷²

Para ello se disolvió en DCM el TATP obtenido anteriormente y se añadió una cantidad catalítica de ácido p-toluensulfónico y se dejó a temperatura ambiente durante la noche. Tras este tiempo se obtuvo DADP con un 95 % de pureza (el 5 % restante era TATP de partida) y con un rendimiento del 39 % (Esquema 3).



Esquema 3: Obtención del DADP a partir de TATP.

3.3.2 Estudios previos de complejación de los explosivos peroxídicos con ciclodextrina

Como paso previo necesitábamos estar seguros de que la ciclodextrina era capaz de albergar en su interior alguno de los dos explosivos (TATP o DADP). Para ello se llevaron a cabo experimentos de resonancia magnética nuclear de protón en agua deuterada. En primer lugar, se compararon los espectros en agua deuterada de β -CD, y de mezclas equimolares de β -CD y TATP y β -CD y DADP. Como el TATP y el DADP no son solubles en disolución acuosa, no muestran señal de ^1H -RMN en D_2O en ausencia de ciclodextrina.

En el espectro de ^1H -RMN de la mezcla de TATP y β -CD no se apreciaron apenas cambios respecto a la β -CD sola; sin embargo, en el espectro de la mezcla de β -CD + DADP (Figura 19) sí se observó un cambio en los protones H-3 de la β -CD que se desplazan a campos más altos. También se observó la aparición de dos nuevas señales, que fueron identificadas como los hidrógenos de los metilos axiales y ecuatoriales del DADP. Cuando se repitió el experimento sonicando previamente disolución de la mezcla de β -CD y DADP durante dos minutos, se observó un mayor desplazamiento a campo alto del H-3 de β -CD (ca. 0.04 ppm), junto a un incremento de las señales correspondientes a DADP. De la integración de las señales del espectro

de RMN se pudo estimar una relación β -CD/DADP de aproximadamente 1,5, lo que sugiere la presencia de mezclas 1:1 y 2:1 de complejos β -CD/DADP.

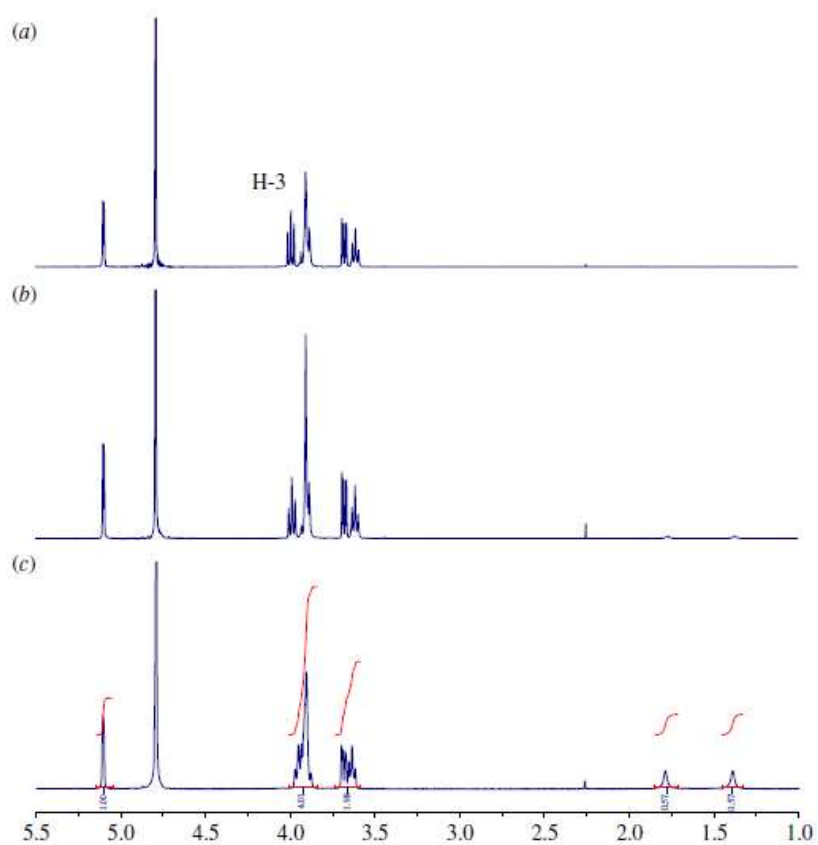


Figura 19: Espectro de ^1H -RMN (D_2O , 500 MHz) de a) β -CD ; b) β -CD con DADP ; c) β -CD con DADP sonificado 2 minutos.

Acorde a estos resultados se concluyó que la β -CD se puede utilizar para la detección del DADP a través de la formación de complejos host-guest.

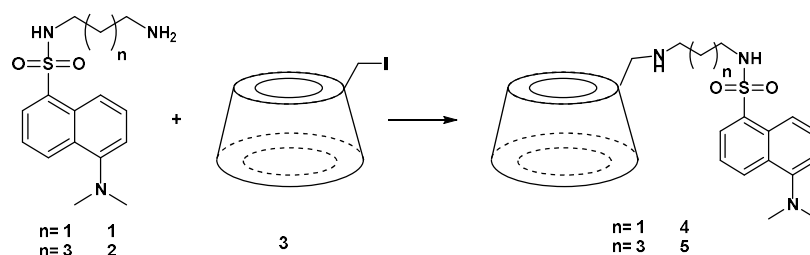
3.3.3 Diseño y síntesis de los quimiosensores fluorescentes

En vista de los prometedores resultados sobre la encapsulación de los explosivos en las ciclodextrinas se procedió a la síntesis de los correspondientes sensores, incorporando un grupo fluoróforo en la β -ciclodextrina, concretamente un grupo dansilo, conectado a través de una cadena alquílica. Además, se decidió ensayar dos longitudes de cadena distintas para evaluar cuál era la longitud óptima de la cadena.

La estrategia principal consistió en la monofuncionalización de β -ciclodextrina en uno de sus alcoholes primarios. Para ello era preciso sintetizar primero la ciclodextrina con un grupo reactivo en dicha posición y por otro lado, sintetizar un compuesto con propiedades fluorescentes capaz de entrar y salir de la cavidad de la β -ciclodextrina.

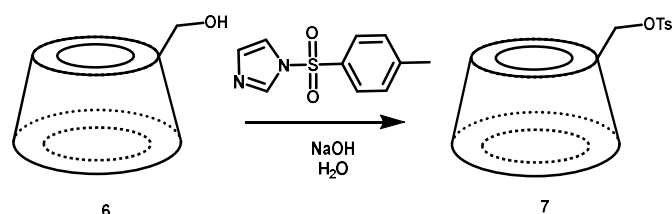
La primera aproximación consistió en la síntesis de un derivado de β -ciclodextrina con un buen grupo saliente en uno de sus alcoholes primarios. Por otro lado, se sintetizó un derivado de dansilamida como grupo fluorescente unido a un espaciador terminado en un grupo amina que actuaría como nucleófilo. Una reacción de sustitución nucleofílica entre ambos compuestos permitiría sintetizar el quimiosensor deseado (Esquema 4).

En un primer momento se propuso la obtención de los compuestos 4 y 5 mediante una sustitución nucleofílica a partir de un derivado monoyodado de la ciclodextrina (Esquema 4).



Esquema 4: Estrategia general para la síntesis de los quimiosensores **4** y **5**.

Para llevar a cabo esta monofuncionalización se realizó en primer lugar la tosilación de uno de los hidroxilos primarios de la β -ciclodextrina para obtener el compuesto monotosilado **7**, empleando para ello *p*-toluensulfonilimidazol como agente tosilante, siguiendo el procedimiento descrito en la bibliografía,⁷³ como se muestra en el Esquema 5.



Esquema 5: Síntesis de la β -ciclodextrina tosilada **7**.

El paso de tosilación es el paso clave de la ruta sintética ya que es el que permite obtener una ciclodextrina monofuncionalizada que asegure que en el resto de las etapas solo sea reactiva la posición deseada y finalmente no se inserte ningún fluoróforo más.

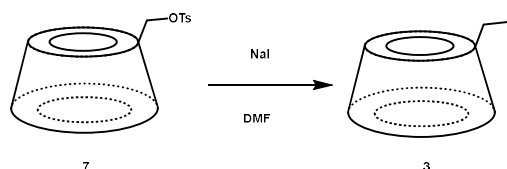
La β -ciclodextrina posee 3 tipos de grupos hidroxilos presentes en las posiciones 2, 3 y 6 de cada unidad de glucopiranososa (Figura 16). Los hidroxilos en la posición 2 son los más ácidos mientras que los

hidroxilos en la posición 6 son los más nucleófilos y los hidroxilos en 3 están inaccesibles para reaccionar.

Por ello la mejor estrategia para la monofuncionalización de la β -ciclodextrina es la sustitución de uno de los hidroxilos primarios en la posición 6 por un grupo tosilo. Este último actúa como buen grupo saliente y puede ser desplazado por otros nucleófilos para dar lugar a los derivados deseados.

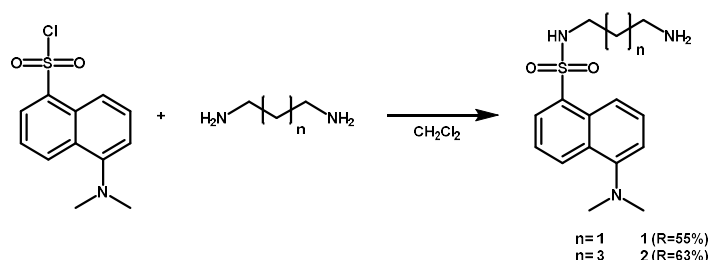
Para llevar a cabo esta funcionalización es necesario añadir los equivalentes necesarios de base para desprotonar uno de los hidroxilos primarios. Debido a su mayor acidez, los alcoholes secundarios en la posición 2 se desprotonan antes, de manera que hay que añadir un exceso importante de base. Así pues, se hicieron reaccionar 8 equiv. de NaOH con un 1 equiv. de ciclodextrina y se dejó reaccionar la mezcla hasta que la disolución cambió de una dispersión blanca a una disolución transparente. En ese momento se añadió *p*-toluensulfonilimidazol y se dejó la mezcla durante 60 min más a temperatura ambiente, tras lo cual se acidificó con HCl y se dejó toda la noche precipitando en la nevera, obteniéndose la ciclodextrina monotosilada **7** con un 30% de rendimiento.

La síntesis del ioduro **3** a partir del correspondiente derivado tosilado es una síntesis con condiciones ampliamente estudiadas.⁷⁴ Para su obtención se hizo reaccionar un exceso de 10 equivalentes de NaI con **7** en DMF a 70°C durante toda la noche (Esquema 6). El producto se purificó precipitándolo en acetona, obteniéndose con un rendimiento del 57 %.



Esquema 6: Ruta sintética para la obtención de la B-CD-I.

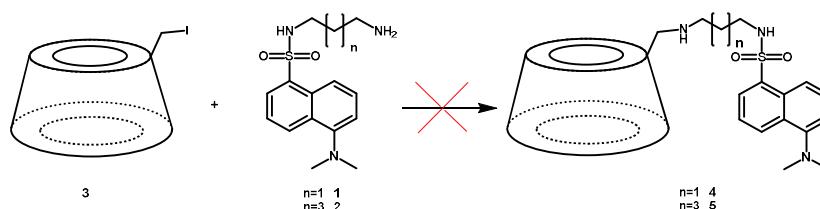
Una vez se obtuvo el ioduro **3** se procedió a la síntesis de los cromóforos basados en derivados de dansilo **1** y **2**, que contienen dos espaciadores alquílicos de 3 y 5 átomos de carbono respectivamente y un grupo amino terminal. Para ello se añadió cloruro de dansilo sobre una disolución de la diamina correspondiente: propano-1,3-diamina para **1** y pentano-1,5-diamina para la obtención de **2**. La mezcla de reacción se dejó durante 3 h a temperatura ambiente y después de las correspondientes extracciones se purificó mediante cromatografía de columna. Los rendimientos obtenidos para ambas reacciones fueron de 55 % para **1** y 63 % para **2** (Esquema 7).



Esquema 7: Síntesis de **1** y **2**.

Una vez se obtuvieron las aminas derivadas de la dansilamida **1** y **2** y la ciclodextrina iodada **3** se intentó llevar a cabo la funcionalización de la ciclodextrina a través de una reacción de alquilación de aminas. La síntesis se llevó a cabo como se encuentra

descrita en la bibliografía para análogos de los derivados de dansilo.⁷⁵ Se hizo reaccionar **3** con el derivado de dansilo correspondiente con agitación durante 72 h a 60 °C no obteniéndose en ningún caso el compuesto deseado y recuperándose siempre el producto de partida inalterado.



*Esquema 8: Síntesis de **4** y **5**.*

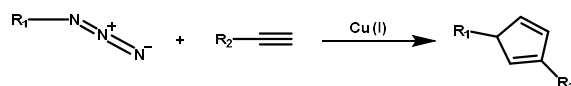
Se repitió la síntesis aumentando tanto el tiempo de reacción, como la temperatura. La síntesis se llevó a cabo también en presencia de Et_3N para intentar aumentar la nucleofilia de la amina. La reacción tuvo lugar en un rendimiento tan bajo que no se logró aislar el producto deseado.

A la vista de estos resultados se decidió llevar a cabo un cambio de estrategia en la ruta sintética para la obtención de los sensores.

Con el fin de evitar la reacción de sustitución nucleofílica, se propuso una reacción de tipo “click”. El término “click chemistry”, introducido por el Dr. Sharpless en 2001,⁷⁶ hace referencia a una reacción química de alto rendimiento y amplio espectro, que genera sustancias de forma rápida y con elevada economía atómica al unir pequeñas unidades sintéticas entre sí. Entre la amplia gama de reacciones perteneciente a esta química “click” en esta ruta sintética

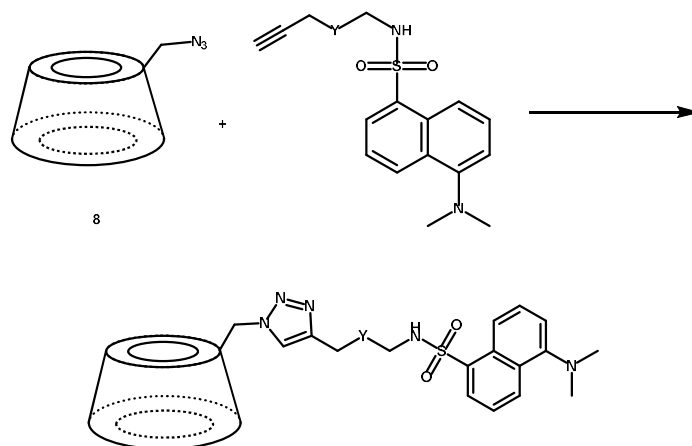
se empleó la “joya de la corona” (en terminos del comité del Nóbel)⁷⁷ que es la reacción de cicloadición de azidas y alquinos catalizada por cobre.⁷⁸

Esta reacción consiste en la reacción de un grupo azida y un triple enlace terminal en presencia de una sal de Cu (I) para dar lugar a 1,2,3-triazoles (Esquema 9).



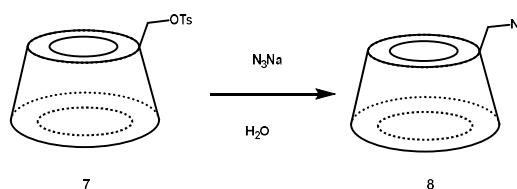
Esquema 9: Reacción de cicloadición entre un grupo azida y un triple enlace terminal para dar lugar a 1,2,3-triazol.

Para llevar a cabo la reacción primero se ha de sintetizar una ciclodextrina funcionalizada con un grupo azida terminal (β -CD- N_3) y un derivado de dansilamida que posea en la estructura de su cadena un grupo alquino terminal como se muestra en el Esquema 10.



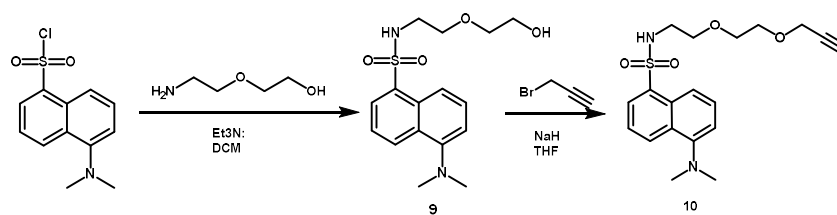
Esquema 10: Esquema general para la click chemistry con CDs.

El primer paso de esta ruta consistió en la síntesis de la β -CD- N_3 . Para ello se partió de β -ciclodextrina monotosilada **7** obtenida previamente desplazando el grupo tosilo mediante una reacción de sustitución nucleófila con azida sódica en H_2O , siguiendo el protocolo descrito en la bibliografía.⁶⁹ En este procedimiento, una vez finalizada la reacción la β -CD- N_3 se precipitaba con acetona. Sin embargo, en nuestro caso no se consiguió la precipitación de la β -CD- N_3 , a pesar de que se llevaron a cabo pruebas con distintas proporciones de disolventes y bajando la temperatura. Finalmente se consiguió la precipitación de la azida mediante la adición de 1,1,2,2-tetracloroetano⁷⁹ ya que éste forma un complejo con la β -CD- N_3 insoluble en H_2O . (Esquema **11**)



*Esquema 11: Síntesis de **8**, β -CD- N_3 .*

Una vez obtenida la correspondiente monoazida **8** se llevó a cabo la síntesis del alquínil derivado de dansilamida. La primera cadena que se intentó unir al cloruro de dansilo, para obtener el espaciador, fue el 2-(2-aminoetoxi)etanol. El resto amino de esta cadena permitiría unirse al cloruro de dansilo desplazando al halógeno, mientras que el resto hidroxilo permite la posterior incorporación de un triple enlace por reacción con bromuro de propargilo (Esquema **12**).



Esquema 12: Síntesis de **9** y **10**.

Para la síntesis de **9** se partió de una proporción 1:3 de cloruro de dansilo y 2-(2-aminoetoxi)etanol utilizando trietilamina como base para evitar la desprotonación del grupo hidroxilo. La adición se llevó a cabo en un baño de hielo y luego se dejó reaccionar toda la noche a temperatura ambiente. El producto de reacción se obtuvo, sin necesidad de purificar mediante cromatografía de columna, con un rendimiento del 70 %.

Para llevar a cabo la reacción para la obtención **10** se utilizaron dos equivalentes de base debido a que el primero se consume con el hidrógeno de la sulfonamida, más ácido que el del hidroxilo debido al efecto inductivo del grupo sulfonilo.. Precisamente debido a esta acidez, el producto mayoritario obtenido fue el **11** (Figura 20) derivado de una doble sustitución.

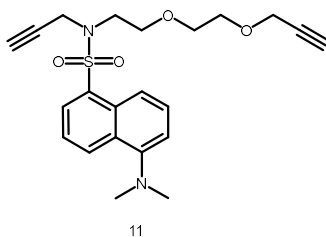
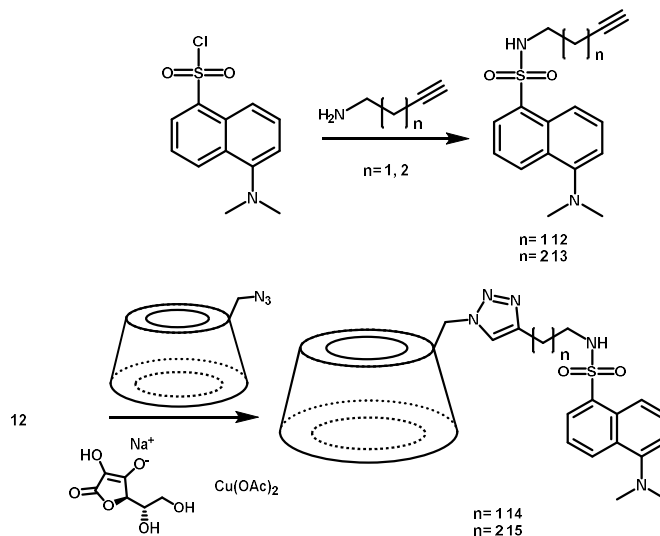


Figura 20: Compuesto **11**.

Para evitar este tipo de problemas se propuso la reacción entre cloruro de dansilo y una amina que ya contuviera un grupo alquino terminal. Para ello se escogieron but-3-in-1-amina y pent-4-in-1-amina, ambas comerciales.



Esquema 13: Síntesis de **14** y **15**.

Para la obtención de **12** se hizo reaccionar cloruro de dansilo con un exceso de but-3-in-1-amina en presencia de base, para neutralizar el ácido formado, y se dejó reaccionar durante 72 h a temperatura ambiente, obteniendo un 63 % de rendimiento. Para su análogo **13**, derivado de la pent-4-in-1-amina en iguales condiciones de reacción, el rendimiento fue del 17 %.

Una vez obtenidos **12** y **13** se llevó a cabo la síntesis de las moléculas sensoras **14** y **15**, empleando una reacción click entre la β -CD- N_3 **8** y los alquinos **12** y **13** en presencia de Cu(I) y empleando DMSO como disolvente. Para ello fue necesario el uso de cantidades

estequiométricas de $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ en lugar de cantidades catalíticas. Esto se justifica porque los hidroxilos secundarios de la β -ciclodextrina interaccionan con el cobre consumiendo éste del medio de reacción. Para reducir el cobre(II) a cobre(I) se utilizó una disolución acuosa de ascorbato sódico (Esquema **13**). La mezcla se dejó reaccionar durante 48 horas. Una vez acabado el tiempo de reacción se eliminó el DMSO y se redisolvió el crudo en amoníaco diluido para eliminar el cobre. El producto se purificó por cromatografía en columna obteniéndose **14** con un rendimiento del 17 % y **15** con un rendimiento del 23%.

Las propiedades espectroscópicas de los quimiosensores **14** y **15** se evaluaron en mezclas $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$, 95:5 (1×10^{-6} M). La razón de añadir un 5 % de MeOH fue para promover la solubilidad posterior del TATP y DADP en los experimentos de titración con ambos explosivos.

Ambos compuestos mostraron una banda de absorción alrededor de 340 nm en su espectro de UV-vis y una banda de emisión de fluorescencia a $\lambda_{\text{max}} = 518$ nm cuando se excitaban a 340 nm. Estas señales se corresponden a las esperadas para el fluoróforo de dansilo.^{64,69,80}

También se determinó el rendimiento cuántico obteniéndose un valor de 0.18 (respectivo a la fluoresceína) para ambos compuestos.

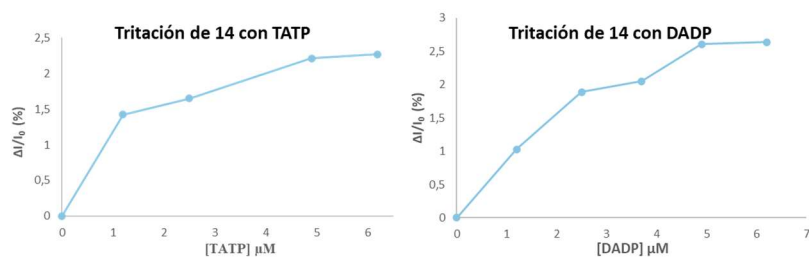
3.3.4 Evaluación de la sensibilidad y selectividad de los quimiosensores en la detección de TATP y DADP

Una vez obtenidos los sensores **14** y **15**, se pasó a evaluar su capacidad para detectar los explosivos peroxídicos TATP y DADP mediante cambios de fluorescencia.

Para ello se llevaron a cabo experimentos de titración por emisión de fluorescencia con disoluciones de **14** y **15** ($1 \cdot 10^{-6}$ M) en H₂O:MeOH (95:5) en presencia de cantidades crecientes de soluciones metanólicas de TATP y DADP (0-6 μ M).

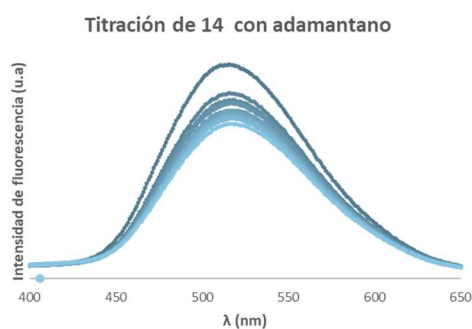
En los experimentos preliminares a temperatura ambiente, ambos compuestos mostraron una disminución moderada de su intensidad de fluorescencia (aproximadamente 3-6 %) en presencia de los peróxidos explosivos, siendo este efecto más fuerte para el DADP que para el TATP en ambos compuestos.

Para mejorar la sensibilidad se repitieron los experimentos, pero calentando la mezcla de sensor y explosivo de peróxido a 40°C durante 10 min antes de medir sus espectros de fluorescencia. En estas condiciones la sensibilidad hacia el TATP pudo ser mejorada, y por ejemplo el sensor **14** experimentó una disminución de su intensidad de fluorescencia de alrededor de un 11 % en presencia de un exceso de TATP y aproximadamente un 7 % en presencia de DADP (Gráfica 1).



Gráfica 1: (Derecha) Espectro de fluorescencia de **14** (10^{-6} M) en $H_2O:MeOH$ (95:5) con TATP (0-6 μM). (Izquierda) Espectro de fluorescencia de **14** (10^{-6} M) en $H_2O:MeOH$ (95:5) con DADP (0-6 μM).

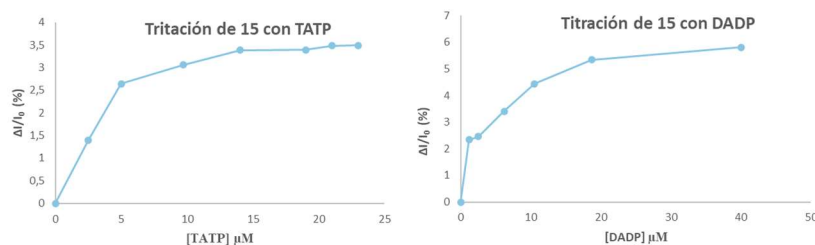
Cabe mencionar que los experimentos de valoración con **14** en presencia de cantidades crecientes de adamantano (que forma eficaces complejos de inclusión de β -ciclodextrinas) condujeron a una disminución similar (10-11 %) en su intensidad de fluorescencia (Gráfica 2).



Gráfica 2: Espectro de fluorescencia de **14** (10^{-6} M) en $H_2O:MeOH$ (95:5) con adamantano (0-10 μM).

También se realizaron los experimentos con TATP y DADP con el sensor **15** obteniéndose como respuesta una disminución de su

intensidad de fluorescencia de alrededor de 3,5 % en presencia de un exceso de TATP y aproximadamente un 5 % en presencia de DADP (Gráfica 3).



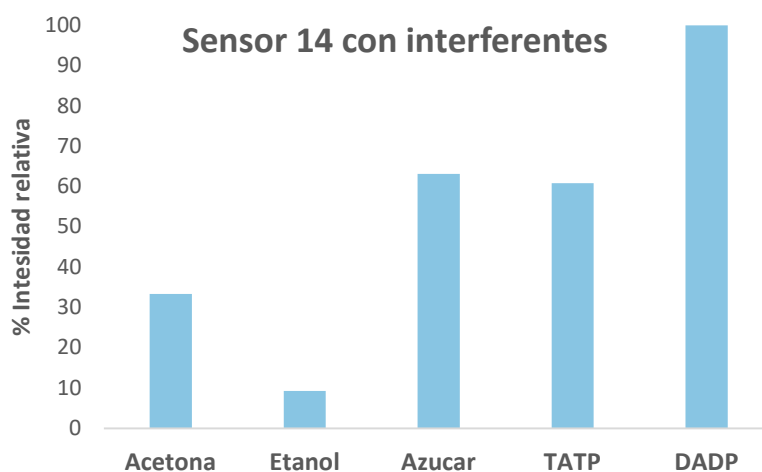
Gráfica 3: (Derecha) Espectro de fluorescencia de **15** (10^{-6} M) en $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ (95:5) con TATP (0-23 μM). (Izquierda) Espectro de fluorescencia de **15** (10^{-6} M) en $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ (95:5) con DADP (0-40 μM).

Una posible explicación a esta sensibilidad algo modesta hacia el TATP y el DADP podría ser su muy baja solubilidad en soluciones acuosas, lo que impide alcanzar concentraciones de los explosivos de peróxido lo suficientemente altas como para observar un desplazamiento más significativo del fluoróforo dansilo por el huésped explosivo.

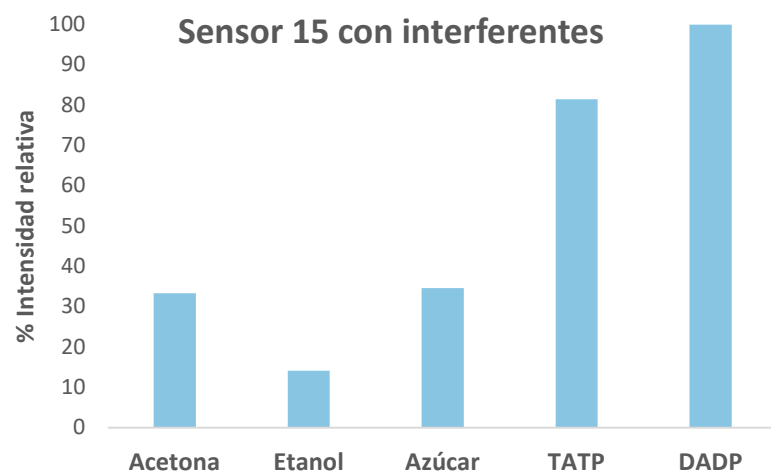
Sin embargo, los experimentos de valoración realizados con mezclas de disolventes menos polares, como $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ 9:1 o $\text{MeCN}:\text{H}_2\text{O}$ 9:1 mostraron una sensibilidad mucho menor, mientras que en el MeOH puro no había ninguna señal. Esto es debido a que en estas mezclas de disolventes menos polares no favorecen la inclusión del grupo dansilo dentro de la β -ciclodextrina con lo cual el aumento

de concentración de los explosivos no desplaza al grupo dansilo y no se observa la disminución de la fluorescencia.

Por último, para estudiar la selectividad de estos sistemas, se probaron distintos interferentes como disolventes comunes (acetona y etanol) así como azúcar mediante espectroscopia de fluorescencia siguiendo el mismo protocolo. Como se muestra en las **8** y **9** la respuesta de **14** y **15** hacia el TATP o el DADP es superior a todos ellos.



Gráfica 4: Sensibilidad sensor **14** con interferentes (10^{-6} M) en $H_2O:MeOH$ (95:5).



Gráfica 5: Sensibilidad sensor **15** con interferentes (10^{-6} M) en $H_2O:MeOH$ (95:5).

3.4. Conclusiones

En resumen, se han diseñado y sintetizado dos moléculas sensoras, basadas en una β -ciclodextrina funcionalizada con un derivado de dansilo, capaces de detectar TATP y DADP en medio acuoso mediante cambios de fluorescencia del quimiosensor, aunque con una sensibilidad moderada. Los compuestos son capaces de discriminar entre explosivos peroxídicos e interferentes como puedan ser acetona, etanol y azúcar.

En un futuro se deben realizar estudios adicionales a distintos valores de pH, así como probar otros posibles interferentes más complejos como pueden ser distintos cosméticos o productos higiénicos.

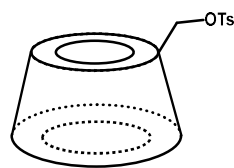
También sería interesante la síntesis de un sensor de fluorescencia basado en la γ -ciclodextrina que posee una mayor cavidad lipofílica con objeto de aumentar su capacidad para albergar TATP en su interior.

3.5. Procedimiento experimental

Todos los reactivos fueron adquiridos comercialmente y se utilizaron sin purificación. Los espectros ^1H -NMR y ^{13}C -NMR se registraron en un espectrómetro Bruker de 300 MHz. Los desplazamientos químicos se expresan en ppm con tetrametilsilano como patrón interno. Los espectros de masas de alta resolución se registraron en el modo de iones positivos en un espectrómetro de masas VG-AutoSpec. Los espectros de absorción UV-vis se registraron utilizando una cubeta de cuarzo de 1 cm de longitud de paso en un espectrofotómetro Shimadzu UV-2101PC. Los espectros de fluorescencia se registraron con Fluoromax Horiba-MTB.

Síntesis de Mono-6-deoxi-6-(p-toluensulfonil)- β -ciclodextrina (CDOTs) (7)

En un matraz de fondo redondo de una boca de 250 mL provisto de agitación magnética se disolvió β -ciclodextrina (7 g, 6.2 mmol) en 75 mL de H_2O . A la dispersión blanquecina obtenida se le añadió NaOH. (2.5 g, 63 mmol) La dispersión pasó a ser transparente paulatinamente. Pasados 30 minutos se añadió p-toluensulfonilimidazol (1.5 g, 6.8 mmol). La mezcla de reacción se dejó reaccionar durante una hora. Pasado este tiempo se acidificó la mezcla con ácido clorhídrico concentrado hasta obtener pH=5 y se dejó precipitar en la nevera durante una noche. El sólido obtenido se filtró

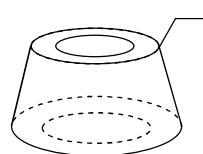


a vacío y se lavó con agua caliente, agua fría y acetona respectivamente. Se secó a vacío y se obtuvieron 2.4 g de **7** (30 % rendimiento) de un polvo blanco similar a la β -ciclodextrina de partida.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6) δ 7.75 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.43 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 5.88 – 5.55 (m, 14H), 4.80 (d, 6H), 4.53 – 4.25 (m, 7H), 3.64 (s, 26H), 3.29 (d, 16H), 2.43 (s, 3H)

Síntesis de Mono-6-deoxi-6-iodo- β -ciclodextrina (CDI) (3**)**

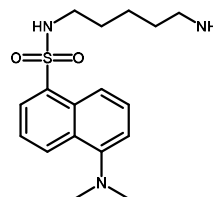
En un matraz de fondo redondo de 50 mL de dos bocas provisto de agitación magnética se disolvió **7** (0.309 g, 0.23 mmol) en 20 mL de DMF y se añadió NaI (0.368 g, 2.3 mmol) bajo atmósfera de argón, la disolución se torna amarillenta al añadir el NaI. Se calentó la mezcla a 70°C y se dejó en agitación durante toda la noche. Una vez pasado el tiempo de reacción se elimina la DMF a vacío. El aceite obtenido se disuelve en H_2O y se precipitó con acetona obteniendo 0.1315 g de **3** (57 % de rendimiento).



$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO-d_6) δ 5.76 (m, 14H), 4.85 (m, 7H), 4.50 (m, 6H), 3.81 – 3.47 (m, 26H), 3.46 – 3.13 (m, 16H).

Síntesis de N-(5-aminopentil)-5-(dimetilamino)naftaleno-1-sulfonamida (2)

En un matraz de fondo redondo de 50 mL de tres bocas provisto de agitación magnética se disolvió 1,5-diaminopentano (0.5 mL, 3.9 mmol) en 20 mL de DCM seco. A esta disolución se le añadió cloruro de dansilo (0.357 g, 1,3 mmol) por medio de un embudo de adición compensada disuelto en 10 mL de DCM seco, bajo argón. La mezcla de reacción se dejó reaccionar durante 3 horas a 0 °C en un baño de hielo-agua y luego se dejó reaccionar toda la noche con agitación vigorosa a temperatura ambiente. Pasado este tiempo la mezcla de reacción se lavó con NaOH 1 M y luego dos veces con agua desionizada; se secó con MgSO₄ anhidrido y se eliminó el disolvente a vacío.

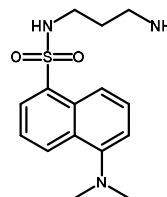


La purificación del producto se lleva a cabo mediante cromatografía de columna utilizando como fase estacionaria sílica gel y como eluyente una mezcla de DCM:MeOH 95:5 obteniendo 0.24 g de **2** (55 % de rendimiento).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.54 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H), 8.33 – 8.21 (m, *J* = 17.6, 8.0 Hz, 2H), 7.60 – 7.45 (m, *J* = 18.3, 9.7 Hz, 2H), 7.18 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 2.94 – 2.82 (m, 6H), 2.57 (t, 2H), 1.48 – 1.12 (m, 8H).

Síntesis de N-(3-aminopropil)-5-(dimetilamino)naftaleno-1-sulfonamida (1)

En un matraz de fondo redondo de 50 mL de tres bocas provisto de agitación magnética se disolvió 1,3-diaminopropano (0.53 mL, 4.5 mmol) en 20 mL de DCM. A esta disolución se le añadió cloruro de dansilo (0.418 g, 1.5 mmol) por medio de un embudo de adición compensada de disueltos en 10 mL de DCM seco. La mezcla de reacción se dejó durante 3 horas en un baño de hielo bajo argón y luego toda la noche con agitación vigorosa a temperatura ambiente. Pasado este tiempo la mezcla de reacción se lavó con NaOH 1 M y luego dos veces con agua desionizada, se secó con MgSO₄ anhidrido y se eliminó el disolvente.

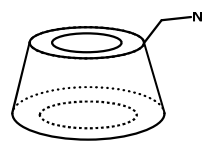


La purificación del producto se llevó a cabo mediante cromatografía de columna utilizando como fase estacionaria gel de sílice y como eluyente una mezcla de DCM:MeOH 95:5 obteniendo 0.29 g de **1** (63 % de rendimiento).

¹H-NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.46 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 8.30 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 8.09 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.67 – 7.53 (m, 8.1 Hz, 2H), 7.25 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 2.86 – 2.75 (m, 6H), 2.43 (t, 2H), 1.44 – 1.31 (m, 4H).

Síntesis de Mono-6-deoxi-6-azido-β-Ciclodextrina (CD-N₃) (8)

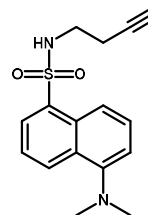
En un matraz de fondo redondo de una boca de 250 mL provisto de agitación magnética se disolvió **7** (0.813 g , 0.63 mmol) y NaN₃ (0.205 g, 3.15 mmol) en 150 mL de H₂O y se dejó reaccionar toda la noche a 86 °C. Pasado este tiempo se concentró a la mitad el volumen de la disolución. Se añadieron 9.5 mL de 1,1,2,2-tetracloroetano y se dejó agitando 10 minutos. Una vez formado el complejo se separó el sólido por centrifugación (10 minutos, 144 radianes y 25 °C). El precipitado se filtró a vacío. Para eliminar el 1,1,2,2-tetracloroetano se disolvió en agua y se calentó a 50°C durante una hora. Tanto el 1,1,2,2-tetracloroetano como el agua se eliminaron a vacío obteniendo 0.4 g de **8** (44 % de rendimiento). El producto se caracterizó por ¹H-RMN. La desaparición del producto de partida se demostró por la ausencia de señales en la zona aromática.



¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 5.72 (m, 14H), 4.85 (m, 7H), 4.63 – 4.35 (m, 6H), 3.63 (m, 26H), 3.33 (m, 16H).

Síntesis de N-(but-3-in-1-il)-5-(dimetilamino)naftaleno-1-sulfonamida (12)

En un matraz de fondo redondo de 50 mL de tres bocas provisto de agitación magnética se disolvió 1-amino-3-butino (0.2 mL, 2.4 mmol) y trietilamina (0.33 mL, 2.4 mmol) en 10 mL de DCM seco. A dicha mezcla se le añadió cloruro de dansilo (0.54 g, 2 mmol) por medio de un embudo de adición compensada, disuelto en 10 mL de DCM seco. La mezcla de reacción se dejó durante 3 horas en un baño de hielo-agua bajo argón y luego, 3 días con agitación vigorosa a temperatura ambiente. Pasado este tiempo la mezcla de reacción se lavó con NaOH 1 M y luego dos veces con agua desionizada. Se secó con MgSO₄ anhidrido y se eliminó el disolvente a vacío.

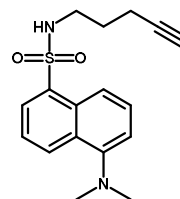


La purificación del producto se lleva a cabo mediante cromatografía de columna utilizando como fase estacionaria gel de sílice y como eluyente una mezcla de DCM:MeOH 95:5 obteniendo 380 mg de **12** (63 %).

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 8.56 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 8.33 – 8.18 (m, 2H), 7.61 – 7.48 (m, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.20 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 4.95 (t, *J* = 6.3 Hz, 1H), 3.06 (q, *J* = 6.5 Hz, 2H), 2.89 (s, 6H), 2.33 – 2.25 (m, *J* = 6.5 Hz, 2H), 1.90 (s, 1H).

Síntesis de 5-(dimetilamino)-N-(pent-4-in-1-il)naftaleno-1-sulfonamida (13)

En un matraz de fondo redondo de 50 mL provisto de agitación magnética se disolvió 4-pentin-1-amina (0.25 mL, 1.8 mmol) y trietilamina (0.25 mL, 1.8 mmol) en 10 mL DCM seco. A esta disolución se le añadió cloruro de dansilo (0.404 g, 1.5 mmol) por medio de un embudo de adición compensada de disueltos en 10 mL de DCM seco. La mezcla de reacción se dejó durante 3 horas a 0°C en un baño de hielo-agua bajo argón y luego 3 días con agitación vigorosa a temperatura ambiente. Pasado este tiempo la mezcla de reacción se lavó con NaOH 1 M y luego dos veces con agua desionizada. Se secó con MgSO₄ anhidrido y se eliminó el disolvente a vacío.

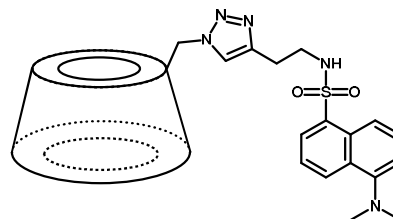


La purificación del producto se llevó a cabo mediante cromatografía de columna utilizando como fase estacionaria gel de sílice y como eluyente una mezcla de DCM:MeOH 95:5 obteniendo 357,6 mg de **13** (75 % de rendimiento).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.55 (d, 1H), 8.35 – 8.16 (m, 2H), 7.54 (m, 2H), 7.19 (d, 1H), 4.75 (m, 1H), 3.03 (q, 2H), 2.89 (s, 6H), 2.1 (q, 2H), 1.86 (t, 1H), 1.69 (q, 2H).

Síntesis de Mono-6-[N-(but-3-in-1-il)-5-(dimetilamino)-naftaleno-1-sulfonamida]-6A-deoxy-β-D-ciclodextrina (14)

En un matraz de fondo redondo de dos bocas de 50 mL provisto de agitación magnética se disolvió el alquino **13** (140 mg, 0.46 mmol) en 20 mL de DMSO y **8** (640 mg, 0.552 mmol). Una vez disueltos los reactivos, se añadió el acetato de cobre arrastrándolo con unos mL de DMSO hasta un total de volumen en la reacción de 25 mL. Finalmente se añadió ascorbato sódico (182 mg, 0.92 mmol) disuelto en 5 mL de H₂O y se dejó reaccionar la mezcla de reacción durante dos días. Pasado este tiempo se eliminó la mezcla de disolventes a vacío. Una vez seco se disolvieron en 30 mL de una disolución de hidróxido amónico al 8 % y se dejó tres noches en agitación para que se formase el complejo de Cu. Pasado este tiempo se llevó a cabo una columna con DCM:MeOH 95:5 y las fracciones que contienen el producto se juntan, se eliminó el disolvente, se redisolvió en acetato de etilo para eliminar el fluoróforo en exceso, que se observaba en el ¹H-RMN, y finalmente se centrifugó. El sólido se lavó con acetato de etilo y se secó a vacío. Obteniendo 0.114 g de **14** (17 % de rendimiento).



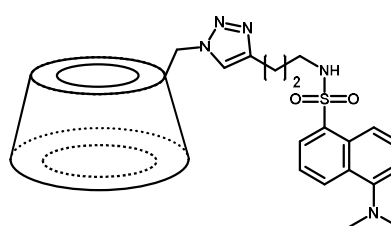
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 8.46 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 8.28 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 8.12 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.66 (s, 1H), 7.60 (m, 2H), 7.26 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 5.67 (m, 14H), 4.87 – 4.71 (m, 7H), 4.63 – 4.35

(m,6H), 3.91 (t, 2H), 3.62-3.06 (m, 42H), 3.06 (s, 6H), 2.67 (t, 2H), 1.90 (s, 1H).

HRMS (EI): m/z calculada para **16•Na** ($C_{58}H_{87}N_5O_{36}SNa$) ($[M+Na]^+$) es de 1462.4900 . La masa obtenida es 1462.4890 ($[M+Na]^+$)

Síntesis de Mono-6-[N-(pent-4-in-1-il)-5-(dimetilamino)-naftaleno-1-sulfonamida]-6A-deoxy-β-D-ciclodextrina. (15)

En un balón de fondo redondo de 50 mL con dos bocas se disolvió el alquino **12** (94.83 mg, 0.3 mmol) y la monoazido-ciclodextrina **8** (250 mg, 0.2 mmol)



en 20 mL de DMSO. Una vez la β-ciclodextrina está disuelta se añade acetato de cobre (59.8 mg, 0.3 mmol) arrastrándolo con unos mL de DMSO hasta un total de volumen en la reacción de 25 mL. Finalmente, se añadió ascorbato sódico (118.86 mg, 0.6 mmol) disuelto en 5 mL de H₂O. Se dejó reaccionar durante dos días. Pasado este tiempo se eliminó la mezcla de disolventes. Una vez seco se disolvieron en 30 mL en una disolución de hidróxido amónico al 8 % y se dejó pasar tres noches para que se forme el complejo de Cu. Pasado este tiempo se llevó a cabo una cromatografía de columna con DCM:MeOH 95:5 y las fracciones que contienen el producto se juntan, se eliminó el disolvente, se redisolvieron en acetato de etilo para eliminar el fluoróforo en exceso que se observa en el ¹H-RMN, y finalmente se

centrifugó. El sólido se lavó con acetato de etilo y se secó a vacío. Obteniendo 68 mg de **15** (23 % de rendimiento).

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.45 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 8.31 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 8.09 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 7.70 – 7.50 (m, 3H), 7.25 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 5.77 (s, 14H), 5.03 (s, 2H), 4.79 (d, $J = 38.5$ Hz, 7H), 4.47 (s, 6H), 3.94 (s, 2H), 3.63- 3.08 (m, 42H) 2.83 (s, 6H), 1.66 (s, 2H), 1.90 (s, 1H).

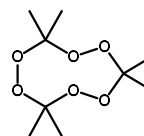
HRMS (EI): m/z calculada $[\text{M}^+\text{Na}]^+$ para **15·Na** ($\text{C}_{59}\text{H}_{89}\text{N}_5\text{O}_{36}\text{SNa}$): 1498.36; la obtenida es 1498.52 $[\text{M}^+\text{Na}]^+$.

Síntesis de los explosivos peroxídicos

Los explosivos peroxídicos tienen carácter de explosivos primarios y son muy sensibles. Por ello la síntesis del TATP y del DADP requieren un manejo cuidadoso y unas medidas de seguridad adicionales.

Síntesis de triperóxido de triacetona (TATP)

En un matraz de fondo redondo de 50 mL provisto de agitación magnética se mezclaron acetona (1 mL, 13.5 mmol) y peróxido de hidrógeno (32% v/v) (1.16 mL, 13.5 mmol) y peróxido de hidrógeno (32% v/v) (1.16 mL, 13.5 mmol). La mezcla de reacción se enfrió a 0°C en un baño de hielo-agua y se añaden muy lentamente 0.23 mL de HNO_3 concentrado. La disolución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 24 h. Pasado este tiempo precipitó un sólido que se



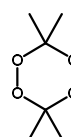
aisló por filtración, se lavó con H₂O desionizada y se secó al aire, obteniéndose 0.52 g de TATP (52 % de rendimiento).

Del espectro de RMN de protón se dedujo que la relación entre TATP:DADP es 95:5.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.46 (s, 18H)

Síntesis del diperoóxido de diacetona (DADP)

En un matraz de fondo redondo de 50 mL de una boca provisto de agitación magnética se disolvió TATP (0.5 g, 2.25 mmol) en 10 mL de DCM seco y se le añadieron cantidades catalíticas de ácido *p*-toluensulfónico. La mezcla de reacción se dejó agitando a temperatura y presión ambientes durante una semana. Pasado este tiempo se eliminó el disolvente con flujo continuo de argón. El sólido se redisolvió en DCM y se lavó el medio de reacción con H₂O fría para eliminar el ácido *p*-toluensulfónico. Una vez aislado el disolvente volvió a eliminarse con un flujo continuo de argón, obteniéndose 132 mg de DADP (39 % de rendimiento). El producto se caracteriza por ¹H-RMN de protón.



Del espectro de RMN de protón se deduce que la relación entre DADP:TATP es 95:5.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.79 (s, 6H), 1.35 (s, 6H).

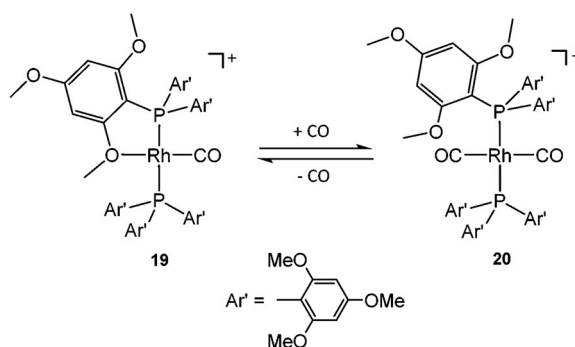
Capítulo 4:
Quimiodosímetro para detección
fluorogénica de monóxido de carbono,
basado en una reacción de
carbonilación catalizada por paladio

4.1 Introducción

4.1.1 Detección de monóxido de carbono

Después del descubrimiento de que el CO podía actuar como neurotransmisor, surgieron nuevas líneas de investigación centradas en la detección en tiempo real de CO en células y tejidos vivos. La mayoría de las sondas desarrolladas para la detección óptica de CO, tanto en aire como en células, se basan en complejos de metales de transición, debido a su capacidad para formar carbonilos metálicos con el CO así como a sus propiedades cromogénicas o fluorogénicas.

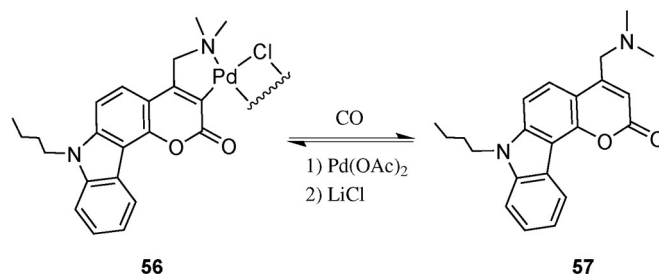
Por ejemplo, Dunbar *et al.*⁸¹ desarrollaron un sensor cromogénico basado en un complejo de rodio (I) que lleva a cabo una reacción reversible con el CO para dar lugar a especies dicarbonílicas (Esquema 14).



Esquema 14: Reacción reversible del complejo de rodio con CO.⁸¹

Por otro lado, Zheng *et al.*⁸² han desarrollado un método de detección fluorogénica de monóxido de carbono basado en un

complejo de paladio ciclometalado con una unidad fusionada de carbazol y cumarina que en presencia de CO sufre la desaparición de la señal de TPA permitiendo obtener imágenes del monóxido de carbono en tejidos vivos (Esquema 15).



Esquema 15: Reacción del CO con el complejo de paladio desarrollado por Zeng et al.

82

4.1.2. Cumarinas

Las cumarinas son un conjunto de compuestos que tienen como núcleo base una benzopiran-2-ona (Figura 21). Muchos de estos compuestos son productos naturales, metabolitos secundarios, procedentes de la ruta biosintética del ácido shikímico, habiéndose aislado hasta el momento más de 1000 cumarinas de 800 especies vegetales diferentes.⁸³ El primer representante de esta familia fue aislado por Vogel en el año 1820, del haba de la tonka, cuyo nombre común en Caribe es *cumaru*, de ahí el nombre que se le dio a esta familia de compuestos.⁸⁴ La diversidad estructural de los compuestos derivados de las cumarinas permite su clasificación en cumarinas simples (con diferente sustitución sobre los anillos), o bien en

cumarinas más complejas, en general, condensadas con otros heterociclos: furanocumarinas, piranocumarinas, biscumarinas, cumarinolignanos y triscumarinas.⁸³

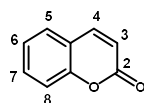


Figura 21: Estructura y numeración de las cumarinas.

Las excelentes propiedades fotofísicas de estos compuestos han hecho que sean ampliamente utilizados como agentes colorantes de láseres, sondas fluorescentes para especies biológicamente importantes, marcadores biológicos para supervisar la actividad de enzimática así como detectores de propiedades farmacológicas y farmacocinéticas precisas.^{85,86} El rendimiento cuántico de fluorescencia (ϕ) de estos colorantes suele ser muy alto, a menudo cerca de la unidad. Estas sustancias sufren cambios sustanciales en sus momentos dipolares en estado excitado, lo que causa grandes desplazamientos de Stokes entre sus espectros de absorción y fluorescencia,⁸⁷ que son extremadamente sensibles a la polaridad del disolvente utilizado. Además, muchos derivados de cumarinas presentan el fenómeno de la absorción de dos fotones (TPA, del inglés “two-photon absorption”), por el cual la molécula es capaz de absorber simultáneamente dos fotones (de igual o distinta energía), pasando del estado fundamental al estado electrónico excitado, a través de un estado virtual, y posteriormente emitir fluorescencia con una energía mayor (menor longitud de onda) que la de cualquiera de los dos fotones excitatorios.^{88,89}

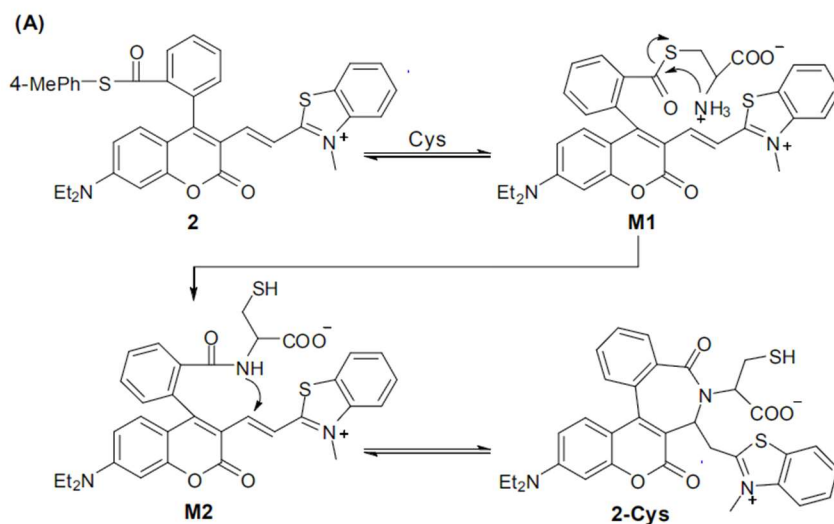
El TPA es un proceso óptico no lineal y se rige por reglas de selección diferentes a las de los procesos de absorción de un solo fotón.⁹⁰ Esta propiedad optoelectrónica hace de las cumarinas unas excelentes sondas fluorescentes.

4.1.2.1. Aplicaciones de cumarinas como sondas fluorescentes.

En los últimos años, la investigación sobre sondas fluorescentes, en general, y aquellas derivadas de cumarinas, en particular, ha sido uno de los temas candentes.⁹¹

Solo para ilustrar el alcance de estos estudios vamos a mostrar algunos ejemplos.

En muchas ocasiones las cumarinas actúan como unidades señalizadoras en sistemas que contienen unidas covalentemente las unidades de reconocimiento. Algunos de estos sistemas han sido utilizados para la detección selectiva de cisteína (Cys), homocisteína (Hcy) y glutatión (GSH).⁹² Así, por ejemplo, Guo et al.⁹³ han diseñado una cumarina funcionalizada con un tioéster que es capaz de discriminar Cys sobre Hcy y GSH basándose en una reacción en cascada de ciclación inducida por Cys, como se muestra en el Esquema **16**.



Esquema 16: Mecanismo de detección de cisteína.

Además, se estudió este sistema en líneas celulares de carcinoma de riñón humano 786-O que no presentan fluorescencia en el canal azul, mientras que cuando son incubadas con el sensor, son capaces de detectar la presencia de cisteína intracelular (Figura 22).

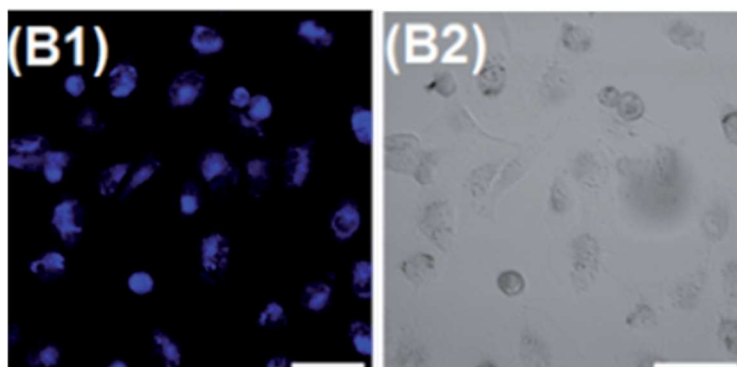
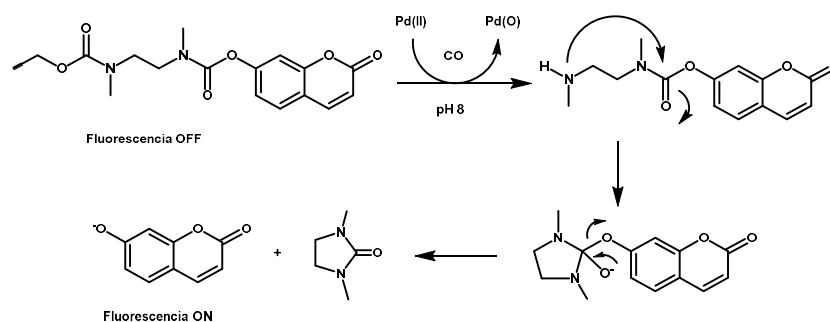


Figura 22: Imagen de la cisteína intracelular en línea celular de carcinoma de riñón humano 786-O, antes y después de ser incubada con el sensor.⁹³

En la bibliografía aparecen dos referencias sobre el uso de derivados de cumarinas para la detección de CO. Ambas se basan en el mismo principio, la capacidad del CO de reducir el Pd(II) a Pd(0) y la catálisis de esta especie en distintos procesos.

Dhara *et al.* desarrollaron el sensor que se muestra en el Esquema 17.⁹⁴ La sonda mostró una fluorescencia muy débil ($\phi = 3.4 \cdot 10^{-3}$) ya que el grupo hidroxilo de la cumarina fue funcionalizado por derivados alílicos de carbamatos, sin embargo, se transformó en un resto cumarina libre altamente fluorescente ($\phi = 4.467 \cdot 10^{-1}$) en presencia de CO y Pd(PPh₃)₄. La propuesta de mecanismo de detección está basada en un proceso de ciclación eliminación que se inicia por la presencia de especies de Pd(0).



Esquema 17: Propuesta de mecanismo para el sensor de Dhara.⁹⁴

Finalmente, para visualizar los niveles de CO en células vivas se estudiaron células de carcinoma de pulmón humano A549, que se incubaron con la sonda molecular y CORM-3 (como fuente de CO) en presencia de PdCl₂. Las sondas no mostraron ningún efecto citotóxico

significativo y la detección de CO intracelular fue evidente mediante el uso de microscopía confocal.

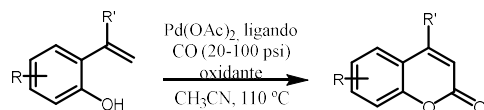
4.1.2.2 Síntesis de cumarinas mediante reacciones de carbonilación

La síntesis de cumarinas y de sus derivados es un área de gran interés por el inmenso número de compuestos de esta familia y el amplio espectro de actividades biológicas que presentan, tal y como se ha descrito anteriormente. Hay mucha bibliografía sobre procedimientos clásicos de síntesis entre los que podemos destacar las reacciones de condensación de Pechmann, Perkin, Knoevenagel, Reformatsky o Wittig.⁹⁵

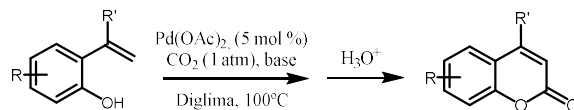
Sin embargo, dado nuestro interés en el desarrollo de un dosímetro para la detección de CO, decidimos centrar nuestra atención en métodos de síntesis de cumarinas que implicaran en reacciones de carbonilación.⁹⁶

En 1993, Kalck *et al.* describieron un interesante proceso de carbonilación a partir de *orto*-alquenilfenoles, catalizado por Pd (II)⁹⁷ desde entonces, distintas variantes de este procedimiento han sido utilizadas en muchas ocasiones (Esquema **18**).

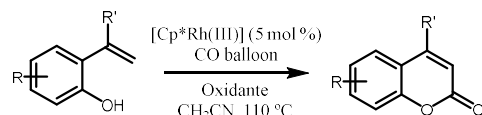
a) Alper: Ciclocarbonilación oxidativa catalizada por Pd



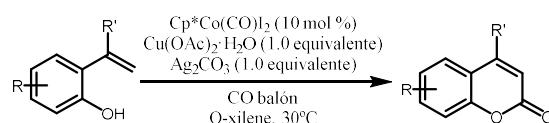
b) Iwasawa: Carbonilación catalizada por Pd



c) Mascareñas y Gulías: Ciclocarbonilación oxidativa catalizada $\text{Cp}^*\text{Rh}(\text{III})$



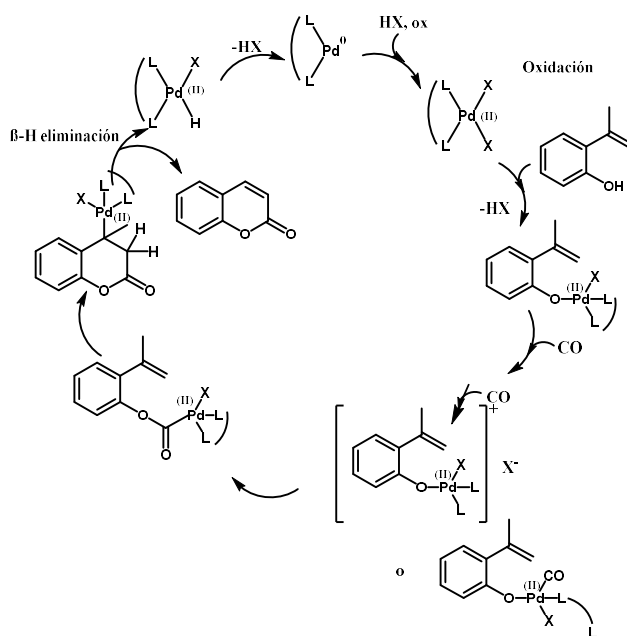
d) Kalck: Ciclocarbonilación oxidativa catalizada $\text{Cp}^*\text{Co}(\text{III})$



Esquema 18: Síntesis de cumarinas partiendo de alquenilfenoles.

Alper *et al.* realizaron este proceso de carbonilación utilizando CO bajo presiones relativamente elevadas,⁹⁸ pero también puede realizarse con CO_2 .⁹⁹ Por otro lado, Mascareñas y Gulías utilizan $\text{Cp}^*\text{Rh}(\text{III})$ como catalizador,¹⁰⁰ mientras que Kalck *et al.* utilizan el mismo catalizador pero de cobalto.¹⁰¹ Parece que las mejoras que se van introduciendo implican unas condiciones más suaves de reacción por lo que cada vez más grupos funcionales son capaces de tolerarlas. Es importante destacar que la presión de un globo lleno de CO es suficiente para mantener una alta reactividad, como se observa en los dos últimos procedimientos descritos en el Esquema 18. En todos los casos se proponen ciclos catalíticos oxidativos como se muestra en el Esquema 19. Según describen los autores,⁹⁸ el mecanismo de la

ciclocarbonilación oxidativa de 2-vinilfenoles catalizada por Pd(II) se iniciaría por la formación de un fenóxido de Pd(II) a través de una reacción de intercambio de ligando entre el fenol y uno de los acetatos unidos al paladio, con pérdida de ácido acético. Este complejo reacciona con CO formándose un nuevo complejo en el que el monóxido de carbono está unido al metal. Posteriormente se produce una transposición del monóxido de carbono y éste se inserta en el enlace Pd-O del fenóxido para dar una especie de fenoxicarbonil paladio (II). A continuación se produce la inserción del grupo vinilo en el enlace Pd-CO dando lugar a una especie intermedia de alquilpaladio que finalmente experimenta una reacción de β -eliminación de hidruro para dar lugar a la cumarina y a una especie de Pd(0) que se reoxida en presencia de aire de nuevo a Pd(II).



Esquema 19: Mecanismo propuesto por Alper et al.

Se han descrito procedimientos similares de inserción de CO para la formación de δ -lactonas desde *o*-arilfenoles^{102,103} lo que indica la amplitud de la metodología.

4.2 Objetivos

El objetivo global del presente capítulo es el diseño, síntesis y evaluación de un quimiodosímetro para la detección fluorescente de monóxido de carbono.

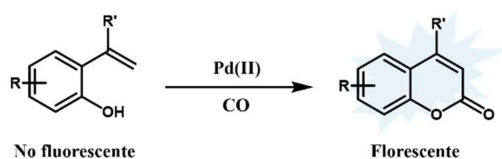
La estrategia se basará en detectar la presencia del monóxido de carbono mediante la aparición de fluorescencia debida a la generación *in situ* de cumarinas fluorescentes, a través de una reacción de carbonilación de un 2-alquenilfenol en presencia de Pd(II).

Los objetivos concretos que se plantean son:

- Síntesis y caracterización de 2-alquenilfenoles
- Preparación y evaluación de quimiodosímetros basados en 2-alquenilfenoles y Pd(II) para la detección fluorescente de CO a través de la formación de una cumarina.

4.3 Resultados y discusión

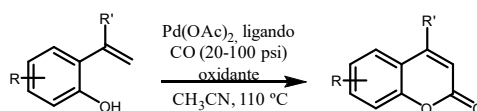
Como se ha mencionado anteriormente, dadas las interesantes propiedades fotofísicas de las cumarinas y la posibilidad de prepararlas por una reacción de carbonilación catalizada por Pd(II) a partir de 2-alquenilfenoles, se decidió diseñar un quimiodosímetro para la detección fluorescente de monóxido de carbono empleando un alquenilfenol adecuado en presencia de Pd(II). El mecanismo de detección se muestra en el Esquema 20.



Esquema 20: Mecanismo detección

4.3.1 Síntesis de 2-vinilfenoles

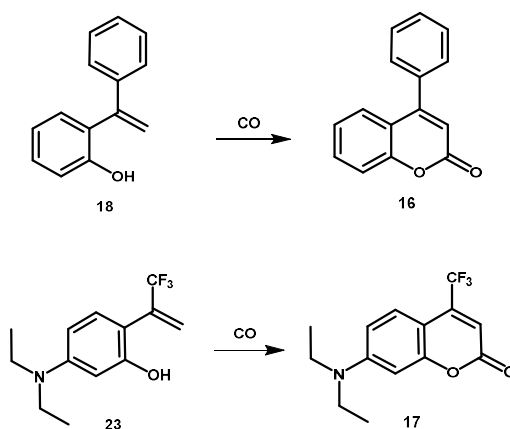
Para la síntesis de los 2-vinilfenoles decidimos basarnos en el trabajo publicado por Alper et al.⁹⁸ en el que sintetizan cumarinas a partir de 2-vinilfenoles, mediante una reacción de ciclocarbonilación oxidativa catalizada por Pd (II) y en presencia de aire como oxidante (Esquema 21).



Esquema 21: Síntesis de cumarinas partiendo de 2-alquenilfenoles.

Como 2-vinilfenol para el diseño del quimiodosímetro nos propusimos sintetizar el compuesto **23**, que en presencia de Pd(II) y de CO, conduciría a la cumarina **17** conocida como Cumarina-481 o

Cumarina-35. (Figura **23**) Esta cumarina fue escogida debido a sus excelentes propiedades fluorescentes descritas en la bibliografía (Esquema **22**).⁸⁷ Sin embargo, para poner a punto el sistema decidimos ensayar en primer lugar, la obtención de la cumarina **16** a partir del 2-vinilfenol **18**, CO y Pd (II), por ser ésta una de las cumarinas sintetizadas en el trabajo de Alper.⁹⁸

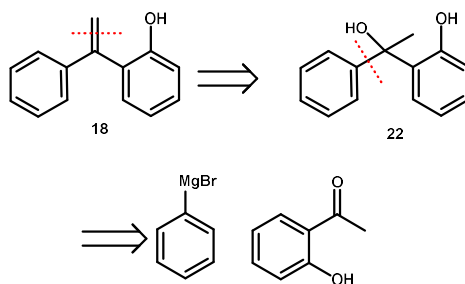


Esquema 22: Detección de las cumarinas **16** y **17** a partir de los 2-vinilfenoles **18** y **23**

Síntesis de 2-(1-fenilvinil)fenol **18**

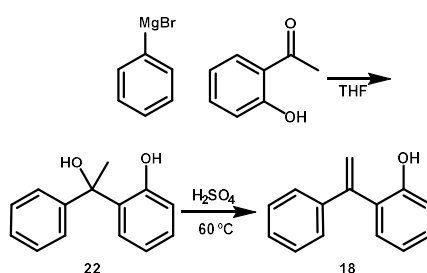
Se propuso la obtención del 2-alquenilfenol **18** por deshidratación del alcohol **22** (Esquema **23**), que a su vez se podría

obtener por adición de exceso de bromuro de fenilmagnesio a 2-hidroxiacetofenona.



Esquema 23: Análisis retrosintético para el precursor **18**.

Así pues, se hizo reaccionar 2-hidroxiacetofenona con 2 equivalentes de bromuro de fenilmagnesio en THF seco a 0 °C, añadiendo posteriormente ácido sulfúrico para llevar a cabo *in situ* la deshidratación del alcohol terciario **22** (Esquema **24**).¹⁰⁴



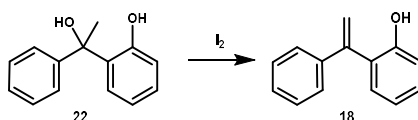
Esquema 24: Síntesis del compuesto **18**.

Dado que la reacción daba lugar a una mezcla muy difícil de separar y muy poco producto deseado, acorde a las señales de ¹H-RMN se decidió realizar la deshidratación en una etapa posterior a la

reacción de adición al carbonilo. De esta forma se pudo aislar el diol **22** con un 53 % de rendimiento.

Para llevar a cabo la deshidratación del alcohol terciario se probaron dos estrategias distintas.

En primer lugar, se intentó la deshidratación con H_2SO_4 , pero se obtuvieron varios productos secundarios, que no lograron separarse satisfactoriamente mediante cromatografía de columna. Por ello se decidió llevar a cabo la deshidratación haciendo uso de yodo como oxidante en atmósfera de argón, a reflujo en tolueno durante 5 horas (Esquema **25**).¹⁰⁵

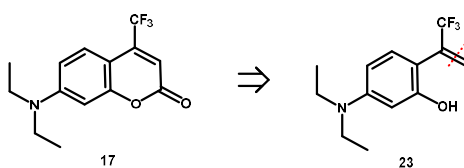


*Esquema 25: Síntesis de **18** con I_2 como oxidante.*

En este caso se pudo obtener el alqueno **18** sin necesidad de purificación y con un rendimiento del 58 %.

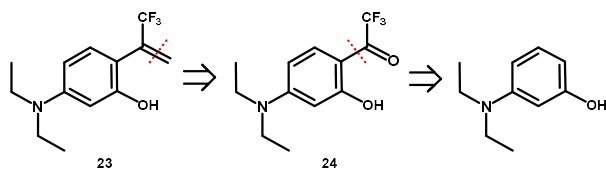
*Síntesis del vinilfenol **23***

El segundo 2-vinilfenol elegido para la preparación del quimiodosímetro fue el compuesto **23**, que en presencia de CO y Pd(II) daría lugar a la cumarina **17**.



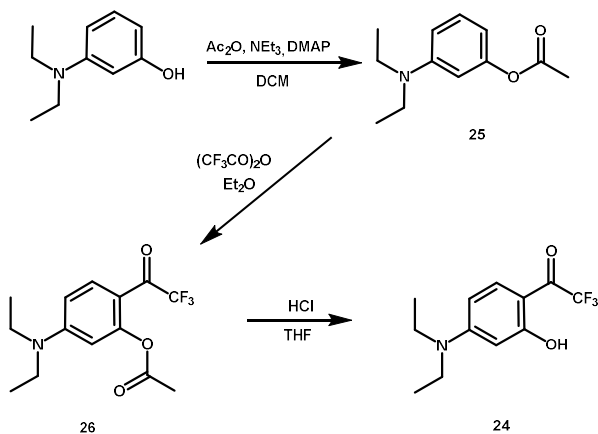
*Figura 23: retrosíntesis de la cumarina **17**.*

Para la síntesis del 2-vinilfenol **23**, se planteó la retrosíntesis que se muestra en el Esquema 26. Así, **23** se obtendría por una reacción de Wittig a partir de la cetona **24**, la cual se prepararía mediante una acilación de Friedel-Craft sobre 3-dietilaminofenol.



*Esquema 26: Retrosíntesis del precursor **23**.*

En primer lugar, se llevó a cabo la protección del hidroxilo fenólico en el 3-dietilaminofenol para obtener el acetato **25** (Esquema 27).

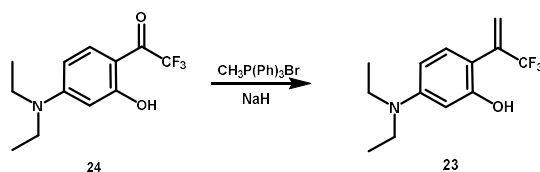


*Esquema 27: Síntesis del compuesto **24**.*

Una vez protegido el alcohol, se obtuvo la trifluorometilcetona **26** con un 56 % de rendimiento, por reacción del compuesto **25** con anhídrido trifluoroacético en éter a reflujo durante 3 horas.

Una vez obtenido el compuesto **26** se procedió a la desprotección del grupo alcohol mediante tratamiento con ácido clorhídrico 2 M. Tras este paso el compuesto se purificó mediante cromatografía en columna, obteniéndose **24** con un 82 % de rendimiento.

Una vez obtenido el compuesto **24** se procedió a sintetizar el alqueno **23** mediante una reacción de Wittig. Para ello, se preparó primero el correspondiente iluro de fósforo por reacción de $\text{CH}_3\text{P}(\text{Ph})_3\text{Br}$ con NaH en THF y a continuación se añadió el compuesto **24** (Esquema 28). Se ensayaron distintos tiempos de reacción, con el fin de optimizar el rendimiento. El mejor rendimiento (50 %) se obtuvo tras dejar reaccionar **24** y el iluro de fósforo durante 3 días.



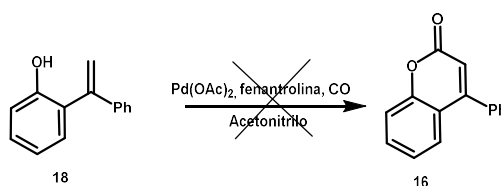
*Esquema 28: Obtención del compuesto **23** a partir de una reacción de Wittig.*

4.3.1 Estudio del empleo de los 2-vinilfenoles **18** y **23** y Pd(II) como posibles sondas para la detección de CO.

Una vez sintetizados los 2-vinilfenoles **18** y **23** se procedió a ensayar su uso, en presencia de Pd(II), para la detección fluorogénica de CO, mediante la formación de las respectivas cumarinas. Tal y como describen Ferguson et al., para que la reacción funcione se necesita la presencia de un ligando que coordine al Pd(II). La 1,10-fenantrolina

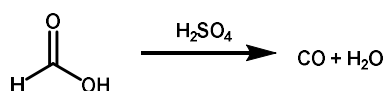
(Phen) es uno de los ligandos que da mejores resultados y, por ello, se decidió utilizarlo en los ensayos, en una relación equimolecular Pd/Phen. Para llevar a cabo los primeros ensayos se introdujo en un balón de reacción una disolución de compuesto **18**, Pd(OAc)₂ y fenantrolina en acetonitrilo. Posteriormente se burbujeó CO de una bala con una concentración de 1000 ppm (Esquema **29**).

En el ¹H-RMN se observó que la reacción no funcionó y además se observó un posible deterioro del producto de partida.



*Esquema 29: Reacción directa de **18** con paladio para dar lugar a la cumarina **16**.*

Con objeto de emplear una mayor concentración de CO, para llevar a cabo pruebas cualitativas de detección, se decidió generarlo a partir de la reacción entre ácido fórmico y ácido sulfúrico (Esquema **30**).

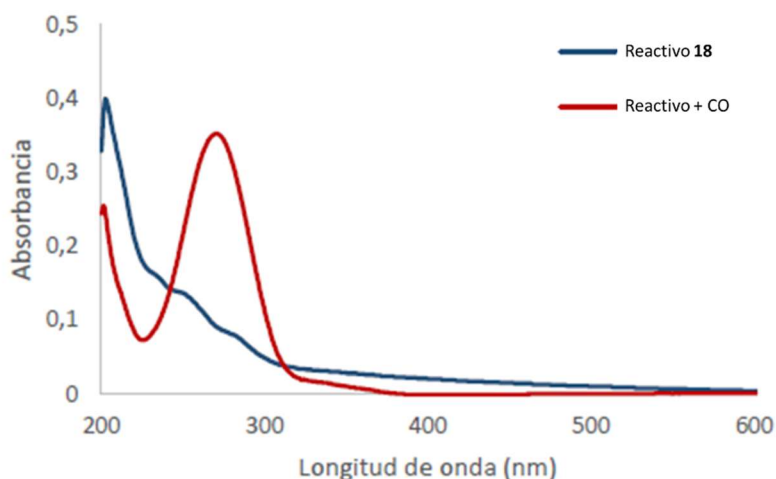


Esquema 30: Obtención de CO a partir de ácido fórmico.

El CO desprendido en la reacción se recogió en un balón, previamente purgado a vacío, de donde se extrajo el volumen deseado de gas con una jeringa para llevar a cabo los experimentos de detección.

Así pues, se hizo reaccionar una mezcla del 2-vinilfenol **16**, Pd(OAc)₂ y fenantrolina en acetonitrilo, con CO generado como se ha indicado anteriormente. Sin embargo, el análisis del espectro de ¹H-RMN del crudo no mostró la presencia de la cumarina deseada. Con objeto de intentar detectar la formación de la cumarina, aunque fuera en muy baja concentración, se decidió utilizar una técnica mucho más sensible, como es la espectroscopía de emisión de fluorescencia. Sin embargo, cuando se registró el correspondiente espectro de fluorescencia, no se observó la banda correspondiente a la cumarina en el espectro de emisión.

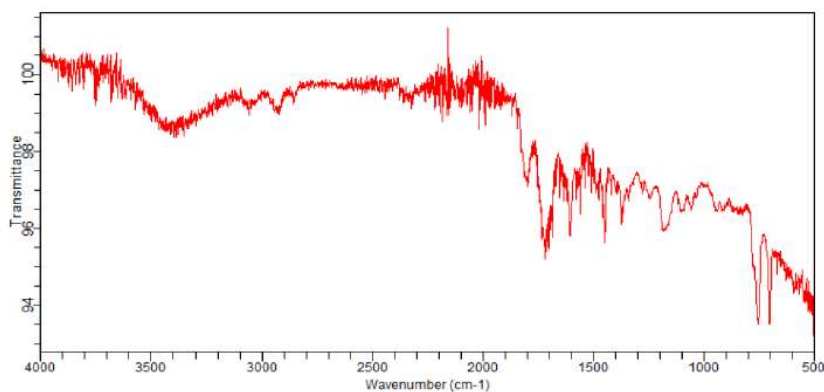
Tras esta prueba se decidió cambiar el disolvente y se escogió MeOH debido a que en la bibliografía se utiliza habitualmente.¹⁰⁶



Gráfica 6: Espectro UV-Vis de la reacción de **18** con CO para la obtención de **16**. Línea azul: **18** + fenantrolina + Pd(II). Línea roja una vez añadido el CO.

En el espectro de UV-Vis (Gráfica 6) se pudo observar ahora la aparición de una banda cerca de 300 nm que puede corresponder a la formación de la cumarina **16**.

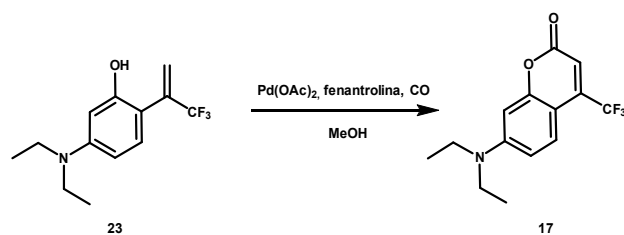
Para obtener información adicional, se realizó también un espectro de IR (Figura 24):



*Figura 24: Espectro IR de la reacción de **18** con CO para la obtención de **16**.*

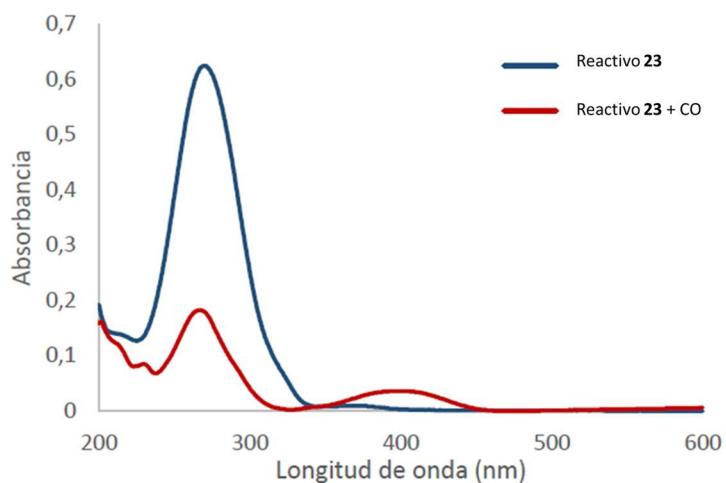
En el espectro se seguía observando la banda correspondiente al hidroxilo del producto de partida, pero también se pudo ver la aparición de una banda sobre 1700 cm^{-1} característica del grupo carbonilo, que correspondería a la cumarina formada.

De igual manera, se decidió estudiar mediante UV-Vis e IR la formación de la cumarina **17** a partir del 2-vinilfenol **23** empleando las condiciones anteriores (Esquema 31).



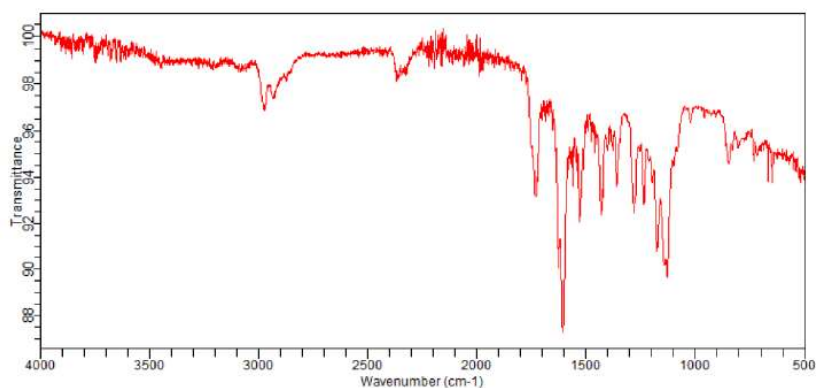
Esquema 31: Reacción directa de **26** con paladio para dar lugar a la cumarina **17**.

Como se observa en la Gráfica 7 el espectro de UV-Vis de **23** y Pd(II) en presencia de un exceso de CO mostró la presencia de un nuevo pico sobre 400 nm en la zona en la cual absorbe la cumarina **17**.⁸⁷



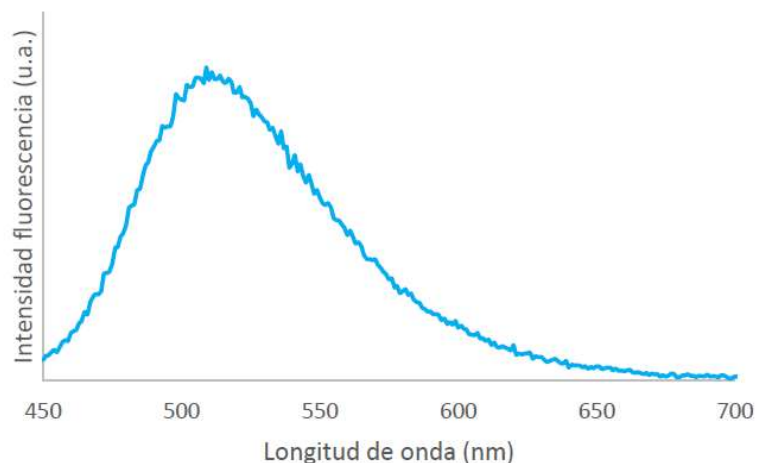
Gráfica 7: Espectro de UV-Vis del compuesto **23** con CO para la obtención de **17** Línea azul: **23** + fenantrolina + Pd(II). Línea roja una vez añadido el CO.

La aparición de la banda correspondiente al carbonilo en su espectro de IR también confirmó la presencia de cumarina (Figura 25).



*Figura 25: Espectro de IR de la reacción de **23** con CO para la obtención de **17**.*

En este caso, dado que está descrito que la cumarina **17** presenta una fluorescencia intensa a 512 nm, se procedió a registrar el espectro de emisión de fluorescencia del producto de la reacción, que se muestra en la Gráfica 8. El máximo de emisión de esta cumarina en MeOH, irradiando a 400 nm, se observó a 514 nm, que coincide con el máximo de emisión en este mismo disolvente descrito en la bibliografía.⁸⁷ Así pues, pudimos comprobar que en MeOH nuestro quimiodosímetro era capaz de detectar la presencia de CO mediante cambios de fluorescencia.



*Gráfica 8: Espectro fluorescencia de la cumarina **17** obtenida a partir de **23***

Con la finalidad de poder cuantificar de forma más exacta la cantidad de CO detectada por nuestro quimiódosímetro, se intentó hacer uso de moléculas que, en determinadas condiciones, liberan CO en disolución, también conocidas como CORM de sus siglas en inglés CO-releasing molecules. En concreto, decidimos ensayar el empleo de CORM-3 [Ru(CO)₃Cl(glicinato)] (Figura **26**) que es soluble en agua y con una liberación lenta y controlada de CO, en la reacción con **23** y Pd(II)/Phen para obtener la cumarina **17**. Estas reacciones se llevaron a cabo directamente en las cubetas de fluorescencia. Para ello se introdujeron todos los reactivos excepto el CORM-3 que se añadió en último lugar y se termostató la reacción a 37°C, midiendo la fluorescencia de la mezcla tras 12 horas. Sin embargo, ninguna de las reacciones llevadas a cabo (se probaron distintas concentraciones de

CO: de 50 a 100 μM) con CORM-3 (10^{-3} M en H_2O) dio lugar a la cumarina esperada.

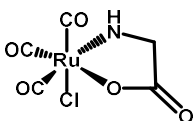
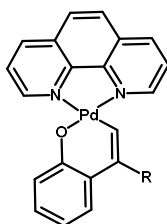


Figura 26: Estructura de CORM-3.

4.3.2 Segunda aproximación al diseño de un quimiodosímetro de CO: Empleo de un complejo preformado entre el 2-vinilfenol, Pd(II) y fenantrolina.

Para poder llevar a cabo la reacción de detección de CO de una manera más sencilla, e intentar mejorar la sensibilidad, se propuso sintetizar y aislar previamente el complejo formado entre el correspondiente 2-vinilfenol, Pd(II) y fenantrolina.

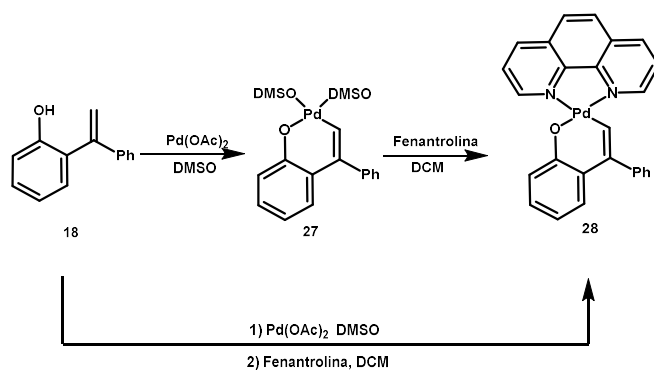


Esquema 32: Complejo preformado entre el 2-vinilfenol, Pd(II) y la fenantrolina.

Este tipo de complejos intermedios de Pd(II) se postulan en la reacción de carbonilación descrita por Ferguson.⁹⁸ Por otro lado, en la bibliografía¹⁰⁷ se describe el aislamiento de algunos complejos intermedios semejantes.

4.3.2.1 Síntesis de los complejos

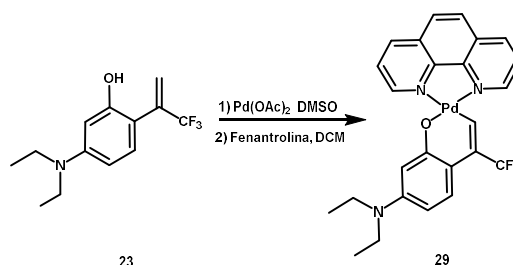
En un primer lugar se intentó realizar la síntesis de los complejos de Pd(II) correspondientes mediante una ruta sintética de dos pasos.⁹⁹ Así, por ejemplo, para la síntesis del complejo entre el vinilfenol **18** y Pd(II), en el primer paso de reacción se formaría el compuesto **27** con dos moléculas de DMSO coordinadas al Pd(II), que se aislaría y caracterizaría para posteriormente sintetizar el compuesto **28**, reemplazando las dos moléculas de DMSO por una molécula de fenantrolina (Esquema **33**). Sin embargo, debido a la imposibilidad de aislar el compuesto **27**, se llevaron a cabo las dos reacciones sucesivamente.



Esquema 33: Primera aproximación de síntesis del complejo 28.

Así pues, se hizo reaccionar el compuesto **18** en DCM con un equivalente de Pd(OAc)₂ y 2 equivalentes de DMSO. Transcurridos 40 min se añadió un equivalente de fenantrolina. El complejo de paladio correspondiente se aisló por filtración a vacío con un 78 % de rendimiento.

Una vez obtenido el complejo **28** se procedió a sintetizar el complejo correspondiente entre el vinilfenol **23**, Pd(II) y fenantrolina siguiendo el mismo procedimiento, obteniéndose el producto deseado **29** con un rendimiento del 80 %. Ambos compuestos fueron debidamente caracterizados mediante espectroscopía de ^1H -RMN.



Esquema 34: Síntesis del complejo 29.

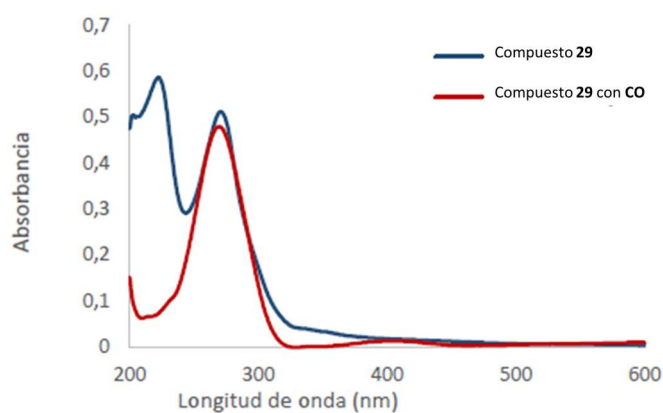
4.3.2.2 Ensayos del empleo de los complejos **28** y **29** como posibles sondas para la detección fluorescente de CO.

Los experimentos para evaluar la eficacia de los complejos **28** y **29** como sensores de CO se realizaron de manera semejante a los empleados previamente con la mezcla de los vinilfenoles **18** o **23**, Pd(II) y fenantrolina.

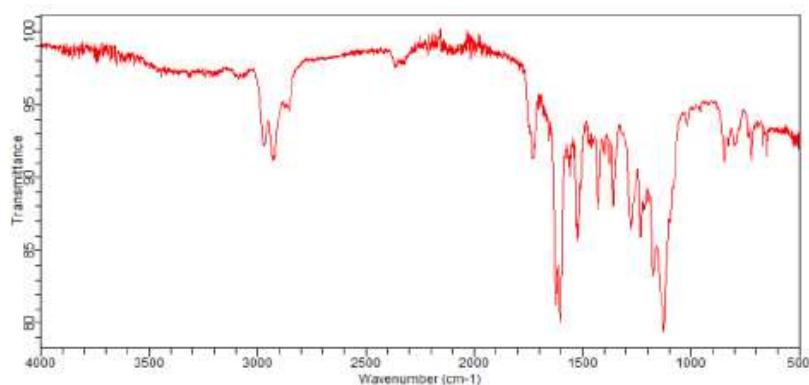
Así pues, se hizo reaccionar el complejo correspondiente, disuelto en DCM y a temperatura ambiente, con un exceso de CO obtenido directamente de una bala de 1000 ppm. Tras 10 minutos, se evaporó el disolvente y el crudo se redisolvió en MeOH para llevar a cabo las medidas de fluorescencia.

Cuando se ensayó el complejo **28**, el correspondiente espectro de UV-Vis no mostró ninguna variación significativa en las bandas del complejo con lo cual no se pudo extraer información.

Cuando se realizó el mismo experimento empleando el complejo **29**, se pudo observar claramente en el espectro de UV-Vis la aparición de una nueva banda a alrededor de 400 nm correspondiente a la formación de la cumarina correspondiente (Gráfica 9). Además, en el espectro de IR se observó también la aparición de la banda correspondiente al carbonilo (Figura 27).

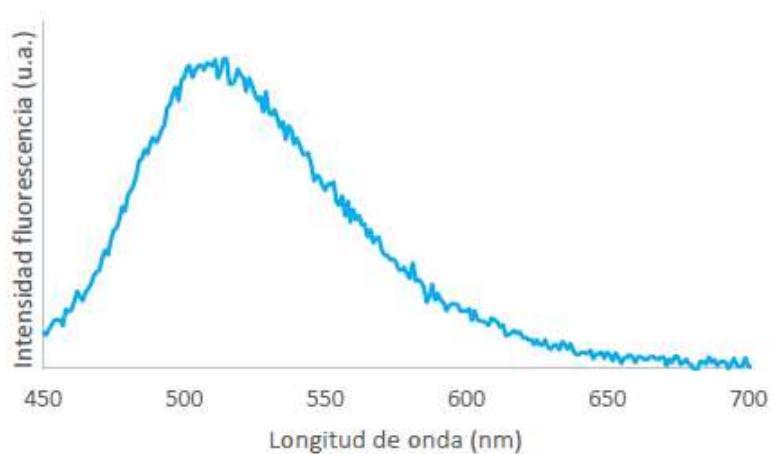


*Gráfica 9: Espectro de UV-Vis de la reacción del complejo **29** con CO.*



*Figura 27: Espectro de IR de la reacción del complejo **29** con CO.*

Para evaluar el comportamiento del complejo **29** como quimiosímetro para la detección fluorescente de CO, se registró el correspondiente espectro de fluorescencia en metanol. (Gráfica **10**), observándose el máximo de emisión a 514 nm (irradiando a 400 nm característico de la cumarina **17**).



*Gráfica 10: Espectro de fluorescencia de la reacción de **29** con CO.*

Además, en este caso el cambio de fluorescencia era visible a simple vista bajo una lámpara de UV a 254 nm, como se muestra en la Figura 28.



Figura 28: Cambio de fluorescencia ($10^{-5}M$ y $10^{-4} M$ de **23** en MeOH) antes y después de la exposición a CO

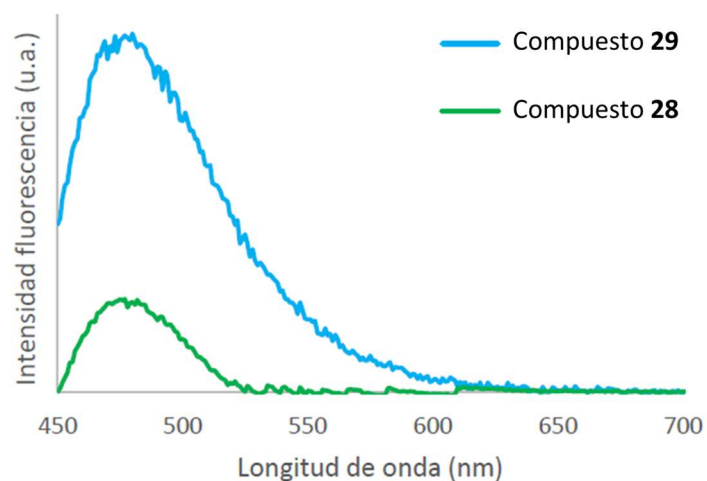
Por último, para estimar de manera más precisa la respuesta de los quimiosímetros frente al CO y evaluar la sensibilidad del método, se decidió utilizar un caudalímetro, diseñado por el IDM, el cual nos permitió burbujear sobre las disoluciones de los complejos **28** y **29** concentraciones bien definidas de CO.

El sistema en cuestión que se utilizó es un sistema consistente en dos caudalímetros controlados por medio de una aplicación informática. Uno de los caudalímetros se encuentra conectado a la bala de CO de 1000 ppm de concentración, y otro conectado a una bala de nitrógeno puro para diluir el gas. La salida de ambos caudalímetros está conectada a un recipiente de mezcla de gases con tres olivas. La tercera oliva se conecta a una aguja que permite burbujear el gas en la solución deseada(Figura 29).



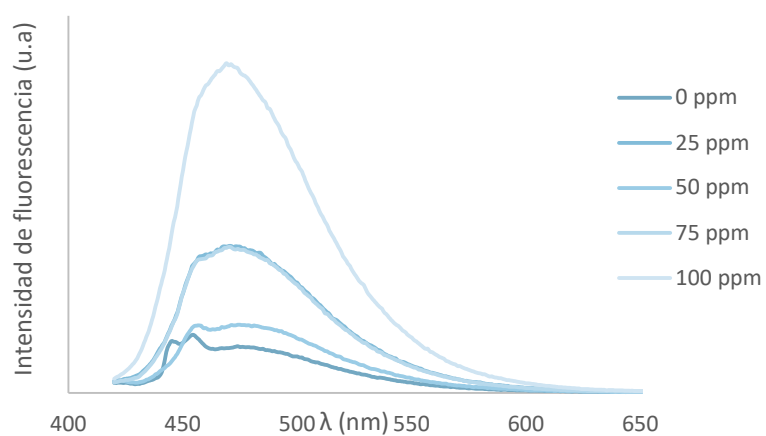
Figura 29: Sistema de caudalímetro empleado en las medidas con gases.

Así pues, para comparar la sensibilidad a la detección de CO por parte de los complejos **28** y **29**, se hizo reaccionar una disolución de cada complejo en MeOH (10^{-4} M) con 800 ppm de CO durante 10 min y se registraron los correspondientes espectros de emisión de fluorescencia. Este experimento dio lugar a mejores resultados por parte del complejo preformado **29**, siendo su fluorescencia y por tanto su capacidad para detectar CO, 3 veces mayor (Gráfica **11**). Por ello se decidió continuar los estudios únicamente con este compuesto.



Gráfica 11: Espectros de fluorescencia de la reacción de **28** y **29** con CO en MeOH.
 $\lambda_{exc} = 400 \text{ nm}$.

Para determinar el tiempo de espera tras burbujear el CO en la disolución para llevar a cabo la medida y obtener una fluorescencia máxima se realizaron una serie de cinéticas a distintos tiempos y se observó que el tiempo óptimo para las medidas era de 60 minutos. Así pues, para realizar cada una de las medidas, se burbujeó CO a través de la disolución metanólica del complejo en la cubeta durante 10 minutos y, al acabar este tiempo, se procedió a enrasar de nuevo con más disolvente el volumen de la disolución hasta el volumen original. Se tapó la cubeta y pasados 60 minutos se realizó la medida de emisión de fluorescencia en el fluorímetro con una longitud de onda de excitación de 400 nm registrando los espectros de fluorescencia a distintas concentraciones de CO.



Gráfica 12: Medidas fluorescencia complejo **29** con CO.

Como se observa en la Gráfica **12** el quimiodosímetro **29** es capaz de detectar la presencia de CO a concentraciones por encima de 50 ppm. Por falta de tiempo no se pudo hacer un mayor número de medidas para estimar el límite de detección.

4.4 Conclusiones

En este capítulo se ha abordado el diseño de un dosímetro para la detección fluorescente de CO en estado gaseoso, empleando una reacción de carbonilación de 2-vinilfenoles, catalizada por Pd(II), que da lugar a la formación de cumarinas fluorescentes. Para ello se han empleado dos aproximaciones, una de ellas empleando como quimiodosímetro una mezcla de 2-vinilfenol y fenantrolina, en presencia de una cantidad catalítica de Pd(II) y otra en el que se ha sintetizado un complejo entre el 2-vinilfenol, Pd(II) y fenantrolina.

Este último dosímetro ha permitido la detección fluorescente de CO tanto mediante el empleo de un fluorímetro, como a simple vista bajo una lámpara de UV-Vis.

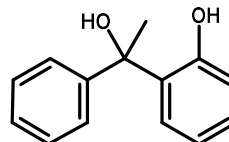
Para futuras investigaciones se deben realizar los experimentos pertinentes para evaluar el límite de detección del dosímetro, así como experimentos de selectividad con otros gases que pudieran actuar como interferentes.

4.5 Procedimiento experimental

4.5.1 Síntesis de moléculas precursoras

Obtención de 2-(1-hidroxi-1-feniletil)fenol (**22**)

En un balón de fondo redondo de 100 mL de 2 bocas bajo atmósfera de argón y provisto de agitación magnética se disolvió 2-hidroxiacetofenona (3.6 mL, 30 mmol) en 50 mL de THF seco. Se enfrió la mezcla con ayuda de un baño de hielo y, una vez fría, se le añadió bromuro de fenilmagnesio (20 mL, 60 mmol). Se dejó la mezcla de reacción en agitación durante toda la noche a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se añadió cloruro amónico saturado, se evaporó el THF y se redisolvió la mezcla resultante en éter para lavarla con H₂O. La fase orgánica se secó sobre MgSO₄ anhidrido, se filtró y se evaporó el disolvente a vacío.

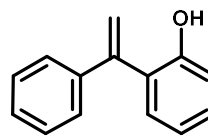


El producto se purificó por cromatografía de columna cromatográfica, utilizando sílica gel como fase estacionaria y como eluyente una mezcla de hexano/éter dietílico 7:3, obteniendo finalmente 3.38 g del alcohol **22** (53 % de rendimiento). El producto se caracterizó por ¹H-RMN.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ = 8.36 (s, OH), 7.39-7.43 (m, 2H), 7.28-7.37 (m, 3H), 7.16-7.22 (m, 1H), 6.99 (dd, J = 8.0 Hz, 1.6 Hz, 1H), 6.80-6.88 (m, 2H), 2.84 (s, OH), 2.00 (s, 3H)

Obtención de 2-(1-fenilvinil)fenol (**18**)

En un matraz de fondo redondo de 50 mL de 2 bocas provisto de agitación magnética se disolvió **22** (3.06 g, 14.29 mmol) en 15 mL de tolueno seco. Una vez disuelto, se añadió yodo (14 mg, 0.055 mmol). La reacción se dejó a reflujo en atmósfera de argón durante 5 horas.



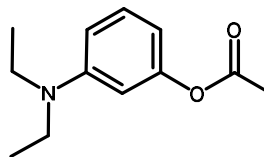
Una vez transcurrido el tiempo, se dejó enfriar y se llevó a cabo el tratamiento de la reacción, en la cual se hicieron dos lavados con $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ y uno con NaCl en un embudo de decantación y se recoge la fase orgánica, la cual se secó con MgSO_4 anhidrido, se filtró y se llevó a sequedad con ayuda del rotavapor. Se obtuvo el producto puro sin necesidad de pasar por columna con un rendimiento del 58 % (1.64 g).

^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) δ = 7.27-7.32 (m, 5H), 7.20 (ddd, J = 8.2 Hz, 7.3 Hz, 1.8 Hz, 1H), 7.08 (dd, J = 7.5 Hz, 1.7 Hz, 1H), 6.85-6.91 (m, 2H), 5.81 (s, 1H), 5.37 (s, 1H), 5.12 (s, OH).

^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3) δ = 153.52, 145.69, 139.92, 130.68, 129.38, 128.60 (2C), 128.35, 127.94, 127.05 (2C), 120.25, 116.53, 115.93.

Obtención de 3-(dietilamino)fenil acetato (**25**)

En un matraz de fondo redondo de 2 bocas de 100 mL provisto de agitación magnética y bajo atmósfera de argón se disolvió 3-dietilaminofenol (4.26 g, 25 mmol)



en 50 mL de DCM seco y seguidamente se adicionó anhídrido acético. (3.8 mL, 46 mmol) Tras 15 minutos se añadió DMAP (155 mg, 152 mmol) y, 15 minutos después, se añadió trietilamina (4.2 mL, 30 mmol) y se dejó reaccionar toda la noche.

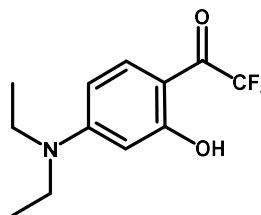
Una vez transcurrido el tiempo se llevó a cabo su extracción con NaHCO₃ saturado y salmuera. Se secó la fase orgánica con MgSO₄ anhídrido, se filtró y se eliminó el disolvente a vacío.

Para su purificación se llevó a cabo una cromatografía de columna usando como fase estacionaria sílica gel y como fase móvil una mezcla de hexano/ éter dietílico 7:3, obteniendo 2.91 g de **25** (56 % de rendimiento).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ = 7.13-7.27 (m, 1H), 6.54 (ddd, J = 8.5 Hz, 2.3 Hz, 1.1 Hz, 1H) , 6.32-3.40 (m, 2H) , 3.33 (q, J = 7.1 Hz, 4H) , 2.28 (s, 3H), 1.17 (t, J = 7.1 Hz, 6H).

Obtención de 1-(4-(dietilamino)-2-hidroxifenil)-2,2,2-trifluoroetan-1-ona (**26**)

En un matraz de fondo redondo de 100 mL de dos bocas provisto de agitación magnética se añadió compuesto **25** (3 g, 14.07 mmol) disuelto en 30 mL de dietiléter seco y seguidamente se añadió de TFAA (5 mL, 35.20



mmol). Se dejó la reacción en agitación y bajo atmósfera de argón durante 5 horas.

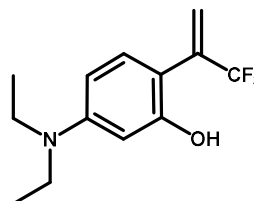
Transcurrido este tiempo, se eliminó y se redisolvió el compuesto **26** en 40 mL de THF en un matraz de dos bocas de 100 mL provisto de agitación magnética y se añadió 20 mL de HCl 2 M. Se dejó la mezcla de reacción a temperatura y presión ambientes durante toda la noche.

Se eliminó el THF a vacío, se redisolvieron en éter dietílico y se llevó a cabo extracciones con agua y salmuera. Tras esto, se secó la fase orgánica con MgSO₄ anhidrido, se filtró y se eliminó el disolvente con rotavapor. Se obtuvieron 3.04 g de **24** puro sin necesidad de llevar a cabo una separación cromatográfica (82 % de rendimiento).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ = 11.83 (s, OH), 7.57 (dq, J = 9.4 Hz, 2.4 Hz, 1H), 6.27 (dd, J = 9.5 Hz, 2.6 Hz, 1H), 6.12 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 3.44 (q, J = 7.2 Hz, 4H), 1.23 (t, J = 7.1 Hz, 6H).

**Obtención de 5-(dietilamino)-2-(3,3,3-trifluoroprop-1-en-2-yl)fenol
(23)**

En un matraz de fondo redondo de 3 bocas de 100 mL provisto de agitación magnética y bajo atmósfera de argón se añadió de NaH (60 %) (1.16 g, 29.12 mmol) y (Ph)₃PCH₃Br (5.20 g, 14.56 mmol), y se disolvieron en 40 mL de THF seco. Esta mezcla se dejó reaccionar durante 1 hora en un baño de hielo. Una vez transcurrido este tiempo, se quitó el baño de hielo y se añadió el compuesto **24** previamente disuelto en éter dietílico seco. Se dejó la mezcla de reacción durante 3 días. Pasado este tiempo se añadió NH₄Cl y se generaron gases. Una vez dejó de burbujear, se eliminó el THF y se realizó una extracción con Et₂O. La fase orgánica se secó con MgSO₄ anhidrido, se filtró y se eliminó el disolvente a vacío.



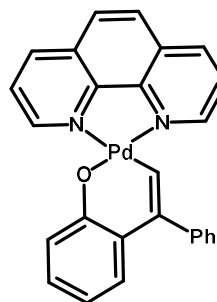
Para su purificación se realizó una cromatografía con sílica gel como fase estacionaria y empleando una mezcla de hexano/AcOEt 7:3 como eluyente, obteniéndose 950 mg de **23** (50 % de rendimiento).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ = 7.05 (d, J = 9.5 Hz, 1H), 6.22-6.29 (m, 2H), 5.69 (s, 1H), 6.14 (s, 1H), 3.34 (q, J = 7.1 Hz, 4H), 5.13 (sa, OH), 1.17 (t, J = 7.1 Hz, 6H).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ = 154.59, 149.75, 130.57, 125.10, 122.95, 121.46, 106.90, 104.36, 98.41, 44.45 (2C), 12.72 (2C).

Obtención del complejo 28

En un matraz de fondo redondo de 3 bocas de 50 mL provisto de agitación magnética y bajo atmósfera de argón se añadió **18** (165 mg, 0.84 mmol), disuelto en 5 mL DCM y se añadió de Pd(OAc)₂ (180 mg, 0.84 mmol) y DMSO (0.12 mL, 1.68 mmol). Esta mezcla se dejó reaccionar durante 40 minutos para formar un pre-complejo con DMSO y, una vez transcurrido este tiempo, se añadió fenantrolina (151 mg, 0.84 mmol) para la formación del complejo final. Se dejó la reacción en agitación durante la noche.

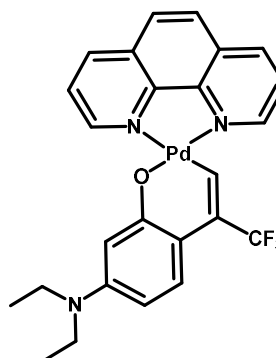


Para el aislamiento de este complejo, se llevó a cabo una filtración a vacío lavando con éter dietílico, obteniendo 314 mg de un sólido de color naranja (78 % de rendimiento).

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-d₆) δ =9.38 (dd, J = 4.3 Hz, 1.2 Hz, 1H), 9.31 (d, J = 5.1 Hz, 1H), 8.88-8.94 (m, 2H), 8.23-8.29 (m, 3H), 8.06-8.08 (m, 1H), 7.38-7.43 (m, 2H), 7.28-7.33 (m, 3H), 7.03-7.06 (m, 1H), 6.93-6.99 (m, 1H), 6.76 (dd, J = 8.0 Hz, 1.4 Hz, 1H), 6.46 (s, 1H), 6.31-6.36 (m, 1H),

Obtención del complejo 29

En un matraz de fondo redondo de 3 bocas de 50 mL provisto de agitación magnética y bajo atmósfera de argón se añadió **23** (123 mg, 0.47 mmol) disueltos en 5 mL en DCM y a continuación se añadió Pd(OAc)₂ (106 mg, 0.47 mmol) y DMSO (0.07 mL, 0.94 mmol). Se dejó reaccionar la mezcla durante 40 minutos y, a continuación, se añadió fenantrolina (85 mg, 0.47 mmol), dejando la reacción en agitación durante la noche.

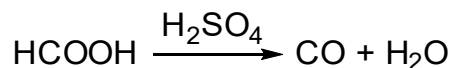


Al día siguiente se paró la reacción y se aisló el complejo mediante filtración a vacío lavando con éter dietílico, obteniendo 188 mg de un sólido de color rojo **29** (80 % de rendimiento).

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-d₆) δ = 9.04 (ddd, J = 12.6 Hz, 5.1 Hz, 1.3 Hz, 2H) , 8.69 (d, 8.2 Hz, 2H), 8.01-8.07 (m, 3H) , 7.93 (dd, J = 8.2 Hz, 5.2 Hz, 1H), 7.13 (dd, J = 8.9 Hz, 2.3 Hz, 1H) , 7.07 (s, 1H), 6.28 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 6.02 (dd, J = 9.0 Hz, 2.7 Hz, 1H), 3.35 (q, J = 7.0 Hz, 4H), 1.15 (t, J = 7.0 Hz, 6H).

4.5.2 Procedimiento para la generación de CO

La generación de CO (g) en el laboratorio se llevó a cabo a partir de la siguiente reacción:



Para ello, se realizó un montaje (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**) con dos matraces de fondo redondo de 250 mL como el que se muestra en la **Figura 30**.

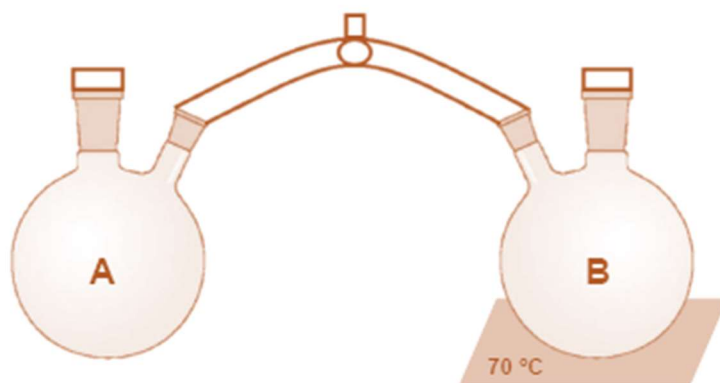


Figura 30: Montaje para la formación de CO.

En primer lugar, se hizo el vacío en ambos matraces. Una vez hecho el vacío, en el matraz B del montaje, el cual estaba provisto de un agitador magnético se añadieron 0.83 mL (15 mmol) de H₂SO₄ (96 %) y 0.6 mL (15 mmol) de HCOOH (95 %) y se calentó a 70 °C. Se dejó reaccionar unos minutos para que se generase CO. Para llevar a cabo la recogida del CO, se abrió la llave para permitir que el CO pase al

matraz A. A continuación, se cerró la llave y se recogió el CO generado con ayuda de una jeringuilla.

4.5.3 Ensayos de detección de CO

Detección de CO a partir de la mezcla de **18 y **23**, Pd(II) y fenantrolina**

Se disolvieron **18** o **23** (50 mg, 0.255 mmol) en 50 mL de DCM en un matraz de fondo redondo de 250 mL provisto de agitación magnética, y se añadió una cantidad catalítica (10 %) de Pd(OAc)₂ y de fenantrolina. A continuación, a la mezcla de reacción se le burbujeó CO en exceso de una bala de CO de 1000 ppm de concentración durante un tiempo adecuado y se dejó en agitación durante toda la noche. Una vez transcurrido este tiempo, se secó el disolvente a vacío y, a continuación, se le añadió Et₂O debido a que las cumarinas son solubles en él mientras que los complejos de Pd no lo son. Se traspasó al matraz y se volvió a llevar a sequedad. Por último, el crudo obtenido se disolvió en MeOH y se llevó a cabo su estudio por espectroscopía UV-Vis e infrarroja. En el caso del vinilfenol **23**, se registró el estudio mediante espectroscopía de emisión de fluorescencia. Para ello, el crudo de reacción obtenido directamente se filtró y se diluyó con MeOH.

En base a la capacidad fluorescente de este compuesto y a su gran interés, se vuelve a realizar la reacción de detección de CO, pero esta vez el crudo de reacción obtenido se filtró y se diluyó con MeOH para ser directamente estudiado por espectroscopía de fluorescencia.

Detección de CO a partir de los complejos 28 y 29

Para los experimentos de detección de CO mediante espectroscopía UV-Vis y de fluorescencia se prepararon disoluciones de **28** y **29** en MeOH de concentración 10^{-5} M en cubetas de fluorescencia.

Una vez preparada la disolución se burbujeó la cantidad necesaria de CO con el caudalímetro y se dejó reaccionar durante 10 minutos. A continuación, se registraron los correspondientes espectros de absorción UV-vis y emisión de fluorescencia.

Capítulo 5: Quimiosensores para la
detección colorimétrica de serotonina
basados en nanopartículas de oro
funcionalizadas con ciclodextrinas

5.1. Introducción

El diseño de sensores cada vez más eficaces se está apoyando mucho en el desarrollo de materiales novedosos que mejoren los procesos de reconocimiento y transducción. Los nanomateriales, que son materiales con un tamaño normalmente en el rango de 5–100 nm, presentan propiedades fisicoquímicas únicas que pueden ser de gran utilidad para esta finalidad. Las nanopartículas de oro (AuNPs) son un tipo de nanomateriales con unas propiedades físicas y químicas que las convierten en excelentes soportes para la fabricación de nuevos sensores químicos y biológicos (Figura 31).^{108–110}

- Las AuNPs pueden sintetizarse de manera sencilla y tienen una estabilidad relativa bastante elevada.
- Poseen propiedades optoelectrónicas únicas que se pueden ajustar fácilmente variando su tamaño, forma y entorno químico.
- Proporcionan una alta relación superficie/volumen con una excelente biocompatibilidad si se utilizan los ligandos apropiados.

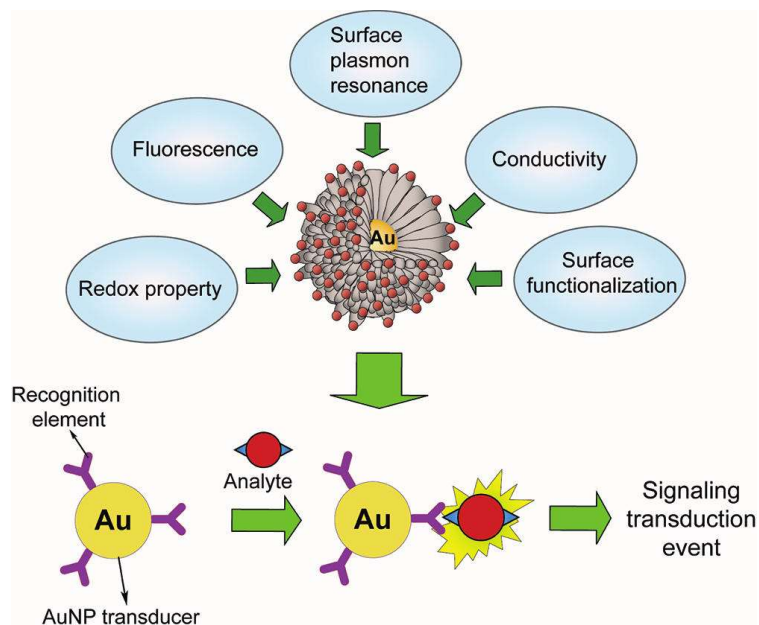


Figura 31: Propiedades físicas de las AuNPs y una ilustración esquemática del proceso de detección.

Las AuNPs pueden ser funcionalizadas con una amplia gama de ligandos orgánicos para la unión selectiva y la detección de moléculas pequeñas y dianas biológicas. Una de las propiedades más utilizadas en detección es la variación de la banda de plasmón de superficie que se produce en procesos de agregación, como se comentará a continuación. Todas y cada una de estas propiedades han permitido a los investigadores desarrollar estrategias de detección novedosas con una sensibilidad, estabilidad y selectividad mejoradas.

5.1.1. Síntesis y funcionalización de las AuNPs

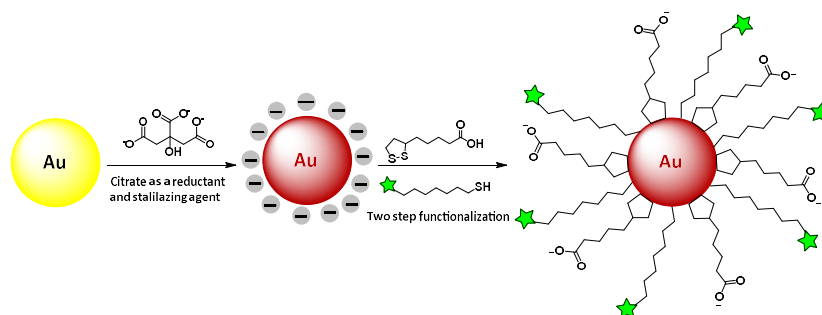
Se han publicado numerosos métodos de preparación de AuNPs, incluidos los enfoques que se han denominado “top-down” (manipulación física) y “bottom-up” (transformación química). Durante las últimas dos décadas, se ha realizado un esfuerzo considerable para la síntesis de AuNPs, centrándose en el control del tamaño, la forma, la solubilidad, la estabilidad y la funcionalidad. Vale la pena señalar que los términos coloide y racimo se usan indistintamente con frecuencia; el primero se refiere generalmente a partículas que tienen diámetros superiores a 10 nm, mientras que el último se refiere comúnmente a partículas más pequeñas. Los métodos más extendidos para generar AuNPs son principalmente dos, ambos de ellos empleando una sal de Au(III) como fuente de oro: Aquellos basados en el empleo de citrato como agente reductor y estabilizante, que permite la obtención de dispersiones coloidales estables en medio acuoso y los basados en la reducción con NaBH_4 en un medio bifásico y posterior estabilización de las partículas de oro con tioles orgánicos, que forman dispersiones estables en medios orgánicos, aunque en la actualidad existen numerosas variantes de ambos métodos.

Métodos basados en la estabilización con citrato

La primera síntesis preparativa de lo que se denominó oro coloidal se remonta al trabajo de Michael Faraday en 1857, mediante

la reducción de una solución acuosa de cloroaurato con fósforo disuelto en disulfuro de carbono.

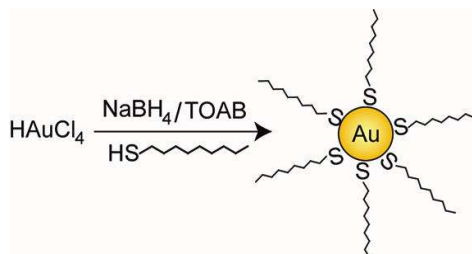
En 1951, Turkevich *et al.* desarrollaron un método sintético para crear AuNPs mediante el tratamiento de tetracloroaurato de hidrógeno (HAuCl_4) con ácido cítrico en agua hirviendo, donde el citrato actúa como agente reductor y estabilizador.¹¹¹ Frens perfeccionó aún más este método cambiando la proporción oro/citrato para controlar el tamaño de las partículas.¹¹² Este protocolo se ha empleado ampliamente para preparar suspensiones coloidales diluidas de AuNPs esféricas moderadamente estables con diámetros de 10 a 20 nm, aunque también se pueden preparar AuNPs más grandes (por ejemplo, 100 nm). Estas AuNPs estabilizadas con citrato se pueden funcionalizar después con diversas moléculas orgánicas, mediante un proceso de intercambio de ligandos, empleando ligandos tiolados que se unen fuertemente a la superficie de las nanopartículas a través de la formación de enlaces Au-S. Durante este proceso, las AuNPs pueden sufrir agregación irreversible; por ello se han desarrollado varias estrategias para superar este problema, incluido el uso de un tensioactivo, Tween 20, antes de la modificación para evitar la agregación, o el uso de ácido lipoico como intermedio mediante una funcionalización en dos pasos (Esquema 35).¹¹³



Esquema 35: Síntesis de AuNPs basadas en el método de Turkevich.

Métodos basados en la reducción con borohidruro sódico y estabilización con tioles

Después del intento inicial de Giersig y Mulcaney¹¹⁴ de estabilizar las AuNPs con alcanotioles, Brust y Schiffrin¹¹⁵ lograron un avance significativo en el campo de la síntesis de AuNPs en 1994. Estos autores publicaron una estrategia sintética de dos pasos, utilizando las fuertes interacciones tiol-oro para proteger las AuNPs con ligandos de tiol. En este método, se transfiere la sal AuCl_4^- de la fase acuosa a tolueno usando bromuro de tetraoctilamonio (TOAB) como tensoactivo, y luego se reduce con borohidruro de sodio (NaBH_4) en presencia de dodecanotiol (Esquema 36).



Esquema 36: Síntesis de AuNPs por el método de Brust y Schiffrin.

Al añadir NaBH_4 , en la fase orgánica tiene lugar un rápido cambio de color de naranja a marrón oscuro. Las AuNPs se generan en tolueno con diámetros controlados en el rango de 1,5 a 5 nm. Estas AuNPs protegidas con tiol presentan una muy buena estabilidad en medio orgánico y se pueden manipular, caracterizar y funcionalizar fácilmente. Las nanopartículas se pueden secar completamente y luego volver a dispersar en disolventes orgánicos sin que se observe ningún proceso de agregación o descomposición.

5.1.2. Propiedades de las nanopartículas de oro.

Una de las propiedades optoelectrónicas más interesantes de las nanopartículas de oro, especialmente relacionada con su empleo en detección, es la llamada “resonancia de plasmón superficial localizada” (LSPR de sus siglas en inglés). Cuando una nanopartícula de un metal noble (como el oro) es irradiada con luz de longitud de onda comparable o mayor al tamaño de la nanopartícula, los electrones de la banda de conducción del metal experimentan una oscilación colectiva, absorbiendo luz (Figura **32**). Ello da lugar a la aparición de una banda de absorción intensa en la zona del visible, conocida como banda LSPR.^{116,117,118}

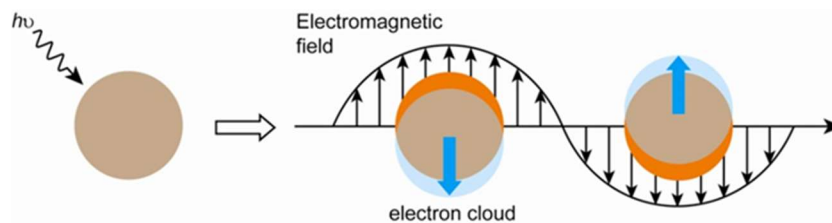


Figura 32: Representación esquemática de la oscilación de los electrones de conducción a través de las nanopartículas en el campo electromagnético de la luz incidente

La posición e intensidad de esta banda LSPR depende de la composición, forma y tamaño de las nanopartículas, el disolvente y la temperatura, así como de la distancia interpartícula. Las AuNPs esféricas en disolución acuosa exhiben un rango de color que puede ir desde el rojo al violeta, a medida que el tamaño del núcleo aumenta de 5 a 50 nm, con máximos de absorción entre 500 y 550 nm. En la siguiente tabla se muestran las longitudes de la banda de superficie de plasmón en función del tamaño de las nanopartículas.¹¹⁹

Diámetro (nm)	λ (nm)
8.9	517
14.8	520
21.7	521
48.3	533

Tabla 2: se muestran las longitudes de la banda de superficie de plasmón en función del tamaño de las nanopartículas.

Como se ha comentado anteriormente, la posición de la banda LSPR no solo depende del tamaño sino también por la forma de la nanopartícula y de la proximidad de otras nanopartículas.¹²⁰ La agregación de nanopartículas da como resultado un desplazamiento significativo hacia el rojo de la frecuencia de la banda de LSPR, así como un ensanchamiento de la banda y el consecuente cambio del color de la solución de rojo a azul debido al acoplamiento del plasmón entre partículas.¹²¹ Este fenómeno constituye la piedra angular para muchas de las aplicaciones de estas nanopartículas de oro en campos como: medicina,¹²² imagen,¹²³ catálisis,¹²⁴ liberación de fármacos,¹²⁵ biosensores¹²⁶ y detección colorimétrica.^{127,128}

Para la aplicación de AuNPs en disolución, no es una tarea trivial determinar sus concentraciones. Los coeficientes de extinción de AuNPs con diferentes tamaños y ligandos de protección también se han medido experimentalmente.¹²⁹ Se ha observado una relación lineal entre los logaritmos neperianos del coeficiente de extinción molar (ϵ) y del diámetro del núcleo (d), independientemente de los ligandos y disolventes:

$$\ln \epsilon = k \cdot \ln d + c$$

donde $k = 3.32$ y $c = 10.8$ ($\lambda = 506$ nm). Por lo tanto, las concentraciones de nanopartículas se pueden deducir fácilmente de la Ley de Beer-Lambert una vez que se conoce el tamaño de las nanopartículas (a través de imágenes del TEM). Según la ecuación indicada, se estima que las AuNPs de 20 nm de diámetro tienen un coeficiente de extinción molar de $10^9 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Este valor es al menos tres órdenes más alto que el de los colorantes orgánicos comunes (10^4 - $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

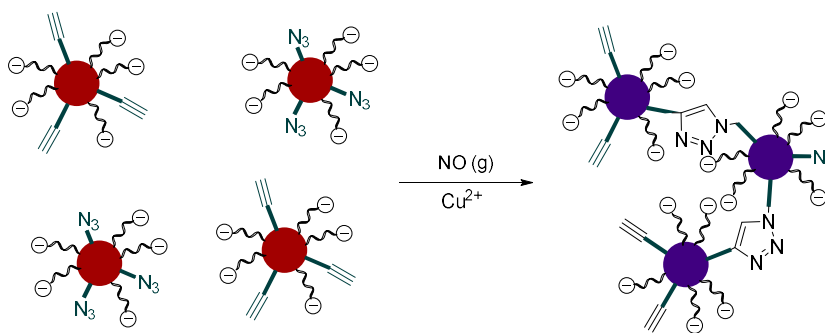
¹⁾, lo que indica que las AuNPs pueden servir como excelentes colorantes.^{130,131}

5.1.3. Aplicaciones de las AuNPs en detección colorimétrica.

Como ya hemos indicado, la agregación de AuNPs de tamaño apropiado (diámetro > 3,5 nm) induce una variación en la resonancia de plasmón superficial, lo que da como resultado un cambio de color visible de rojo a azul.¹³² El cambio de color durante la agregación de AuNPs (o la redispersión de un agregado) proporciona una plataforma práctica para la detección colorimétrica. En general, para desencadenar este proceso de agregación, lo que se hace es funcionalizar la superficie de las AuNPs con moléculas orgánicas que interaccionen específicamente con el analito que se quiere reconocer. De esta manera, en presencia de dicho analito se produce una doble interacción entre analito y receptores pertenecientes a dos nanopartículas distintas, provocando así la agregación de las AuNPs con el consiguiente desplazamiento de la banda SPR y cambio de color de rojo a azul. Otra aproximación podría ser partir de AuNPs agregadas debido a algún tipo de interacción interpartícula, y que la presencia del analito rompiera ese tipo de interacción produciendo la redispersión de las nanopartículas y el cambio de color en este caso de azul a rojo.

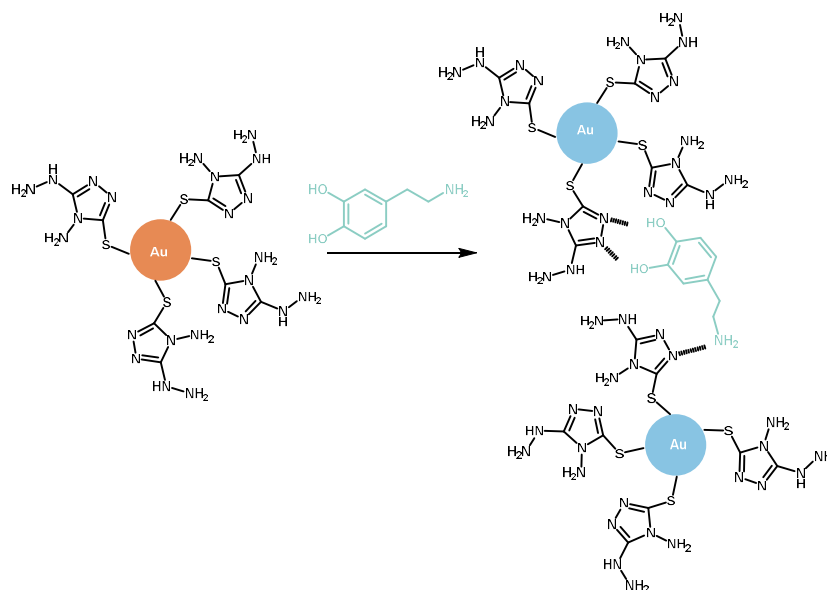
De entre los muchos ejemplos que ya existen en la literatura, vamos a describir algunos ejemplos desarrollados en nuestro grupo de investigación y otros relacionados también con nuestro trabajo:

El óxido nítrico (NO) es uno de los pocos neurotransmisores gaseosos y juega un papel muy importante en el sistema nervioso. Por ejemplo, estimula la producción de monofosfato de guanosina cíclico (cGMP), que actúa como mensajero secundario. La detección de este gas se ha llevado a cabo utilizando AuNPs funcionalizadas que se agregan a través de una reacción de cicloadición alquino-azida catalizada por cobre(I), o "reacción click", inducida por el NO.¹³³ Para detectar el analito, se sintetizaron nanopartículas de oro funcionalizadas con un alquino terminal y una azida. El mecanismo de detección se muestra en el Esquema 37. La disolución acuosa inicial que contiene una mezcla de AuNPs funcionalizadas con azida y alquino terminal permanece dispersa en presencia de Cu (II), con su característico color vino tinto. Cuando se agrega NO a la solución, el Cu (II) se reduce a Cu (I), lo que provoca que se produzca la reacción click entre las nanopartículas para dar lugar a una triazina y como consecuencia, tiene lugar la agregación con el subsiguiente cambio en el color de la disolución.



Esquema 37: Mecanismo de detección de NO con AuNPs.

La dopamina, la catecolamina biogénica más simple, es un neurotransmisor importante de los sistemas nerviosos central y periférico. Se ha desarrollado un sistema para la detección colorimétrica de dopamina utilizando AuNPs funcionalizadas con 4-amino-3-hidrazino-5-mercapto-1,2,4-triazol (Esquema **38**). La dopamina indujo la agregación de las AuNPs a través de interacciones por enlace de hidrógeno.¹³⁴ Cada molécula de dopamina tiene tres grupos capaces de formar enlaces de hidrógeno (el grupo amino y ambos grupos hidroxilo del catecol). Por otro lado, el 4-amino-3-hidrazino-5-mercapto-1,2,4-triazol presenta dos átomos aceptores de enlaces de hidrógeno que pueden interactuar con la molécula diana induciendo agregación con el consiguiente cambio de color. Se probaron epinefrina, norepinefrina, como posibles interferentes. Los tres compuestos, aunque interactúan con la sonda, mostraron respuestas de menor intensidad que la dopamina.

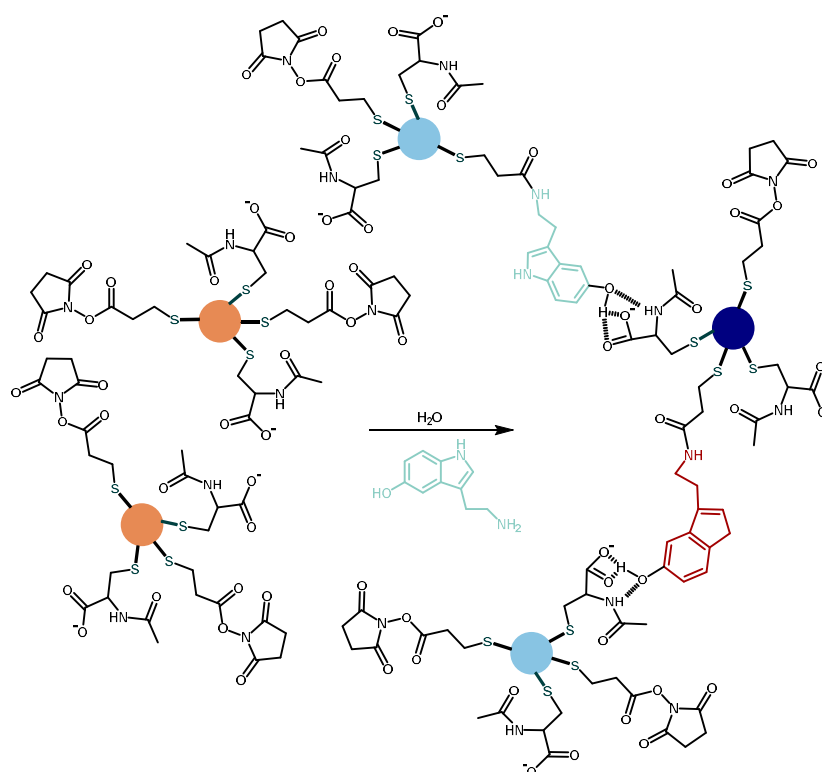


Esquema 38: Sistema de detección de dopamina con AuNPs funcionalizadas.

Siguiendo el mismo enfoque, se ha publicado el empleo de varias AuNPs para la detección de dopamina en medios biológicos.^{135,136}

En nuestro grupo de investigación también nos interesamos en la detección de serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT). Este es un neurotransmisor que no solo juega un papel clave en la regulación de diversas funciones biológicas, sino que también puede usarse para detectar la presencia de tumores carcinoides. Se ha publicado una sonda selectiva y sensible para detectar la serotonina basada en AuNPs.¹³⁷ En este caso, las AuNPs se bifuncionalizaron con dos tioles incorporando distintos grupos funcionales terminales para su interacción específica con el analito: propionato de succinimidilo (DSP)

y con N-acetil-L-cisteína (NALC). DSP reacciona con el grupo amino de la serotonina formando un enlace amida y NALC además de estabilizar las AuNPs debido a su carga negativa a pH neutro, es capaz de interactuar con el grupo hidroxilo de la serotonina a través de interacciones electrostáticas y formación de enlaces de hidrógeno (Esquema 39). En presencia del analito, tiene lugar la agregación de las nanopartículas y el color de la solución cambia de rojo a azul, siendo este cambio observable a simple vista.



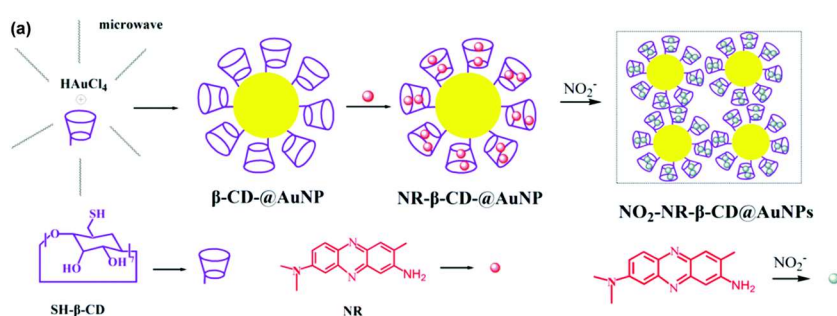
Esquema 39: Detección de serotonina.

Se determinó un límite de detección de 0.1 μ M en agua tamponada a pH 7 mediante valoraciones UV-Vis. Se observó una

respuesta similar de la sonda a 5-HT en suero sanguíneo simulado, con un límite de detección de 0.12 μM , y una respuesta lineal dentro del rango de concentración de 0-3 μM , que está dentro del rango de las concentraciones de serotonina de interés clínico.

Las ciclodextrinas, compuestos de los que se habló en el primer capítulo, han sido utilizadas junto a las AuNPs ampliamente debido a su capacidad para llevar a cabo interacciones host-guest.

Un ejemplo es el desarrollado por Yang et al.¹³⁸ consistente en un sensor de nitritos en el cual se han anclado a las AuNPs ciclodextrinas funcionalizadas con el indicador Rojo Neutro (Esquema 40). En presencia de los iones nitrito el sensor cambiaba sus propiedades fluorescentes.



Esquema 40: Representación esquemática de la síntesis del sensor desarrollado por Yang et al.¹³⁸

5.2 Objetivos

El objetivo general del trabajo desarrollado en este capítulo era la preparación de nanopartículas de oro funcionalizadas con ciclodextrinas para evaluar si su interacción con distintos neurotransmisores monoamina (indolaminas y catecolaminas) inducía cambios en sus propiedades ópticas a través de procesos de agregación interpartícula.

Para alcanzar este objetivo general se plantearon como objetivos específicos:

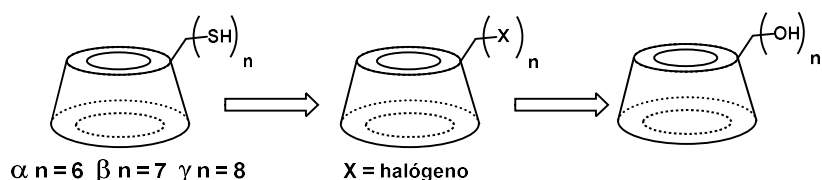
- Síntesis de nanopartículas de oro funcionalizadas con distintas ciclodextrinas.
- Evaluación de la capacidad de dichos materiales para detectar colorimétricamente la presencia de diferentes neurotransmisores monoamina.

5.3 Resultados y discusión

Acorde a lo expuesto en la introducción se planteó diseñar y sintetizar un quimiosensor basado en nanopartículas de oro funcionalizadas con ciclodextrinas. Este quimiosensor en presencia de neurotransmisores producirá un encapsulamiento que provocará la agregación de las nanopartículas y, por tanto, el desplazamiento de la banda de plasmón con el consiguiente cambio de rojo (nanopartículas dispersas) a azul (nanopartículas agregadas).

5.3.1 Funcionalización de las ciclodextrinas

El objetivo final de la funcionalización de las ciclodextrinas era el poder unir las a la superficie de nanopartículas de oro. Por ello, teniendo en cuenta la gran afinidad del oro por el azufre, se decidió introducir funciones azufradas terminales (tioles, sulfuros o disulfuros) sobre las ciclodextrinas. La primera aproximación que se planteó fue la sustitución de los grupos hidroxilo de la cara primaria de las CDs por grupos tiol. Puesto que existían en la bibliografía varias referencias en las que se describía esta sustitución a partir del correspondiente haloderivado, la ruta sintética diseñada constaba de dos etapas, ambas basadas en reacciones de sustitución: la obtención de haloderivados a partir de las CDs de partida y su posterior transformación en los correspondientes tioles (Esquema 41).



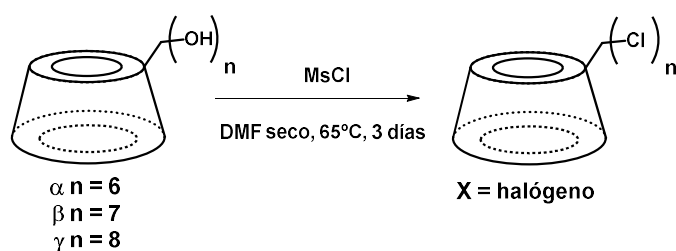
Esquema 41: Retrosíntesis propuesta para la obtención de las moléculas objetivo.

Debido a la mayor disponibilidad en el laboratorio de la α -CD se decidió comenzar a trabajar con ella, explorando diferentes metodologías y condiciones que pudiesen ser extendidas posteriormente a las β y γ -CDs. En la bibliografía están descritos procedimiento para peryodar^{139,140} o perbromar^{141,142} α -CD en posición 6. Siguiendo el procedimiento general descrito para estas reacciones, se empleó una disolución de trifenilfosfina y yodo o bromo molecular en DMF, a la que se adicionó la α -CD y la mezcla se calentó la mezcla a 80°C con agitación durante 18 horas. Sin embargo, los resultados obtenidos no fueron los esperados ya que en ambos casos se recuperó inalterado el producto de partida.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, se decidió probar un procedimiento alternativo de halogenación que sustituya el yodo o el bromo molecular por la correspondiente N-halosuccinimida¹⁴³ pero tampoco así se consiguió obtener el producto previsto.

Ya que ni la peryodación ni la perbromación habían dado lugar a los productos esperados se decidió probar otro procedimiento de cloración de ciclodextrinas descrito en la bibliografía.¹⁴³ Para ello, se trató una disolución de α -CD en DMF seco con cloruro de mesilo

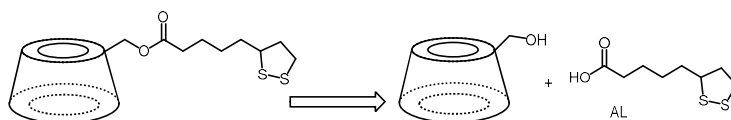
(MsCl), manteniendo la reacción a 65°C y agitando durante 3 días. Bajo estas condiciones la reacción se produjo en la forma esperada obteniéndose la α -CD perclorada en la posición 6 con un rendimiento moderado (Esquema 42). Cuando la síntesis se llevó a cabo partiendo de la β -CD o la γ -CD los resultados fueron similares, obteniéndose en cada caso el producto deseado.



Esquema 42: Preparación de α -, β -, γ -CD percloradas.

La transformación del cloruro en el correspondiente tiol se intentó siguiendo dos vías alternativas. La primera de ellas fue la reacción directa con hidrógeno sulfuro de sodio mientras que en la segunda se empleó, tiourea siguiendo los procedimientos descritos en la bibliografía.^{139,140} Desafortunadamente, ninguno de los dos procedimientos ensayados condujo la sustitución del cloro, recuperándose en todos los casos los productos de partida inalterados.

Dado que los intentos de conversión de los alcoholes primarios en tioles habían resultado infructuosos se decidió funcionalizar las ciclodextrinas con disulfuros terminales a través de la formación de los correspondientes ésteres con el ácido lipoico (AL) (Esquema 43).

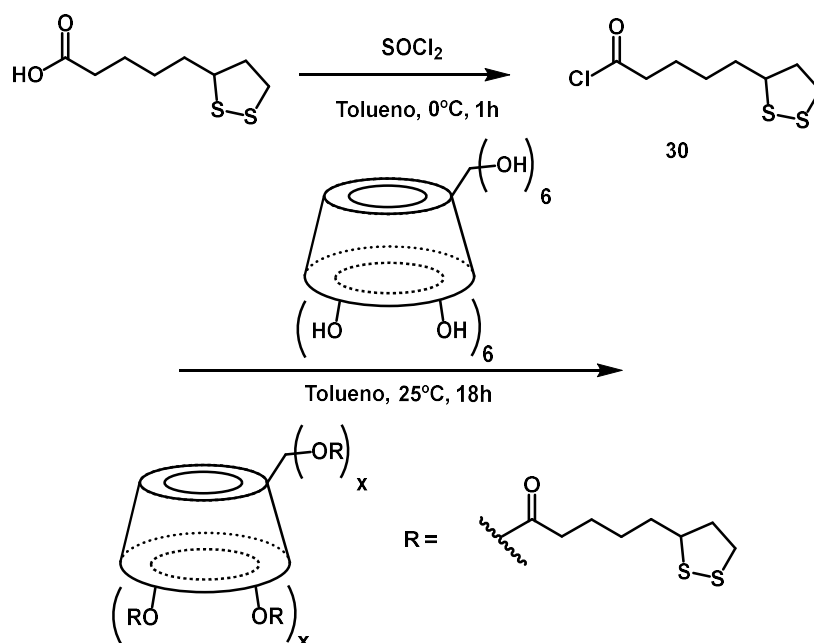


Esquema 43: Análisis retrosintético para la preparación de ésteres del ácido lipoico.

El ácido lipoico o ácido tióctico contiene en su estructura un anillo 1,2-ditiolano y su quimisorción sobre la superficie de AuNPs ha sido demostrada en diferentes publicaciones.^{144,145}

Para alcanzar este fin, se emplearon distintas metodologías. La primera de ellas fue llevar a cabo la esterificación de uno de los hidroxilos primarios de la α -CD en medio ácido, siguiendo un artículo publicado en el que conseguían la monoesterificación directa de la β -CD y diferentes ácidos de interés.¹⁴⁶ Sin embargo, la utilización de ácido sulfúrico concentrado y las altas temperaturas requeridas dieron como resultado la descomposición de la α -CD.

Con el fin de utilizar condiciones de reacción más suaves, se decidió transformar el ácido lipoico en el correspondiente cloruro de ácido y hacerlo reaccionar con la α -CD en tolueno seco, en atmósfera de argón y a temperatura ambiente.



Esquema 44: Esterificación de α -CD con el cloruro del ácido lipoico.

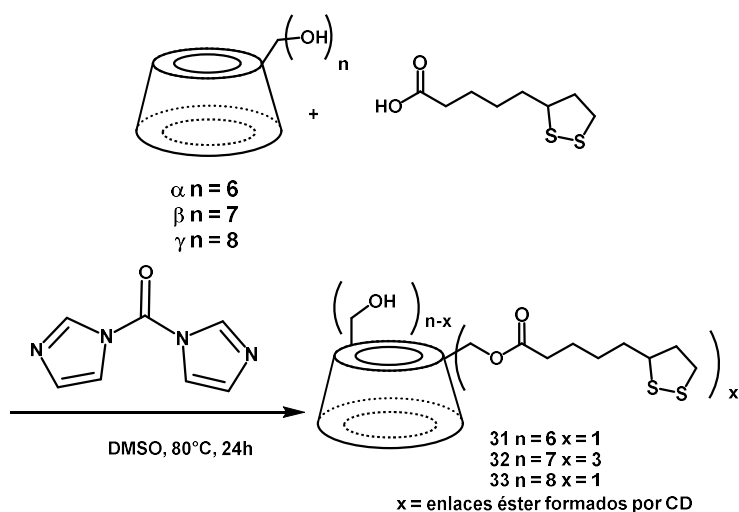
En estas condiciones, la reacción tuvo lugar y la formación de los ésteres se confirmó mediante espectroscopía FTIR, ya que aparecía la banda característica del carbonilo de éster alrededor de 1740 cm^{-1} . Sin embargo, el producto obtenido era insoluble en numerosos disolventes orgánicos, incluidos DMSO y DMF, lo que suponía un problema de cara a la posible funcionalización de las nanopartículas de oro.

Hornig *et al.* en el año 2007¹⁴⁷ llevaron a cabo la esterificación de la β -CD con dos unidades de ácido lipoico y el producto aislado resultó ser insoluble tanto en DMSO como DMF. Por ello, y basándonos en estos resultados concluimos que la insolubilidad del

derivado obtenido era probablemente debida a una excesiva e incontrolada esterificación de los alcoholes primarios y secundarios de la α -CD, provocada por la alta reactividad del cloruro de ácido **30**.

En el artículo citado anteriormente, los autores llevaban a cabo la esterificación directa de β -CD con ácido lipoico mediante la activación *in situ* del ácido carboxílico utilizando un agente de acoplamiento, concretamente el N,N'-carbonildiimidazol (CDI). Por ello, se decidió probar dichas condiciones, pero modificando el número de equivalentes de ácido lipoico empleados por unidad de glucosa para evitar una excesiva esterificación que originara productos insolubles.

La síntesis se llevó a cabo en DMSO, a 80°C durante 24 horas, utilizando tan sólo 1 equivalente de ácido lipoico por unidad de glucosa en la ciclodextrina. De nuevo, se trabajó en primer lugar con α -CD, y sólo cuando se confirmó la formación del derivado **31**, el mismo procedimiento se extendió para β y γ -CD, obteniéndose satisfactoriamente los derivados **32** y **33** respectivamente.



Esquema 45: Preparación de ésteres de CD.

La formación de los enlaces éster fue confirmada utilizando espectroscopía FTIR, encontrando la señal del carbonilo de éster alrededor de 1740 cm^{-1} en los tres casos (Figura 33). Estos derivados no presentaban la insolubilidad observada anteriormente en H_2O y DMSO. El grado de sustitución, es decir, el número de enlaces éster formados por ciclodextrina, se calculó mediante el análisis elemental de cada una de las muestras y posteriormente, estos resultados se confirmaron mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF).

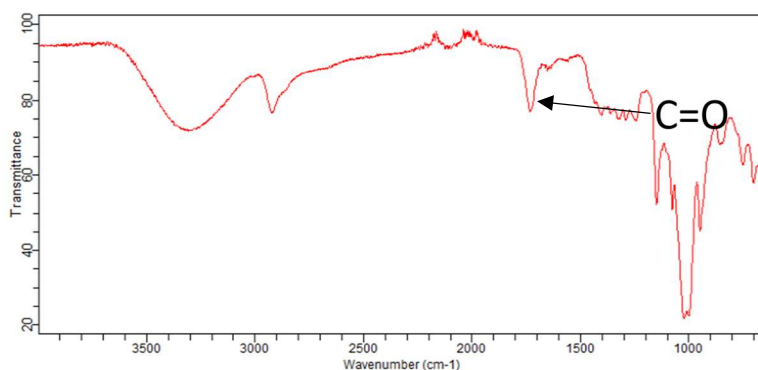


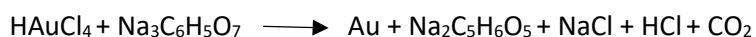
Figura 33: Espectro de IR del compuesto **31**.

Es necesario aclarar que los derivados **31**, **32** y **33** son los productos mayoritarios de cada una de las reacciones, pero que también se obtenían pequeñas cantidades de las ciclodextrinas de partida, así como cantidades minoritarias de ciclodextrinas con mayor o menor grado de funcionalización. Sin embargo, no se llevó a cabo ninguna purificación, puesto que la separación de mezclas tan complejas de ciclodextrinas y derivados mediante técnicas convencionales no es sencilla.

Por otro lado, el trabajar con estas mezclas no suponía ningún problema para nuestro objetivo. La funcionalización de las AuNPs sólo se produciría con los derivados que hubieran reaccionado con el ácido lipoico. Las CDs de partida no intervendrían en esta reacción y serían eliminadas en la etapa de purificación como se indicará en posteriores apartados.

5.3.2 Síntesis y funcionalización de nanopartículas de oro

La síntesis de AuNPs se llevó a cabo mediante el método de Turkevich-Frens, que permite la obtención de nanopartículas con diámetros de entre 10 y 20 nm.^{111,112} Este método emplea agua a reflujo como disolvente, ácido cloroáurico (HAuCl_4) como fuente de átomos de oro y citrato sódico como reductor y estabilizante:



Los cationes de Au^{3+} son reducidos por el citrato (que se oxida a acetona dicarboxilato y CO_2) a átomos neutros de oro, que tras un proceso de nucleación y posterior crecimiento van dando lugar a las nanopartículas de oro. En este punto, el citrato cubre la superficie de estas nanopartículas y las estabiliza, ayudando a definir su tamaño e impidiendo que se sigan agregando entre sí, gracias a la repulsión entre los grupos carboxilato (Figura 34).

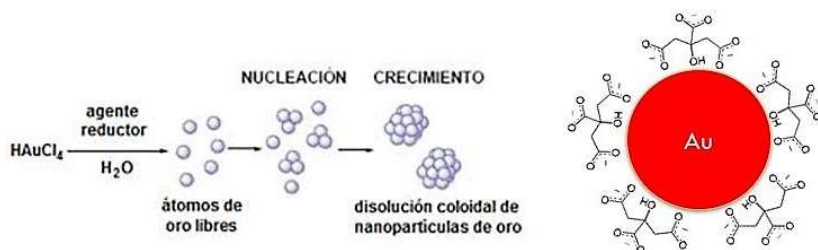


Figura 34: Esquema de la síntesis de nanopartículas de oro.

La evolución de la reacción se puede seguir a simple vista. Inicialmente, la disolución de HAuCl_4 es ligeramente amarilla y se vuelve incolora cuando se adiciona el citrato. Unos segundos después la disolución se va oscureciendo, hasta que transcurridos unos

minutos adquiere el color rojo característica de las disoluciones de nanopartículas de oro dispersas, esféricas y de alrededor de 15 nm de diámetro (Figura 35).



Figura 35: Cambios de color observados en el curso de la reacción de preparación de las nanopartículas de oro.

Una vez obtenidas las nanopartículas (según el primer método descrito), en un segundo paso, se produce una reacción de intercambio de ligandos: el citrato es desplazado de la superficie de las nanopartículas, normalmente por una mezcla de ácido tióctico (que contribuye a estabilizar las dispersiones coloidales) y los diferentes ligandos que se quieran introducir. En cada caso es necesario optimizar la relación molar ligando/ac. tióctico para mejorar la estabilización de las nanopartículas, así como la respuesta con respecto al analito.^{89,148–}

151

Como alternativa, se puede realizar un protocolo de tres pasos para la funcionalización de AuNPs en el que primero el citrato se desplaza por TA y las AuNPs cubiertas con TA resultantes se agitan en presencia del ligando para una segunda reacción de intercambio de ligando. Sin embargo, el grado de funcionalización con este método suele ser mucho menor.¹⁵²

En este trabajo, la funcionalización de la superficie de las AuNPs estabilizadas con citrato previamente sintetizadas, se llevó a cabo mediante el método de intercambio de ligando. En este procedimiento, la gran afinidad que existe entre el oro y el azufre actúa como fuerza motora de la reacción. En las condiciones de reacción, el enlace disulfuro del anillo 1,2-ditiolano del ácido lipoico unido a las ciclodextrinas se abre, se convierte en un ligando bidentado, que se une covalentemente al oro a través de los dos átomos de azufre.¹⁵³ La gran afinidad de azufre por el oro hace que al adicionar el ligando a la dispersión de AuNPs, parte de las moléculas de citrato de la capa protectora se vean sustituidas por el ligando lo que origina la funcionalización deseada.

El primer paso para llevar a cabo la funcionalización es establecer las condiciones más adecuadas para la reacción, ya que adicionar demasiada cantidad de ciclodextrina puede provocar la desestabilización del sistema y la agregación de las AuNPs. Este comportamiento se debe a que la estabilización de las nanopartículas depende de las moléculas de citrato que las recubre y que a lo largo del proceso este va siendo parcialmente sustituido por las ciclodextrinas funcionalizadas con tióctico. Como las AuNPs se mantienen dispersas en agua gracias a la repulsión entre los grupos carboxilato del citrato que las recubre, es necesario estudiar la estabilidad de la dispersión en distintos medios, generalmente básicos.

Teniendo en cuenta estas premisas se llevaron a cabo reacciones de funcionalización con varias concentraciones de

ciclodextrina funcionalizada con el éster del ácido tióctico y en medios de distinta basicidad (

Tabla 3). Se prepararon por triplicado 6 viales en los cuales se añadieron distintos volúmenes de NaOH 0.5 M y distintas cantidades del compuesto **31**. Para estudiar su estabilidad las disoluciones se dejaron agitando toda la noche (alrededor de 15 horas) y se comprobó que transcurrido este tiempo las nanopartículas de las reacciones en las que no se había añadido NaOH 0,5M se encontraban agregadas mientras que aquellas en las que se había añadido NaOH 0,5 M seguían dispersas. Por tanto, el medio básico (NaOH) aseguraba que los carboxilatos permanecieran desprotonados y consecuentemente las AuNPs se mantuvieran dispersas.

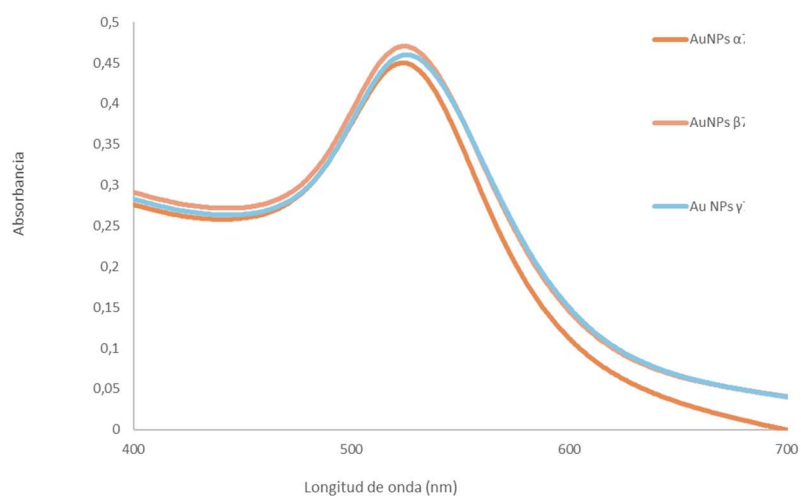
	Vial 1	Vial 2	Vial 3	Vial 4	Vial 5	Vial 6
AuNPs	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL
NaOH 0,5 M	10 µL	10 µL	10 µL	0 µL	0 µL	0 µL
31 0,01M	10 µL	20 µL	40 µL	10 µL	20 µL	40 µL
Estabilidad (15 horas después)	Sí	Sí	Sí	No	No	No

Tabla 3: Condiciones de reacción empleadas en la funcionalización de las nanopartículas y estabilidad de estas.

Como en el vial 3 no se producía agregación y era la que contenía una mayor concentración de ligando, estas fueron las

condiciones empleadas para llevar a cabo la funcionalización con los ligandos **31**, **32** y **33** y obtener las sondas **AuNP- α** , **AuNP- β** y **AuNP- γ** .

Una vez preparadas las sondas (AuNP- α , AuNP- β y AuNP- γ), se procedió a su caracterización. Para ello, en primer lugar, se registraron los espectros de UV-vis. En ellos se observa que la banda de LSPR en los tres casos se encuentra a una longitud de onda de alrededor de 525 nm, lo que es coherente con los datos de la bibliografía (Gráfica 13).¹⁵⁴



Gráfica 13: Espectro UV-Vis de las dispersiones AuNP- α , AuNP- β y AuNP- γ .

El tamaño de las nanopartículas, así como su morfología se estudió mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM). Las nanopartículas preparadas eran esféricas y se encontraban dispersas (Figura 36). El diámetro se midió en 15 áreas diferentes de la muestra, obteniendo una media de 11.4 nm para las AuNP- α .

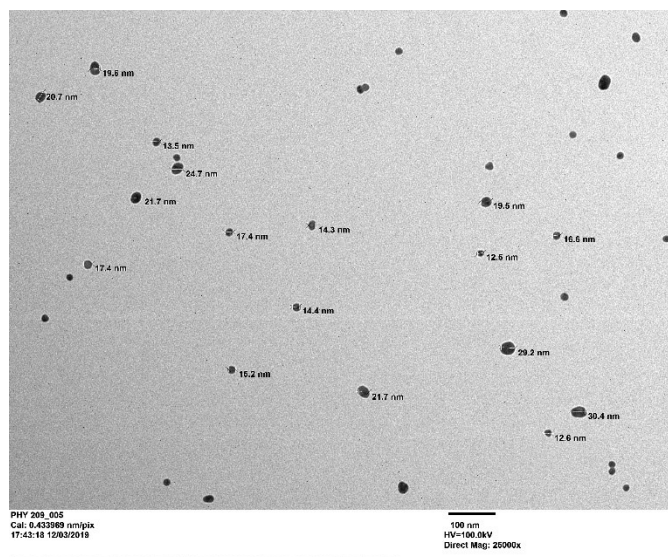


Figura 36: Imagen de TEM de AuNP-α.

Por último, se calculó la concentración de nanopartículas en la disolución. Este cálculo se realizó siguiendo la metodología descrita en la bibliografía.¹²⁹ En dicho trabajo se describe la existencia de una relación lineal entre el logaritmo del coeficiente de extinción molar y el logaritmo del diámetro de las nanopartículas.

$$\ln(\epsilon) = 3,3211 \cdot \ln(D) + 10,80505 \quad (1)$$

Siendo ϵ es el coeficiente de extinción molar en $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ y D el diámetro de las nanopartículas expresado en nm. De este modo, puesto que se conoce el diámetro de las nanopartículas que ha sido estimado mediante las imágenes del TEM, puede calcularse el coeficiente de extinción molar. En nuestro caso, este resultó ser de $1,59 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$.

Por tanto, haciendo uso de la ley de Lambert-Beer,

$$A = \varepsilon \cdot C \cdot L \quad (2)$$

donde A es la absorbancia, C la concentración (M) y L la longitud del paso óptico (cm), con el coeficiente molar calculado, sabiendo que la longitud del paso óptico era de 1 cm y con los máximos de absorbancia obtenidos del espectro UV-Vis, se calculó la concentración de nanopartículas en la cubeta de medida. Los valores obtenidos fueron $2,83 \cdot 10^{-9}$ M (**AuNP- α**), $2,95 \cdot 10^{-9}$ M (**AuNP- β**) y $2,89 \cdot 10^{-9}$ M (**AuNP- γ**). Teniendo en cuenta las diluciones llevadas a cabo para efectuar las medidas se concluyó que las concentraciones de las disoluciones de partida eran $1,45 \cdot 10^{-8}$ M (**AuNP- α**), $1,47 \cdot 10^{-8}$ M (**AuNP- β**) y $1,44 \cdot 10^{-8}$ M (**AuNP- γ**).

5.3.3 Estudio de la interacción de las AuNPs con neurotransmisores

A continuación, se evaluó la posible interacción de los sistemas preparados con distintos neurotransmisores monoamina. En concreto se estudiaron los compuestos que aparecen recogidos en la fFigura 37. Para ello, se estudió si la adición de dichos compuestos en exceso a las dispersiones de las nanopartículas preparadas inducía su agregación, provocando un cambio de color en la disolución. Para ello a una disolución de 200 μ L de AuNPs funcionalizadas se le añadieron 200 μ L de la disolución del neurotransmisor (0.01 M). La mezcla se dejó a temperatura ambiente durante un periodo entre 10 min y 1 hora y se estudió su agregación de manera visual.

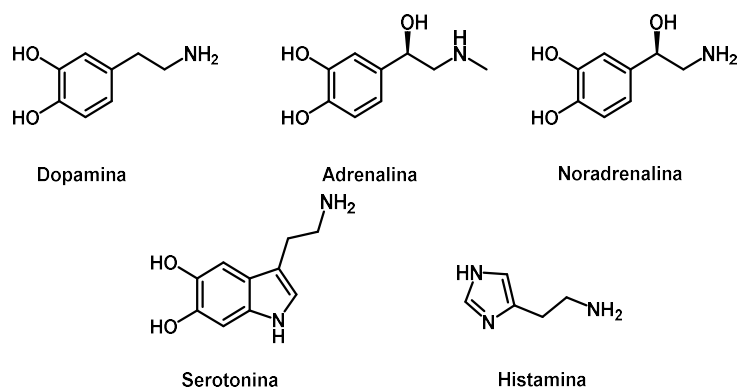


Figura 37: Estructuras de los neurotransmisores evaluados.

Los resultados observados se encuentran resumidos en la Tabla 4.

	AuNP- α	AuNP- β	AuNPs- γ
Adrenalina	No agregación	Agregación	No agregación
Noradrenalina	No agregación	Agregación	No agregación
Dopamina	No agregación	No agregación	No agregación
Histamina	No agregación	No agregación	No agregación
Serotonina	Agregación	Agregación	No agregación

Tabla 4: Resultados de la evaluación preliminar de la capacidad sensora de nuestros sensores.

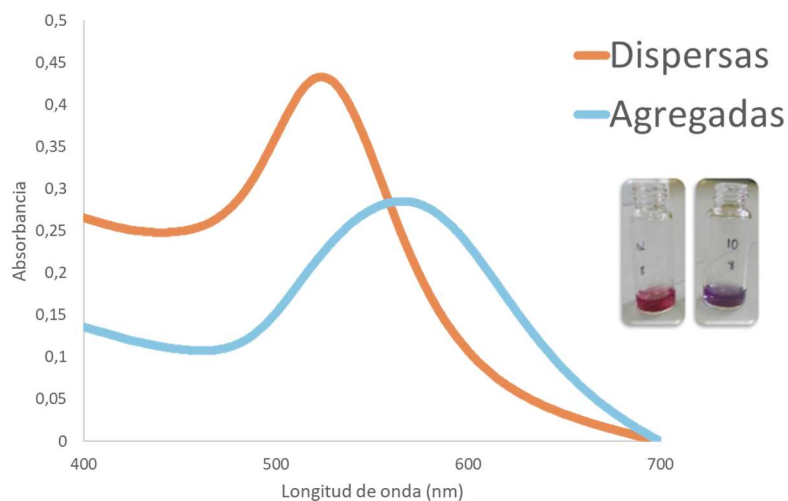
Para el sistema **AuNP- α** sólo se producía agregación en presencia de serotonina y en el caso de **AuNP- β** además de con serotonina, también se observaba agregación en presencia de adrenalina y noradrenalina. Por el contrario, en el sistema **AuNP- γ** no se daba la agregación con ninguno de los neurotransmisores estudiados. La no agregación de las nanopartículas funcionalizadas con γ -CD puede estar relacionada con el mayor tamaño de la cavidad

de ciclodextrina, que induciría interacciones débiles con los neurotransmisores y, por lo tanto, no modificarían el estado de agregación. Una situación más interesante se produce en el caso de AuNP- α y AuNP- β . En el caso de la dopamina, está descrito que tanto la α - como la β -CD forman complejos 1:1 con este neurotransmisor^{155,156} lo que no propiciaría la agregación de las nanopartículas, que requiere de la formación de complejos 2:1 CD/neurotransmisor. En relación con la adrenalina y la noradrenalina, los resultados observados podrían estar relacionados con el hecho descrito¹⁵⁷ de que la interacción de algunos neurotransmisores con láminas de oro funcionalizadas con β -CD y estabilizadas con ascorbato, da lugar a la formación de complejos 1:1 mediante la típica interacción hidrofóbica dentro de la cavidad de ciclodextrina e interacciones adicionales con los restos de ascorbato. En nuestro caso, la presencia de los grupos hidroxilo de la cadena lateral de la adrenalina y la noradrenalina podrían originar este tipo de interacciones que desestabilizarían las suspensiones de nanopartículas propiciando su agregación.

De cualquier modo, de todos los neurotransmisores estudiados, la serotonina es la que presenta una mayor selectividad ya que es el único neurotransmisor que da respuesta con **AuNP- α** . Por esta razón se centraron los estudios posteriores en la evaluación del comportamiento de **AuNP- α** en presencia de serotonina.

Los estudios iniciales se llevaron a cabo mediante espectroscopía UV-Vis utilizando **AuNP- α** y serotonina (25 mM en H₂O) con las mismas cantidades que en los experimentos anteriores.

En el espectro UV-Vis (Gráfica 14) se observó el característico desplazamiento del máximo de absorción de la banda del plasmón desde 524 nm a 565 nm, correspondiente al color azul de las nanopartículas agregadas.



Gráfica 14: (Izquierda) Espectro de UV-Vis mostrando el desplazamiento de la banda de plasmón del sistema AuNP- α en presencia de una concentración de serotonina (5-HT) de 25 mM. (Derecha) Cambio de color observado a simple vista.

Con el fin de comprobar la respuesta de **AuNP- α** frente a los distintos neurotransmisores en diferentes condiciones de medida se hizo un estudio empleando diferentes medios y diferentes valores de pH. Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 5 y como puede verse la selectividad observada para la serotonina se mantiene en un amplio rango de pH. Se puede observar en la tabla que a pH ligeramente básico no discrimina entre la dopamina y la serotonina

mientras que a pH ligeramente ácido y en agua si es selectivo con la serotonina.

Medio	D	A	N	H	S
NaHCO ₃ /NaCO ₃ pH=10 0.01M	Si	No	No	No	Si
HEPES 0.31M pH=7.4	No	No	No	No	No
Fosfato pH=8	Si	No	No	No	Si
Fosfato pH=7.5	Si	No	No	No	Si
Fosfato pH=6.5	No	No	No	No	Si
Fosfato pH=6	No	No	No	No	Si
Fosfato pH=5.7	No	No	No	No	Si
TRIS-HCL pH=7 (1/10)	Si	No	No	No	Si
TRIS pH=8	Si	No	No	No	Si
TRIS pH=7.5	Si	No	No	No	Si
H ₂ O	No	No	No	No	Si

Tabla 5: Respuesta de AuNP- α frente a los distintos neurotransmisores en diferentes condiciones de medida. D (dopamina), A (adrenalina), N (Noradrenalina); H (histamina) y S (serotonina). Sí: si agregan, No: no agregan.

Los cambios de color que se producen en presencia de serotonina son observables a simple vista (Figura 38). El resto de los neurotransmisores ensayados no inducen cambios de color mientras que la serotonina sí lo hace. Además, cuando se prepara una mezcla de todos los posibles interferentes juntos no se observa ningún cambio, a no ser que se adicione a dicha mezcla serotonina disuelta en H₂O.

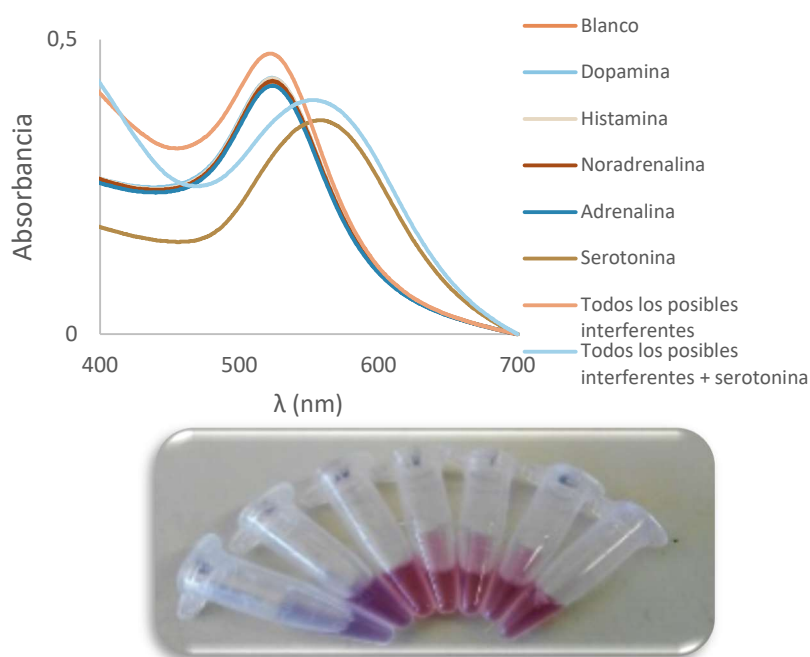


Figura 38: (superior) Cambios en la banda de plasmón de AuNP- α con los interferentes estudiados y con serotonina. (inferior) Eppendorfs que contienen mezcla de AuNP- α + NT.

Los cambios en la banda de plasmón se pueden atribuir a cambios en el tamaño y grado de agregación de las AuNPs, por lo que

para comprobar que dicha agregación se producía, en nuestro caso, se registraron imágenes de TEM de la muestra libre y en presencia del analito. Las imágenes claramente indican que en presencia de serotonina se produce la agregación de las nanopartículas (Figura 39).

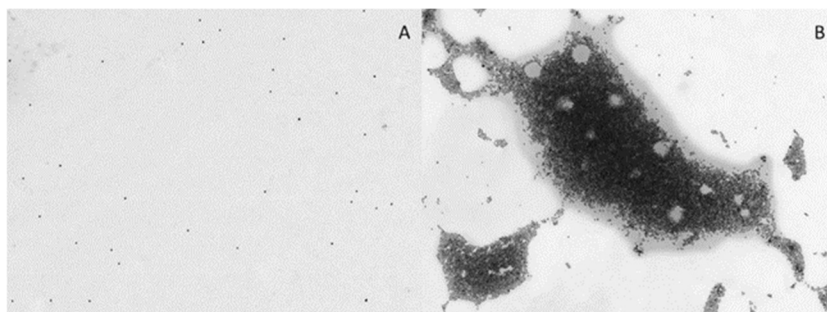
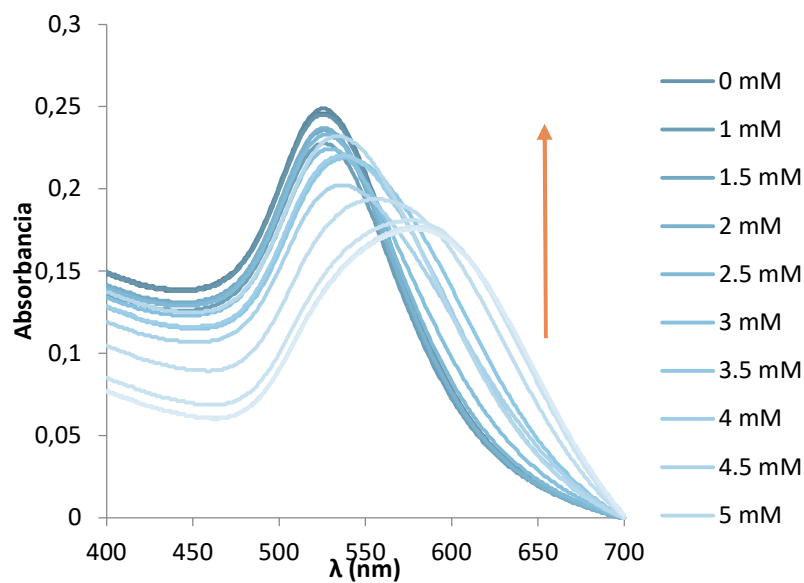


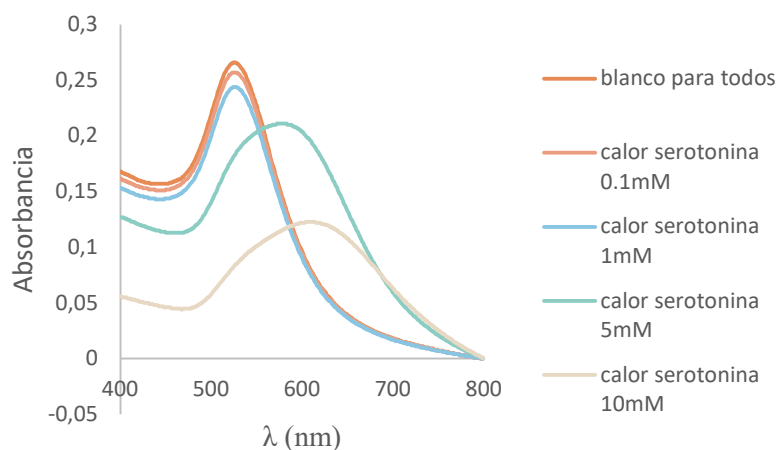
Figura 39: Imagen A: aspecto de las AuNPs α dispersas en ausencia de serotonina. Imagen B: apariencia de las AuNPs α agregadas en presencia de serotonina (25 mM). Ambas imágenes se encuentran en una escala de 400 nm.

Una vez establecidas las mejores condiciones para el reconocimiento, así como la selectividad de **AuNP- α** con respecto a serotonina, se decidió evaluar la sensibilidad del quimiosensor. Para ello se llevó a cabo la titración de la dispersión de las nanopartículas de oro con cantidades crecientes de serotonina. Los resultados se muestran en la Gráfica 15.

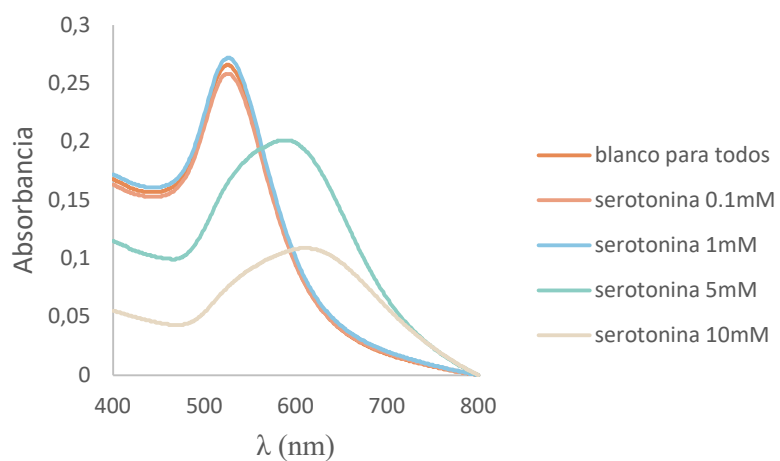


Gráfica 15: Cambios en la banda de plasmón de AuNP- α en presencia de cantidades crecientes de serotonina.

Como puede verse en la Gráfica 15 a partir de una concentración de serotonina 3 mM se empieza a observar el desplazamiento del máximo de absorción de la banda del plasmón. Con el fin de conocer si la temperatura a la que se realiza el experimento influye en el resultado, se llevaron a cabo dos experimentos paralelos, uno de ellos a temperatura ambiente y el otro a 40°C. Como puede verse en la Gráfica 16 y Gráfica 17 los resultados fueron análogos a las dos temperaturas estudiadas.



Gráfica 16: Valoración de AuNP- α con serotonina a 40°C a distintas concentraciones.



Gráfica 17: Valoración de AuNP- α con serotonina a 25°C a distintas concentraciones.

Atendiendo al resultado de las medidas a estas dos temperaturas se decidió trabajar a temperatura ambiente. Para ello se hizo una titración con distintas concentraciones de serotonina (0 a 10 mM) disueltas en H₂O a temperatura ambiente.

El cálculo del límite de detección se realizó utilizando la Ecuación 3, en la que S_b es la desviación estándar del blanco y m la pendiente de la recta de calibrado que corresponde al intervalo de linealidad en la valoración. La desviación estándar se estimó midiendo 10 veces el blanco y resultó ser 0.0011. Teniendo en cuentas estos valores, el límite de detección calculado resultó ser de 0.26 mM.

$$LoD = \frac{3 \cdot S_b}{m} \quad (3)$$

5.4 Conclusiones

Las conclusiones de este capítulo pueden resumirse en los siguientes puntos:

- Se ha logrado llevar a cabo la funcionalización de los tres principales tipos de ciclodextrinas (α , β , y γ) con ácido lipoico, a través de la formación de los ésteres correspondientes.
- Se han preparado y caracterizado nanopartículas de oro funcionalizadas con α -, β -, y γ -CDs.
- Las nanopartículas preparadas son capaces de reconocer neurotransmisores monoamina en distintos medios acuosos. Las AuNP- α presentan una marcada selectividad en el reconocimiento de serotonina frente a otros neurotransmisores relacionados. Mientras que las AuNP- β se agregan en presencia de la mayoría de los neurotransmisores, y las AuNP- γ no se agregan en presencia de ninguno de los neurotransmisores estudiados.
- El reconocimiento origina la agregación de las AuNP dando lugar al típico cambio de color de rojo a azul que puede ser observado a simple vista.
- El límite de detección del sensor AuNP- α para la serotonina es de 0,26 mM.

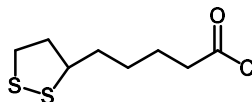
5.5 Procedimiento experimental

Todos los reactivos comercialmente disponibles fueron usados sin purificación adicional. El tolueno se secó mediante destilación con CaCl_2 y la DMF fue adquirida comercialmente anhidra (99,98%). Ambos disolventes se almacenaron en botellas con tamices moleculares previamente activados, con un tamaño de poro de 4 Å, para garantizar su sequedad. Se utilizó H_2O mili-Q y todo el material para la síntesis de nanopartículas de oro y posteriores ensayos con estas fue lavado previamente con agua regia (HCl/HNO_3 , 3:1). Los espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN se registraron en un espectrómetro Bruker de 300 MHz. Los desplazamientos químicos se indican en ppm con relación al tetrametilsilano como estándar interno. Los espectros de absorción se registraron utilizando un espectrofotómetro Shimadzu UV-2600 en cubetas de plástico BRAND® UV cuvettes micro, con un paso óptico de 1 cm. Los espectros de masas se registraron en un 5800 MALDI TOFTOF (Sciex). Los espectros de infrarrojo fueron adquiridos con un total de 20 barridos por muestra, en un Cary 630 FTIR. Las imágenes de microscopía electrónica se obtuvieron con un JEOL-1010 Microscopio electrónico de transmisión que funciona a 100 kV.

5.5.2 Síntesis

Síntesis del cloruro de ácido lipoico (30)

En un matraz de fondo redondo de 100 mL de 2 bocas provisto de agitación magnética y bajo atmósfera de argón, se adicionó cloruro de tionilo (0.3 mL, 3.6 mmol) disuelto en 5 mL de tolueno seco. El balón se enfrió en un baño de hielo y sobre la disolución se añade gota a gota ácido lipoico (0.5 g, 2.4 mmol) disuelto en 15 mL de tolueno seco, durante 1 hora.

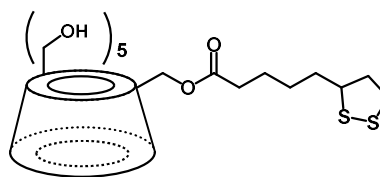


Cuando finalizó la adición se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 2 horas. Transcurrido este tiempo, el disolvente se eliminó a presión reducida en un rotavapor, obteniéndose 0.54 g de un aceite de color marrón oscuro (100 % de rendimiento).

^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 3.59 – 3.54 (m, 1H), 3.23 – 3.08 (m, 2H), 2.91 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 2.53 – 2.42 (m, 1H), 1.97 – 1.86 (m, 1H), 1.81 – 1.65 (m, 4H), 1.58 – 1.49 (m, 2H).

Síntesis del compuesto **31**

En un matraz de fondo redondo de 2 bocas de 50 mL provisto de agitación magnética, se disolvió α -CD (0.5 g, 0.51 mmol) en



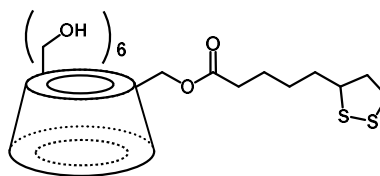
10 mL de DMSO. Sobre esta disolución se añadió ácido lipoico (0.63 g, 3.06 mmol) y CDI (0.48 g, 3.06 mmol) disueltos en 5 mL de DMSO. La disolución se calentó a 80°C y se dejó en agitación 24 horas. Transcurrido este tiempo, se dejó enfriar a temperatura ambiente y la mezcla de reacción se vertió sobre 200 mL de 2-propanol, originándose un precipitado de color blanquecino. La suspensión se centrifugó durante 8 minutos a 11000 rpm y el disolvente se eliminó por decantación. El sólido resultante se lavó con 2-isopropanol, tras lo que se secó en una bomba a vacío durante 2 horas, obteniéndose un sólido amarillento. El producto **31** se obtuvo como producto mayoritario junto con pequeñas cantidades de ciclodextrina de partida y ciclodextrinas con mayor grado de funcionalización. La formación de **31** se confirmó mediante espectroscopía FTIR y MS-MALDI-TOF. No fue posible calcular el rendimiento debido a la compleja mezcla obtenida y dado que el producto se haría reaccionar con las nanopartículas de oro, se procedió a su uso sin purificación previa.

IR (cm⁻¹): 3300 (OH), 1740 (RCOOR').

MS-MALDI-TOF: m/z calculada para C₄₄H₇₂O₃₁S₂·Na ([M+Na]⁺) 1183.35; encontrada 1183.38.

Síntesis del compuesto 32

En un matraz de fondo redondo de 2 bocas de 50 mL provisto de agitación magnética, se disolvió β -CD (0.5 g, 0.44 mmol) en 10 mL de DMSO. Sobre esta disolución se añadió de ácido lipoico (0.65 g, 3.08 mmol) y CDI (0.49 g, 3.08 mmol) disueltos en 5 mL de DMSO. La disolución se calentó a 80°C y se dejó en agitación 24 horas.



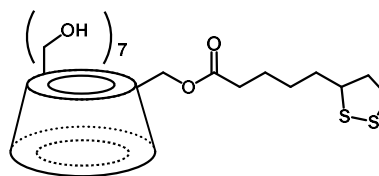
Trascurrido este tiempo, se dejó enfriar a temperatura ambiente y la mezcla de reacción se vertió sobre 200 mL de 2-propanol, originándose un precipitado de color blanquecino. La suspensión se centrifugó durante 8 minutos a 11000 rpm y el disolvente se eliminó por decantación. El sólido resultante es lavado con 2-isopropanol, tras lo que se secó en una bomba a vacío durante 2 horas, obteniéndose un aceite amarillento. El producto **32** se obtiene como producto mayoritario de una mezcla de compuestos y se confirma mediante espectroscopía FTIR y MS-MALDI-TOF. No fue posible calcular el rendimiento debido a la compleja mezcla obtenida y dado que el producto se hará reaccionar con las nanopartículas de oro, se procedió a su uso sin purificación previa.

IR (cm^{-1}): 3300 (OH), 1740 (RCOOR').

MS-MALDI-TOF: m/z calculada para $\text{C}_{44}\text{H}_{72}\text{O}_{31}\text{S}_2\cdot\text{Na}$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$): 1346.29; encontrada 1346.32.

Síntesis del compuesto 33

En un matraz de fondo redondo de 2 bocas de 25 mL provisto de agitación magnética, se disolvió γ -CD (0.2 g, 0.15 mmol) en



5 mL de DMSO. Sobre esta disolución se añadió ácido lipoico (0.25 g, 1.2 mmol) y CDI (0.2 g, 1.2 mmol) disueltos en 5 mL de DMSO. La disolución se calentó a 80°C y se dejó en agitación 24 horas.

Trascurrido este tiempo, se dejó enfriar a temperatura ambiente y la mezcla de reacción se vertió sobre 100 mL de 2-propanol, originándose un precipitado de color blanquecino. La suspensión se centrifugó durante 8 minutos a 11000 rpm y el disolvente se eliminó por decantación. El sólido resultante fue lavado con 2-isopropanol, tras lo que se secó en una bomba a vacío durante 2 horas, obteniéndose un aceite amarillento. El producto **33** se obtiene como producto mayoritario de una mezcla de compuestos que se confirmó mediante espectroscopía FTIR y MS-MALDI-TOF. No fue posible calcular el rendimiento debido a la compleja mezcla obtenida y se procedió a su uso sin purificación previa.

IR (cm⁻¹): 3300 (OH), 1740 (RCOOR').

MS-MALDI-TOF: m/z calculada para C₄₄H₇₂O₃₁S₂·Na ([M+Na]⁺): 1509,23; encontrada 1509,26.

5.5.3 Síntesis de nanopartículas de oro estabilizadas con citrato (AuNPs)

Todas las reacciones se llevaron a cabo con material de vidrio previamente limpiado con agua regia. En un matraz de fondo redondo de 250 mL de dos bocas provisto de agitación magnética se añadió 100 mL de una disolución acuosa de HAuCl_4 1 mM y se calentó a reflujo. Al empezar la ebullición, se añadió 10 mL (38.8 mM) de una disolución acuosa de citrato de sodio y la disolución resultante se calentó a reflujo con fuerte agitación durante 30 minutos, momento en el que el color de la disolución se volvió rojo, indicando la formación de las nanopartículas de oro estabilizadas con citrato. Finalmente, la disolución se dejó enfriar a temperatura ambiente.

5.5.4 Procedimiento general de funcionalización de las AuNPs

A 5 mL de disolución de AuNPs, se le añadió bajo agitación 50 μL de una disolución de NaOH (0.5 M). Transcurrido un minuto, se añadió 200 μL de la disolución de la ciclodextrina funcionalizada con ácido lipoico correspondiente (**31**, **32** y **33**), que ha sido preparada de una concentración aproximada de 0.01 M en DMSO. La mezcla de reacción se agita durante toda la noche.

Transcurrido este tiempo y para eliminar el exceso de ligando que no había reaccionado, así como otras impurezas presentes en la mezcla (ciclodextrinas de partida), la disolución se centrifugó a 11000

rpm durante 18 minutos. El sobrenadante, que contiene las impurezas, es eliminado con cuidado recogiendo con una micropipeta. Las AuNPs se redisolviéron en el mismo volumen de agua miliQ. Este proceso se repite una vez más.

5.5.5 Ensayos de reconocimiento y detección

Las disoluciones de neurotransmisores usadas en los experimentos de reconocimiento y detección se prepararon con una concentración de 10 mM en 1 mL de agua desionizada.

En los ensayos de detección visual, sobre 100 μ L de las AuNPs funcionalizadas se adicionan 100 μ L de cada una de las disoluciones de neurotransmisores, de forma que en la mezcla de reacción la concentración de analito sea de 5 mM.

5.5.5.1 Preparación de disoluciones para medidas UV-Vis

Para todos los experimentos espectroscópicos, sobre 100 μ L de las nanopartículas AuNPs funcionalizadas se adicionan 100 μ L de cada una de las disoluciones de neurotransmisores, que han sido preparadas utilizando agua MiliQ como disolvente.

La reacción se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Posteriormente, al momento de realizar la medida en el UV,

se adicionan 300 μL de agua MiliQ para tener un volumen final de 500 μL .

Para los blancos, es decir, aquellas medidas en las que no hay analito, sobre 100 μL de las nanopartículas funcionalizadas se adicionan 100 μL de agua MiliQ. Igualmente se incubó la mezcla 10 minutos y al momento de realizar la medida, se adicionan otros 300 μL de agua d MiliQ para tener un volumen final de 500 μL .

5.5.5.2 Ensayos con otros disolventes y medios tamponados

Para 1 mL de la disolución de las nanopartículas AuNP- α se centrifugó a 11000 rpm durante 18 minutos y estas se redisolviéron en el mismo volumen del correspondiente disolvente.

En los ensayos, sobre 200 μL de las AuNPs funcionalizadas se adicionan 200 μL de cada una de las disoluciones de neurotransmisores (disueltos en agua MiliQ) y se dejó incubar la mezcla a temperatura ambiente durante 10 minutos.

Se procedió exactamente del mismo modo para las nanopartículas redisueltas en medios tamponados (Tabla 5). Los tampones utilizados fueron preparados en agua MiliQ, con una concentración de 0.01 M.

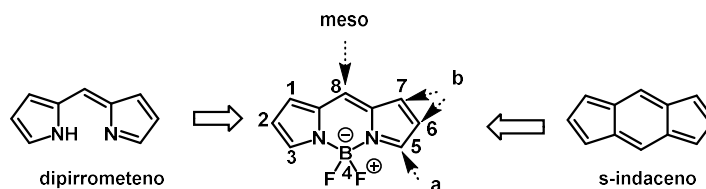
Capítulo 6: Detección fluorogénica de catecolaminas empleando derivados de BODIPY

6.1. Introducción

Las moléculas pequeñas fluorescentes son unas herramientas indispensables actualmente para el estudio de procesos biológicos y tienen muchas aplicaciones en detección, bioimagen, dispositivos electroluminiscentes, materiales optoelectrónicos, etc.¹⁵⁸ Dentro de este grupo de compuestos, destacan especialmente los borodipirrometenos (BODIPYs). Su síntesis se publicó por primera vez en 1968 por Treibs y Kreuzer,¹⁵⁹ pero no fue hasta los años 90 del siglo pasado cuando se reconoció su potencial como fluoróforos¹⁶⁰. Desde entonces, el número de publicaciones de investigación y patentes ha aumentado de manera muy significativa. Este éxito creciente se puede explicar debido a sus excelentes propiedades fotofísicas, como longitudes de onda de excitación/emisión en el rango del visible (aproximadamente 500 nm), elevados coeficientes de absorción molar (ϵ) y rendimientos cuánticos (ϕ), el tiempo de vida fluorescente (τ) en el rango de nanosegundos y la insignificante formación de estados triplete.¹⁶¹ Los BODIPYs son relativamente poco sensibles al pH y presentan buena solubilidad, resistencia a la autoagregación en solución y robustez frente a la luz y los productos químicos.¹⁶² Además, los perfiles espectroscópicos y fotofísicos se pueden cambiar introduciendo diferentes grupos electrón donantes o electrón atrayentes en las posiciones apropiadas del núcleo BODIPY.

6.1.1. Estructura y síntesis de BODIPYs

Los BODIPYs son derivados de 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diazo-s-indaceno (Esquema 46). Todas las posiciones del BODIPY son susceptibles de funcionalización.

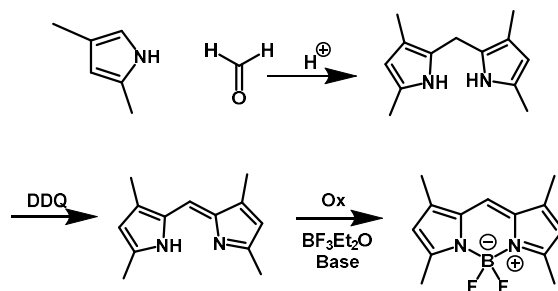


Esquema 46: Estructura del BODIPY y numeración de sus posiciones.

El núcleo de BODIPY es relativamente fácil de preparar a partir de pirroles disponibles comercialmente, a menudo con alto rendimiento y en cantidades de varios gramos. Se han descrito diferentes aproximaciones para la síntesis estos compuestos que podemos agrupar en 3 grupos:

- *Síntesis a partir de pirroles y aldehídos*

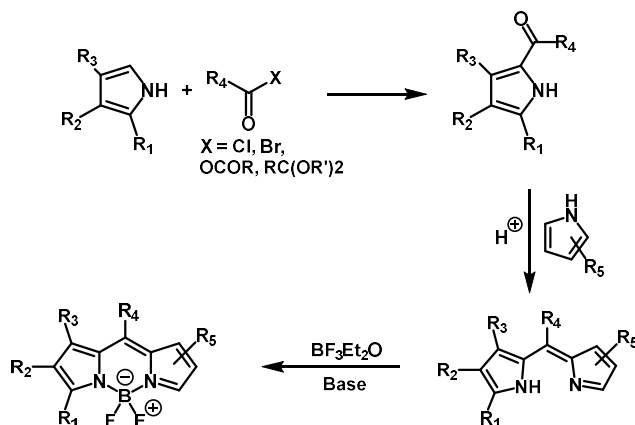
La condensación de aldehídos con pirroles, catalizada por ácidos, produce dipirrometanos, que se utilizan inmediatamente después de su preparación ya que son sensibles a la luz, el aire y los ácidos. La oxidación del dipirrometano produce un dipirrometeno. Esta oxidación se puede realizar con 2,3-dicloro-5,6-diciano-p-benzoquinona (DDQ) o 2,3,5,6-tetracloro-p-benzoquinona (p-cloranilo). El puente de difluoruro de boro se introduce mediante tratamiento con trifluoruro de boro eterato ($\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$), en presencia de una base (Esquema 47).^{163–165}



Esquema 47: Síntesis de BODIPYs a partir de pirroles y aldehídos.

● *Síntesis desde pirroles y cloruros de ácido o anhídridos*

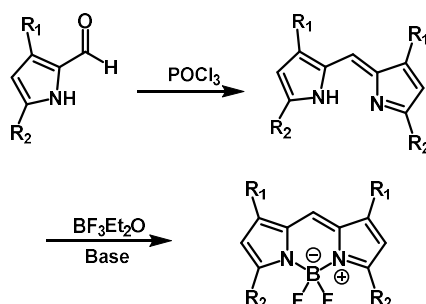
Otra ruta es la condensación de pirroles con un equivalente de un derivado de ácido. El acilpirrol intermedio reacciona en condiciones ácidas con un exceso de pirrol para formar un dipirrinio. Nuevamente, el tratamiento con un exceso de base y $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ produce el núcleo BODIPY.¹⁶⁶ La ventaja particular de este enfoque radica en la posibilidad de la síntesis de BODIPYs asimétricos, porque el acilpirrol aislado se puede combinar con un resto pirrol diferente en una condensación en medio ácido (Esquema 48). Se han descrito síntesis utilizando cloruros de ácido,¹⁶⁷ anhídridos¹⁶⁸ u ortoésteres.¹⁶⁹



Esquema 48: Síntesis de BODIPYs desde pirroles y derivados de ácidos.

● *Síntesis desde acilpirroles*

Esta ruta es una alternativa descrita por Wu y Burgess,¹⁷⁰ que consiste en la condensación de un acilpirrol con otro pirrol, en presencia de oxiclورو de fósforo. No siempre se requiere un segundo equivalente de otro pirrol ya que puede promover la condensación del pirrol-2-carbaldehído consigo mismo. Como en los demás casos, el dipirrometeno puede someterse a una complejación con un exceso de base y $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ para producir el BODIPY simétrico (Esquema 49). Los productos son obtenidos en un proceso “one pot” requieren una purificación menor, y generalmente se obtienen con altos rendimientos.



Esquema 49: Síntesis de BODIPYs a partir de acilpirroles.

La adaptabilidad sintética del cuerpo del BODIPY juega un papel importante en el diseño de nuevos colorantes. Los avances en la química de BODIPYs hacen posible la construcción de numerosos compuestos mediante la post-funcionalización del núcleo de BODIPY en lugar de, partir de pirroles apropiadamente sustituidos que no

siempre son asequible.¹⁷¹ Incorporando grupos con la densidad electrónica adecuada en las distintas posiciones del núcleo BODIPY, se pueden ajustar sus perfiles espectroscópicos y fotofísicos, lo que los hace sistemas muy versátiles.

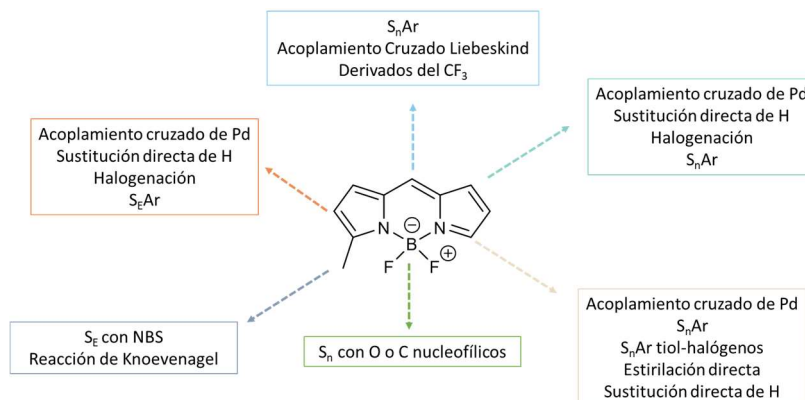


Figura 40: Reactividad del núcleo de BODIPY.

Las posiciones 3 y 5 (Esquema 46) pueden sufrir sustitución nucleofílica aromática (S_NAr), sustituciones directas de hidrógeno, esterilación directa y acoplamiento cruzado catalizado por Pd o sustitución electrofílica con NBS y reacciones tipo Knoevenagel en grupos metilo (Figura 40).^{172–175} Es posible realizar sustituciones electrofílicas aromáticas (S_EAr), sustituciones directas de hidrógeno y acoplamiento cruzado catalizado por Pd en las posiciones 2,6.^{84,176–178} Las posiciones 1,7 pueden halogenarse, dar reacciones de acoplamiento cruzado catalizadas por Pd o S_NAr .¹⁷⁹ En la posición meso pueden darse reacciones de S_NAr , acoplamiento cruzado de Liebeskind o la incorporación de un grupo meso- CF_3 .^{180–182} Además, se han reportado sustituciones nucleofílicas de flúor por nucleófilos de oxígeno o carbono en el centro de boro.^{183–185}

6.1.2 Aplicaciones de derivados de BODIPY en detección

Además de la gran variedad de reacciones químicas que pueden experimentar, los BODIPYs, presentan muchas propiedades físico-químicas interesantes. Presentan una gran estabilidad térmica y fotoquímica y en un amplio rango de pH y buena solubilidad en un amplio rango de disolventes orgánicos. Su estabilidad en entornos fisiológicos los convierte en una opción privilegiada para técnicas de imagen y etiquetado de proteínas. Las aplicaciones de estos compuestos son muy variadas. Concretamente, el uso del núcleo BODIPY como una subunidad de señalización en quimiosensores ópticos está muy extendido.^{186–188} Los beneficios de emplear quimiosensores ópticos en detección frente a los clásicos métodos analíticos son particularmente atractivos porque:

- Requieren instrumentación fácil, de bajo costo y ampliamente utilizada.
- Ofrecen la posibilidad de detectar la molécula diana "a simple vista"
- Son métodos no destructivos
- Requieren pequeñas cantidades de muestra
- Permiten realizar una detección rápida del analito en cuestión
- Permite el seguimiento en tiempo real

Solo para ilustrar las muchas posibilidades que ofrecen estos compuestos, vamos a describir algunos ejemplos recientes. Aunque están descritos muchos derivados de BODIPYs para la detección de

cationes y aniones, hemos escogido unos ejemplos para la detección de moléculas neutras que es lo que más nos interesaba para este trabajo.

Nuestro grupo de investigación ha publicado varios trabajos sobre la detección de simulantes de agentes de guerra química mediante el uso de sistemas basados en BODIPYs.^{189–191} Destacaremos uno de ellos que permite discriminar entre DFP (sarín) y DCNP (tabún).¹⁹² Se estudió el comportamiento cromogénico del compuesto que se muestra en el Figura **41** en acetonitrilo. La adición de DCNP indujo una marcada disminución en la banda centrada en 591 nm, y la aparición de nuevas bandas a 515 y 560 nm, observando un cambio de color de rosa brillante a naranja. Por el contrario, se observó una respuesta cromogénica muy diferente cuando el DFP reaccionó en las mismas condiciones. En este caso, se observó un cambio batocrómico importante de la banda de absorción visible de 590 a 715 nm. Este cambio batocrómico se reflejó en una modulación de color de rosa brillante a azul claro.

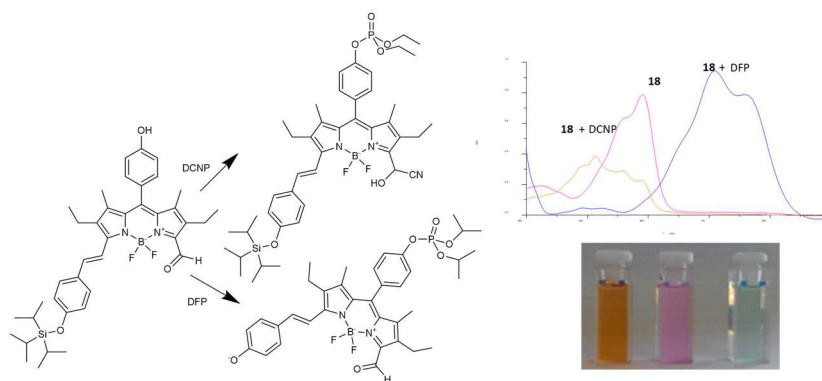


Figura 41: Discriminación entre DFP y DCNP con un derivado de BODIPYs.

La diferente respuesta cromogénica observada tras la adición de DCNP y DFP estaba relacionada con la liberación de aniones CN^- y F^- , tras la fosforilación del resto fenol. El cianuro (el subproducto único del DCNP (simulante de Tabun) reaccionó con el grupo carbonilo en la posición 3 del núcleo BODIPY para producir un resto cianohidrina rico en electrones. Por su parte, el fluoruro (el subproducto único del simulante de sarín y somán DFP) indujo la hidrólisis del grupo protector TIPS. La reacción de desprotección generó un ion fenóxido que se muestra como fuerte donante de transferencia de carga intramolecular (ICT) en conjugación completa con el núcleo BODIPY y dio como resultado un gran desplazamiento hacia el rojo en la absorbancia.

Nuestro grupo también ha estudiado la detección óptica de ciertos neurotransmisores empleando BODIPYs como sensores. En ese sentido se preparó el derivado de BODIPY que se muestra en la Figura **42** para detectar monóxido de nitrógeno.¹⁹³ Este sistema, en acetonitrilo, mostró una banda de absorción intensa a 500.5 nm ($\log \epsilon = 7.6$) y una banda de emisión intensa a 520,5 nm ($\lambda_{\text{exc}} = 478 \text{ nm}$, $\Phi = 0,570$). Se observó quenching de la fluorescencia del compuesto cuando se añadió Cu^{2+} , lo que se atribuye a la coordinación del catión con el grupo bipyridina. Por el contrario, Cu^+ no indujo ningún cambio en la fluorescencia. El mecanismo de detección se basó en la capacidad conocida del NO para reducir Cu^{2+} a Cu^+ . Por tanto, el analito redujo el catión con la consiguiente descomplejación y la recuperación de la fluorescencia del ligando. La capacidad de detección fluorogénica de

la sonda también se observó a simple vista. En particular, se observó claramente una emisión de color verde brillante cuando las soluciones del complejo con NO se iluminaron con una lámpara UV convencional a 254 nm. Finalmente, también se llevaron a cabo con éxito estudios de detección de NO en células.

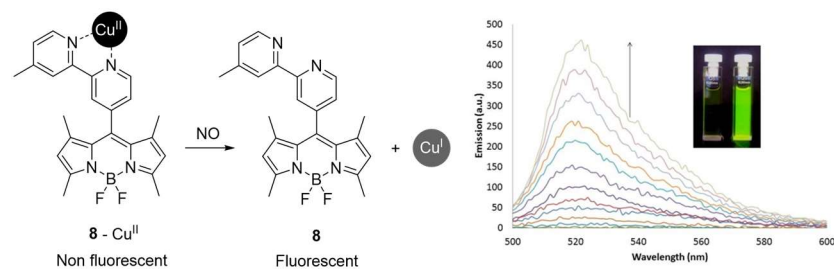


Figura 42: Complejo de Cu²⁺ para la detección de NO.

En 2011, Chang *et al.* describen el único BODIPY que se ha publicado como sensor de dopamina (Figura 43).¹⁹⁴

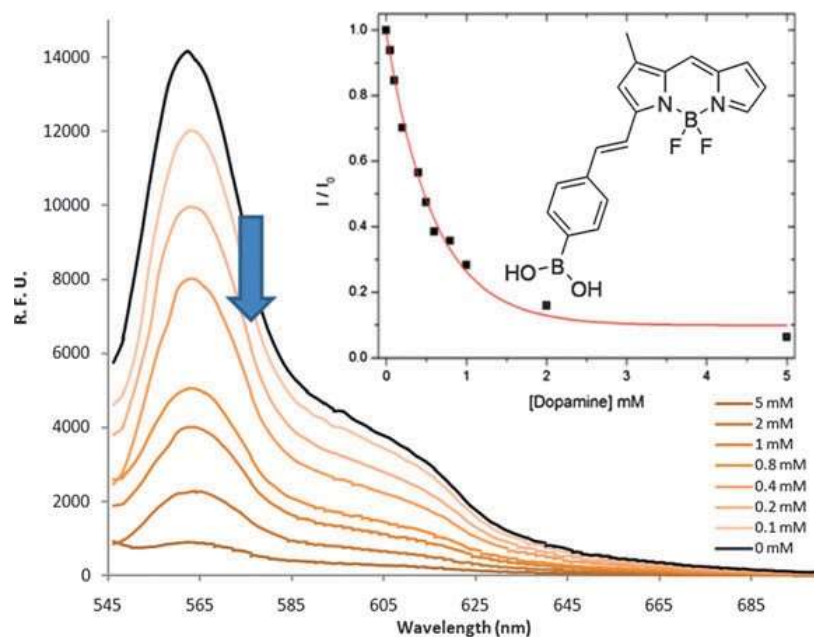


Figura 43: Quenching de la fluorescencia observada por la interacción con dopamina.

Dentro del estudio de una librería de BODIPYs y su interacción con distintas biomoléculas en medios fisiológicos, observaron que el BODIPY que se muestra en la figura interaccionaba con dopamina, provocando un quenching de la fluorescencia a 562 nm, con una constante de disociación de 0.49 μM . Este comportamiento es atribuido a la interacción del grupo catecol con el ácido borónico que contiene el BODIPY. Es de suponer que el resto de las catecolaminas también se comportarían de igual manera aunque los autores no hacen referencia a ese estudio.

Por último, se puede destacar el trabajo publicado por Sankar et al.¹⁹⁵ que diseñan un BODIPY con un anillo aromático polifluorado

en posición meso que les permite discriminar entre aminas primarias, secundarias y terciarias (Figura 44).

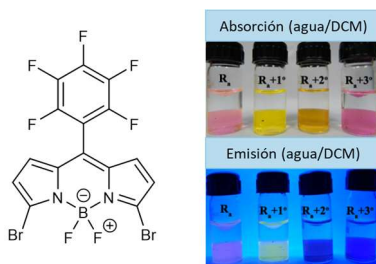


Figura 44: Respuesta colorimétrica y fluorimétrica del Sistema dibromo polifluorado con metil amina, dietilamina y trietilamina.

La importante deficiencia electrónica que provoca el anillo polifluorado en posición meso, permite que los átomos de bromo de las posiciones 3 y 5 del BODIPY puedan sufrir reacciones de S_NAr por las aminas. Los efectos electrónicos de los sustituyentes en el átomo de nitrógeno amínico son los responsables de la discriminación selectiva entre las aminas alifáticas.

6.2 Objetivos

El objetivo principal de este capítulo es el diseño y síntesis de un quimiodosímetro cromo/fluorogénico, basado en un núcleo de BODIPY, para la detección selectiva de catecolaminas.

Para ello se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Diseño, síntesis y caracterización de derivados de BODIPY incorporando en su estructura grupos funcionales capaces de interaccionar específicamente con las catecolaminas.
- Evaluación de la capacidad de las moléculas sintetizadas para actuar como quimiodosímetros para la detección óptica de las distintas catecolaminas.

6.3 Resultados y discusión

6.3.1 Diseño del dosímetro

Los neurotransmisores que van a ser objeto de estudio como analitos para nuestro dosímetro pertenecen a la familia de las aminas biógenas, concretamente al grupo de las catecolaminas, las cuales se caracterizan por albergar grupos amina y catecol en su estructura (Figura 45). Para llevar a cabo el diseño de un quimiodosímetro capaz de detectar este tipo de moléculas, se necesita funcionalizar la unidad señalizadora (el núcleo de BODIPY) con las unidades receptoras más adecuadas para el reconocimiento molecular de los dos grupos funcionales presentes en estos neurotransmisores (el grupo catecol y el grupo amino o beta-aminoalcohol).

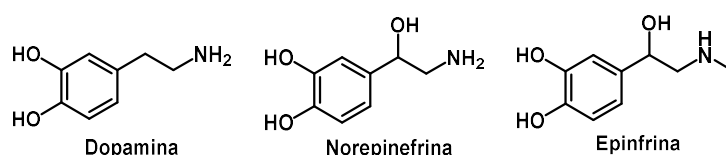
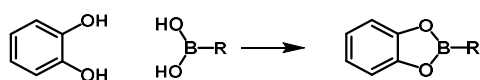


Figura 45: Catecolaminas.

Es conocido que el grupo catecol interacciona de manera selectiva con ácidos borónicos para formar ésteres borónicos, tal y como podemos observar en el Esquema 50.



Esquema 50: Reacción de formación de un éster borónico.

Por lo tanto, la interacción entre estos dos grupos funcionales permitiría la detección selectiva del grupo catecol.

Por otro lado, para reconocer (y en la medida de lo posible diferenciar) los grupos amino o aminoalcohol presentes en los tres analitos estudiados, se decidió hacer uso de la reacción entre estos grupos funcionales y un aldehído, ya que el producto de reacción resultante en cada caso presentaría características distintas y nos permitiría discernir entre las tres estructuras formadas (Figura 46). La dopamina daría lugar a una imina, o a una tetrahidroisoquinolina a través de una reacción de ciclación de Pictet-Spengler, mientras que la reacción con norepinefrina (noradrenalina) o epinefrina (adrenalina) podría dar lugar a oxazolidinas.

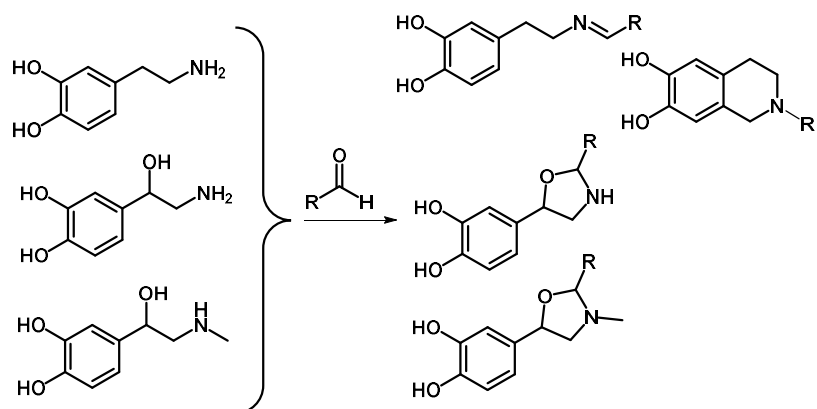


Figura 46: Interacciones entre las catecolaminas y un grupo aldehído.

Así pues, se decidió diseñar un dosímetro consistente en un núcleo de BODIPY funcionalizado con un grupo ácido borónico para la interacción con el grupo catecol y un grupo aldehído para reaccionar

selectivamente con los grupos amino y aminoalcohol de los analitos. Ambos grupos receptores deberán estar separados la distancia apropiada para permitir la interacción simultánea con los dos grupos funcionales de las catecolaminas.

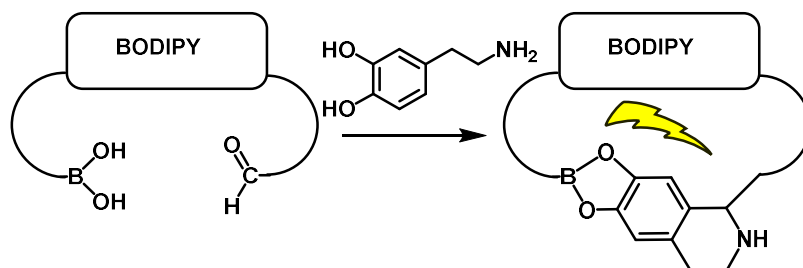


Figura 47: Estrategia para el diseño de un quimiosensor óptico para catecolaminas basado en un BODIPY funcionalizado.

5.3.2 Primera aproximación

El primer quimiodosímetro que nos planteamos sintetizar se muestra en la Figura 48, y consistió en un núcleo de BODIPY funcionalizado con un grupo aldehído unido directamente a la posición 3 del BODIPY y un derivado del ácido fenilborónico en la posición 5 del BODIPY.

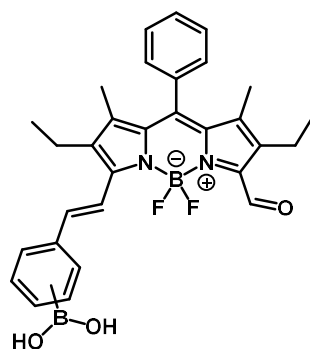
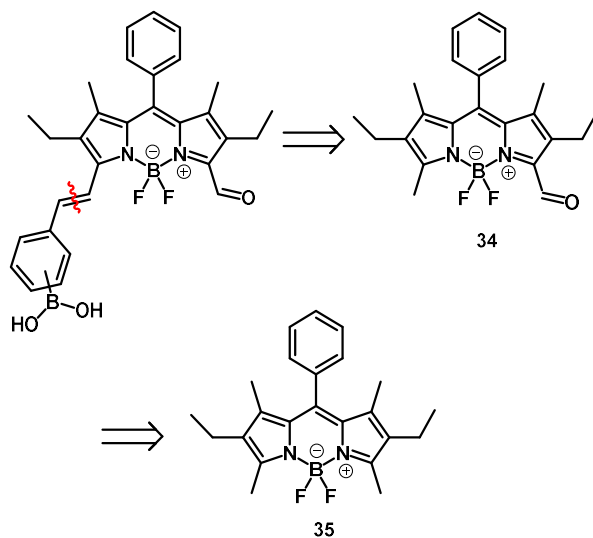


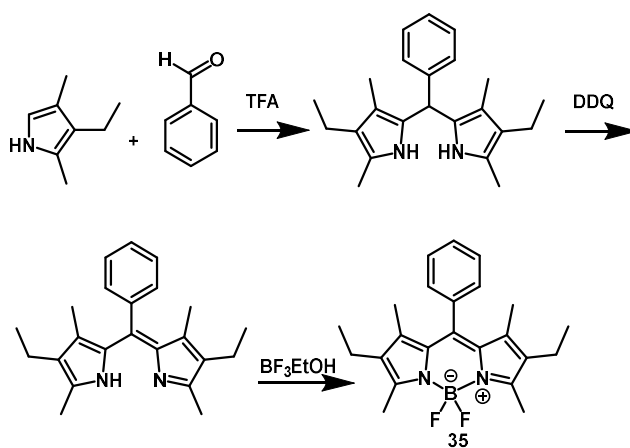
Figura 48: Primera aproximación.

Para abordar la síntesis del sensor se planteó el análisis retrosintético que se muestra en el Esquema 51. El grupo fenilborónico podría introducirse en el BODIPY por una reacción de Knoevenagel sobre el metilo de la posición 5 con un aldehído aromático que contuviese el ácido borónico en una disposición adecuada. Por otro lado, el metilo de la posición 3 debería ser oxidado selectivamente a aldehído. Finalmente, el BODIPY **35** podría construirse a partir del pirrol correspondiente y benzaldehído por métodos bien conocidos.



Esquema 51: Retrosíntesis primera aproximación.

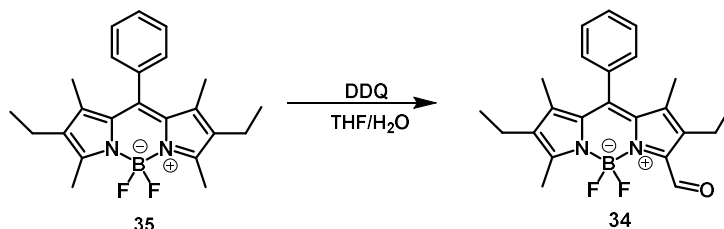
En primer lugar, se sintetizó el BODIPY **35** que incorpora un grupo fenilo en la posición *meso*, metilos en los carbonos 1,3, 5 y 7 y grupos etilo en 2 y 6 bajo las condiciones descritas en la introducción para la síntesis de BODIPYs a partir de pirroles y aldehídos. Para ello, se hizo reaccionar 3-etil-2,4-dimetilpirrol con benzaldehído en presencia de ácido trifluoroacético para formar el correspondiente dipirrometeno, llevando a cabo en el mismo matraz de reacción su posterior oxidación con DDQ y la formación del puente de difluoruro de boro mediante la adición de $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ y posterior tratamiento con trietilamina. DE esta manera se obtuvo el compuesto **35** con un rendimiento del 13.6 %.



Esquema 52: Síntesis del compuesto **35**.

La razón de introducir los dos grupos etilo en las posiciones 2 y 6 del BODIPY, fue para evitar que en la posterior etapa de oxidación selectiva del metilo en posición 3 (ó 5) del BODIPY para obtener el grupo aldehído, se produjera también la oxidación indeseada de dichas posiciones.

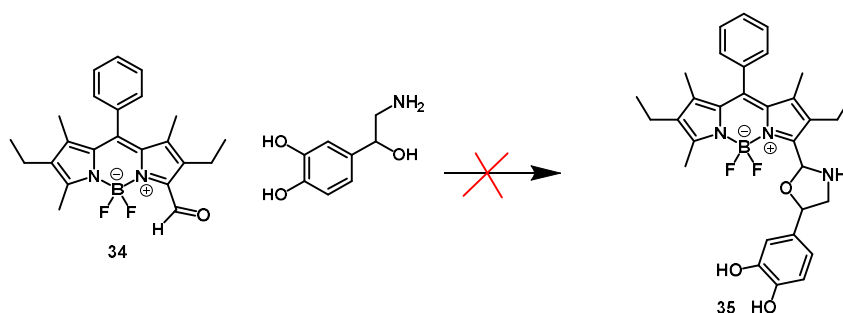
Una vez obtenido **35** se decidió probar la oxidación del metilo en la posición 3 para generar el aldehído **34**. Este paso se llevó a cabo haciendo uso de DDQ como oxidante y una mezcla THF/agua como disolvente, lo que permitió obtener regioselectivamente el BODIPY con un grupo aldehído unido directamente en la posición 3, con un rendimiento del 48 % (Esquema 53).



Esquema 53: Obtención compuesto 34.

Una vez sintetizado el compuesto **34** y antes de intentar introducir el grupo fenilborónico en el sensor, se decidió evaluar la reactividad del grupo aldehído con las distintas catecolaminas.

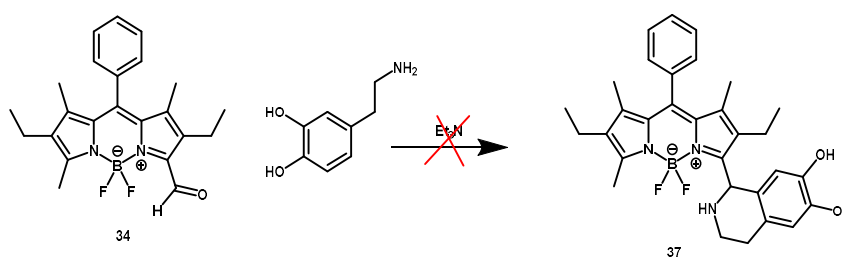
En primer lugar, se hizo reaccionar el compuesto **34** en etanol con norepinefrina a temperatura ambiente durante 30 minutos (Esquema 54). Después de analizar la mezcla de reacción mediante resonancia magnética nuclear de protón, se observaron ambos productos de partida inalterados, indicando que no había tenido lugar ninguna reacción.



Esquema 54: Reacción de norepinefrina con 34.

Se realizaron varios ensayos cambiando el pH del medio para ver si se incrementaba la reactividad. Se emplearon tanto medios básicos (NaOH o trietilamina como bases) como ligeramente ácidos (AcOH) y distintas mezclas de disolventes (EtOH, CH₃CN/H₂O), pero en todos los casos, los análisis de los crudos de reacción mediante RMN mostraron que se recuperaban los productos de partida inalterados.

Debido a la baja reactividad que mostraba la norepinefrina, se decidió cambiar de analito y evaluar la reactividad del compuesto **34** frente a dopamina (Esquema 55).



Esquema 55: Reacción de dopamina con 34.

La reacción con dopamina se llevó a cabo utilizando como disolvente una mezcla de MeOH:H₂O (1:1). Sin embargo, el análisis de la mezcla de reacción mediante resonancia magnética nuclear de protón, de nuevo mostró únicamente la presencia de los productos de partida inalterados. Se repitió la reacción utilizando tolueno como disolvente y con un montaje Dean-Stark para la eliminación azeotrópica del H₂O formada pero tampoco se obtuvo el producto de reacción. De igual modo, se trató de utilizar ácido acético glacial para aumentar la reactividad de la mezcla de reacción sin éxito. Se probaron distintas condiciones de reacción no obteniéndose los resultados positivos en ninguno de los casos. Se probaron distintos disolventes y tampones como EtOH, MeCN:H₂O, MeOH:HEPES (0.05 M), Tolueno y CHCl₃ y tampoco se obtuvieron buenos resultados. También se probaron distintas bases: NaOH (1 eq), Et₃N (1 eq), glicina y sacarosa en cantidades catalíticas y, también, ácido acético glacial con MgSO₄ anhídrido. En ninguno de los casos se obtuvo el compuesto deseado.

Con el objetivo de simplificar estructuralmente el nucleófilo de la reacción y poder atribuir la falta de reactividad al grupo aldehído se hizo reaccionar el BODIPY con bencilamina, pero de nuevo se recuperaron los productos de partida.

Una posible explicación para la baja reactividad observada podría ser que al estar el aldehído del compuesto **34** directamente unido al núcleo del BODIPY hubiera efectos estéricos o electrónicos desfavorables. Así pues, se decidió diseñar un nuevo dosímetro separando el grupo aldehído del núcleo del BODIPY.

6.3.3 Segunda aproximación: empleo de espaciadores entre el grupo aldehído y el núcleo de BODIPY

Para intentar minimizar los posibles efectos estéricos producidos el cuerpo del BODIPY, se ensayaron distintos espaciadores intentando extender la conjugación del BODIPY al grupo aldehído para que la interacción con el analito diera lugar a un cambio colorimétrico.

Empleo de estireno como espaciador.

Se planteó en primer lugar utilizar un derivado del tereftaldehído como espaciador entre el cuerpo del BODIPY y el grupo aldehído, tal y como se muestra en la Figura 49.

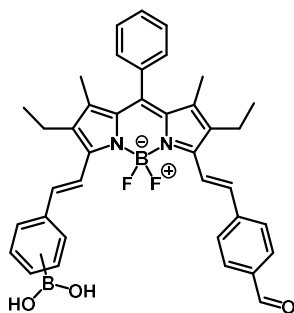
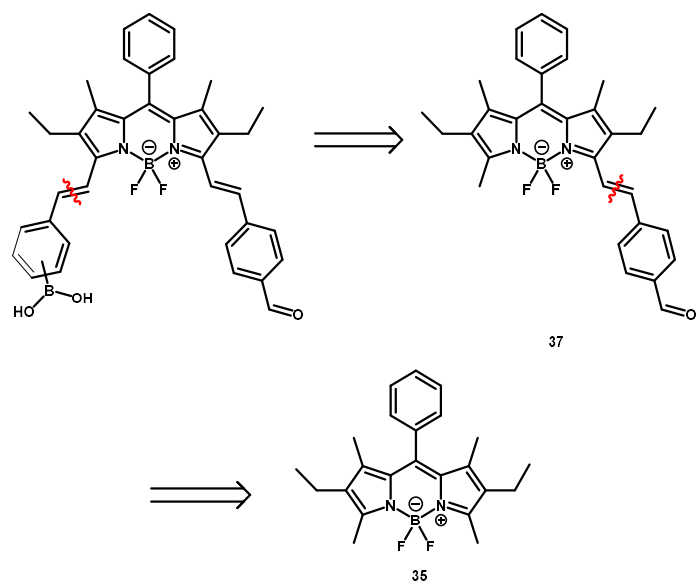


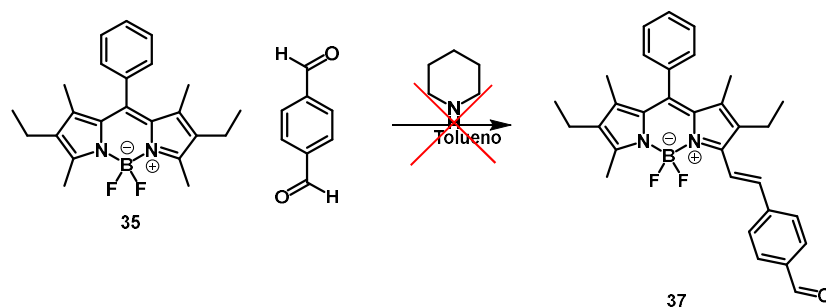
Figura 49: Segunda aproximación.

Como se muestra en el Esquema 56, se decidió utilizar reacciones de condensación de Knoevenagel entre los metilos de la posición 3 y 5 del núcleo de BODIPY y los aldehídos correspondientes.¹⁹⁶



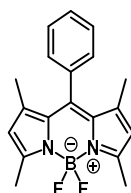
Esquema 56: Análisis retrosintético de la segunda aproximación.

Para ello, se hizo reaccionar el compuesto **35** con aldehído tereftálico en presencia de piperidina y ácido acético en tolueno, en las condiciones clásicas para este tipo de reacciones, utilizando un montaje de Dean-Stark con el objetivo de retirar el agua generada durante la reacción. Se dejó reaccionar 14 horas a reflujo, siguiendo la reacción mediante cromatografía de capa fina (CCF). Tanto la CCF como el posterior análisis del crudo de reacción mostraron que la reacción no había tenido lugar, recuperándose los productos de partida inalterados (Esquema 57).



*Esquema 57: Reacción de Knoevenagel entre el compuesto **35** y tereftaldehído.*

Para intentar poner a punto las condiciones de esta reacción, se decidió trabajar con un BODIPY más sencillo (el compuesto **38**, que se muestra en la Figura 50) sin los grupos etilo en las posiciones 2 y 6 porque no se someterá el sistema a ningún proceso de oxidación y su síntesis es menos costosa.

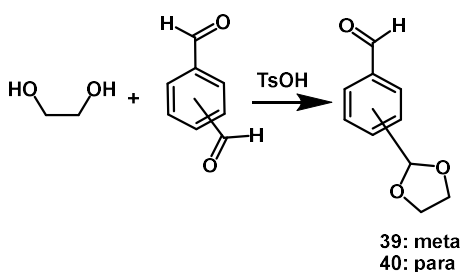


*Figura 50: Compuesto **38**.*

Para sintetizar el compuesto **38** se hizo reaccionar 2,4-dimetilpirrol con benzaldehído en presencia de ácido trifluoroacético para formar el dipirrometeno, llevando a cabo in situ su oxidación con DDQ y posterior formación del puente de difluoruro de boro mediante tratamiento con $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ y trietilamina obteniéndose así el BOSIPY **38** con un rendimiento del 20 %.

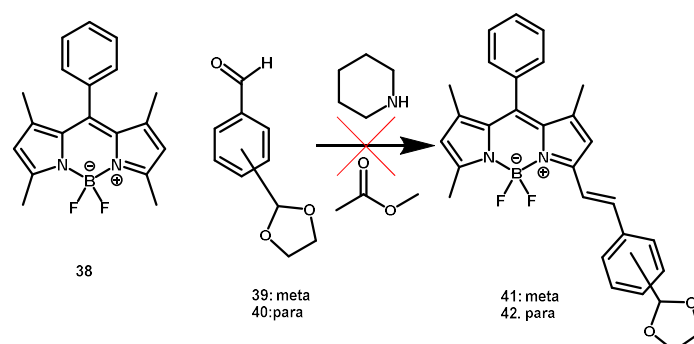
Por otro lado, se decidió proteger uno de los grupos aldehído del aldehído tereftálico como acetal, para convertirlo en un compuesto menos electrón atrayente. Así mismo, se quiso ensayar la reacción con el aldehído isoftálico (con los dos grupos aldehído en meta) que proporcionaría también un receptor adecuado para las catecolaminas.

La protección de ambos dialdehídos se llevó a cabo haciendo uso de etilenglicol como grupo protector en presencia de ácido p-toluensulfónico (Esquema 58). Los aldehídos monoprotegidos se obtuvieron sin dificultad con rendimientos del 27 % (*meta*) y 13% (*para*).



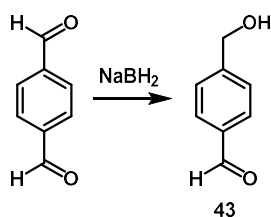
Esquema 58: Protección tereftaldehído y isoftaldehído.

Sin embargo, todos los intentos de realizar la reacción de Knoevenagel entre ambos aldehídos monosustituídos y el compuesto **38** no condujeron al producto de reacción deseado, en ninguna de las condiciones de reacción empleadas (distintas temperaturas y tiempos de reacción) (Esquema 59).



*Esquema 59: Intento de síntesis de los compuestos **41** y **42**.*

Se probó también a realizar la reacción de Knoevenagel entre el BODIPY **38** y 4-(hidroximetil)benzaldehído **43**, por si la presencia del grupo acetal pudiera estar afectando a la reacción. El compuesto **43** se obtuvo fácilmente, con un 43 % de rendimiento, por reducción del aldehído tereftálico con borohidruro sódico a temperatura ambiente (Esquema **60**).

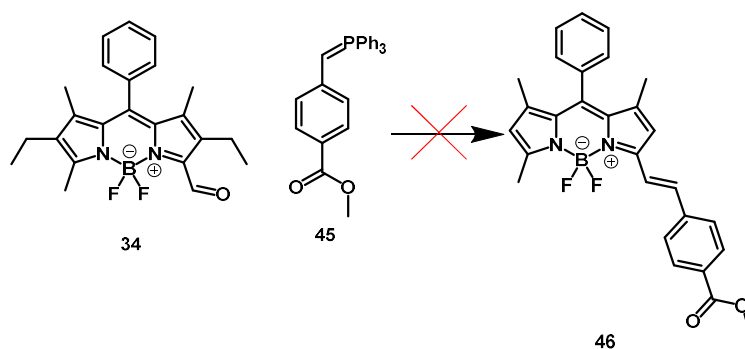


Esquema 60: Reducción de tereftaldehído.

Sin embargo, el análisis del crudo de la reacción entre el BODIPY **38** y el compuesto **43** mostraba únicamente la presencia de los reactivos de partida.

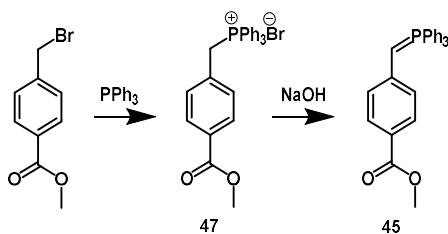
Debido a la dificultad de utilizar la reacción de Knoevenagel como estrategia para unir ambas partes del dosímetro, se decidió

cambiar la metodología sintética y utilizar una reacción de Wittig¹⁹⁷ entre el aldehído **34** previamente preparado y un iluro de fósforo apropiado, como se observa en el Esquema 61.



*Esquema 61: Intento de reacción de Wittig entre **34** y **45**.*

El compuesto **45** posee un grupo éster que posteriormente podría reducirse a aldehído. Para sintetizarlo se hizo reaccionar trifetilfosfina y 4-(bromometil)benzoato de metilo obteniéndose la sal correspondiente **47**, con un rendimiento del 54 %, seguido de reacción con NaOH para dar lugar al iluro de fósforo (Esquema 62).

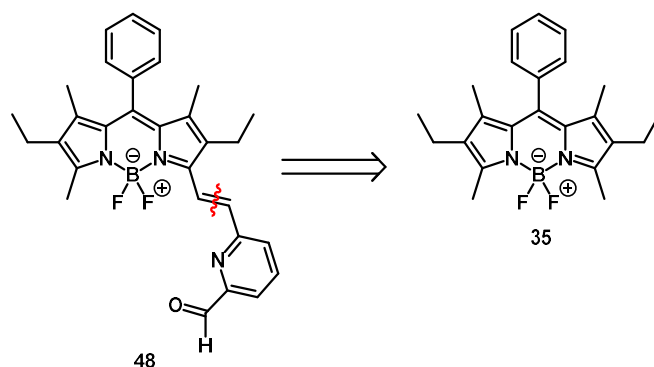


Esquema 62: Obtención del iluro de fósforo.

Sin embargo, todos los intentos de realizar una reacción de Wittig entre el aldehído **34** y el iluro **45**, bajo diversas condiciones, condujeron o bien a productos de partida o a mezclas difíciles de resolver en las que no se detectaba el producto deseado.

Empleo de alquenilpiridina como espaciador.

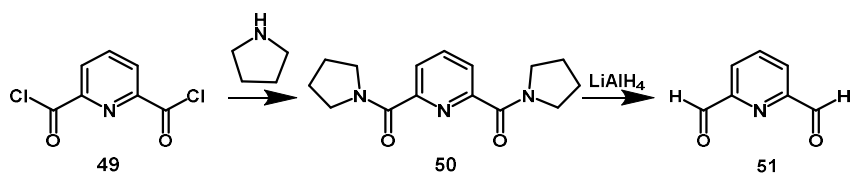
Se intentó también realizar la reacción de Knoevenagel sustituyendo el anillo de benceno por un anillo de piridina como espaciador (Esquema **63**). Con ello se pretendía también favorecer la interacción del dosímetro con las catecolaminas a través de posibles enlaces de hidrógeno entre el grupo amino y el par de electrones libres de la piridina.



Esquema 63: Retrosíntesis de 48.

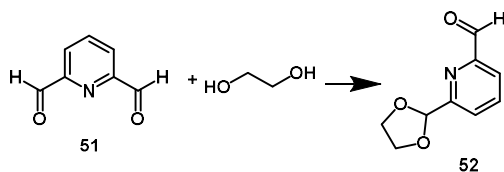
Para llevar a cabo la síntesis de este compuesto, se decidió llevar a cabo una reacción de Knoevenagel entre el BODIPY **35** y 2,6-diformilpiridina **51**. Previamente, el compuesto **51** se sintetizó con buen rendimiento (17 %) en dos etapas a partir del dicloruro de ácido

correspondiente (compuesto **49**) por reacción con pirrolidina para obtener la correspondiente diamida **50** (82 % de rendimiento), seguido de reducción con LiAlH_4 (Esquema 64).



Esquema 64: Síntesis compuesto 51.

De la misma manera que se hizo con los aldehídos tereftálico e isoftálico, se decidió proteger uno de los dos grupos aldehídos como acetal del etilenglicol para evitar una doble reacción de Knoevenagel o posibles reacciones de polimerización (Esquema 65).



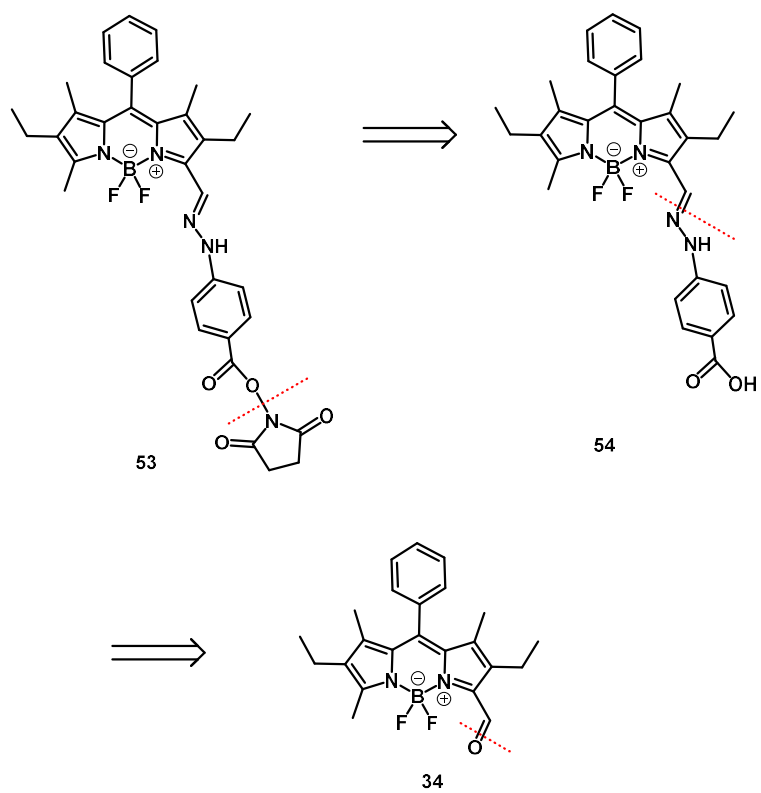
Esquema 65: Síntesis compuesto 52.

Sin embargo, de nuevo todos los intentos de reacción del BODIPY **35** con el aldehído **52**, en condiciones de Knoevenagel, condujeron a la recuperación de los productos de partida inalterados.

6.3.4 Tercera aproximación: Funcionalización del BODIPY con un éster de N-hidroxisuccinimida para la formación amidas con las catecolaminas

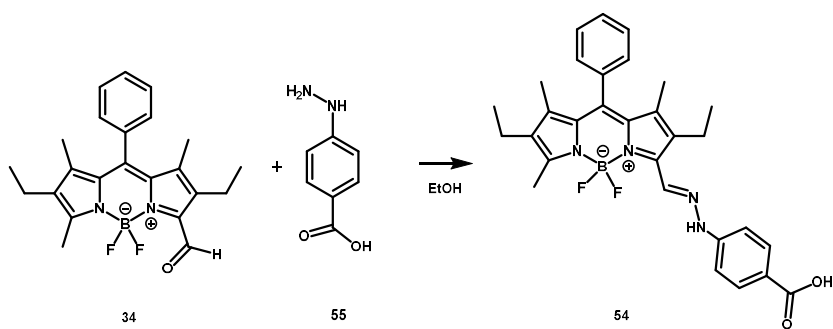
Debido al fracaso en los intentos de reacción de Knoevenagel entre los 3,5-dimetil BODIPYs **35** y **38** y los distintos aldehídos aromáticos ensayados, se decidió cambiar la estrategia y ensayar la detección de catecolaminas a partir de la formación de una amida entre el grupo amino de los neurotransmisores y un derivado de ácido activado, unido al BODIPY. Concretamente un éster de N-hidroxisuccinimida (NHS).

Para la obtención del correspondiente BODIPY funcionalizado con un éster NHS, se decidió emplear una reacción de formación de hidrazonas, que ya se había empleado previamente en nuestro grupo de investigación, entre el aldehído **34** y el ácido 4-hidrazinobenzoico. El grupo ácido carboxílico puede posteriormente transformarse en un éster de N-hidroxisuccinimidilo, por reacción con N-hidroxisuccinimida y un agente de condensación. Así pues, se planteó la síntesis del compuesto **53** tal y como se muestra en el Esquema **66**, el éster **53** se obtendría a partir del ácido **54** por reacción con N-hidroxisuccinimida. A su vez el compuesto **54** se obtendría de la reacción entre el compuesto **34** sintetizado previamente y el ácido 4-hidrazinobenzoico, disponible comercialmente.



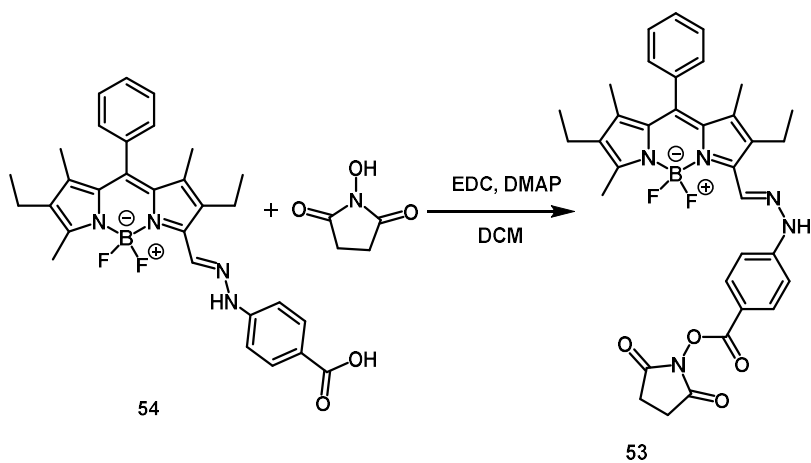
Esquema 66: Retrosíntesis cuarta aproximación.

La hidrazona **54** se obtuvo con un 75 % de rendimiento (Esquema **67**).



Esquema 67: Síntesis del compuesto 54.

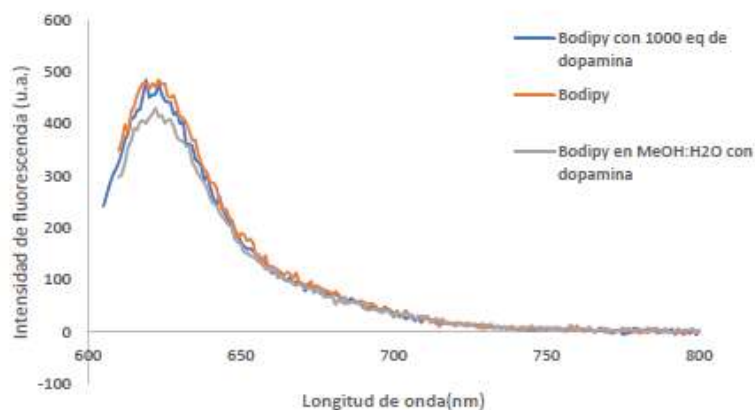
Una vez obtenida la hidrazona **54**, se procedió a la síntesis del N-hidroxisuccinimidil ester **53** por reacción de ésta con N-hidroxisuccinimida en presencia de EDC y DMAP en DCM, con un 9 % de rendimiento (Esquema **68**).



Esquema 68: Síntesis del compuesto 53.

Estudios de la respuesta de la sonda 53 frente a las catecolaminas

Llegado a este punto se llevaron a cabo estudios de UV-Vis y fluorescencia con el compuesto **53** en ausencia y en presencia de un exceso de dopamina, para evaluar su capacidad como grupo sensor de las catecolaminas.



Gráfica 18: Espectros de fluorescencia del compuesto **53** (10^{-5} M en metanol)

En la Gráfica **18** se muestran los espectros de emisión de fluorescencia del compuesto **53** disuelto en MeOH en ausencia y presencia de dopamina. El compuesto **53** presenta un máximo de emisión de fluorescencia alrededor de 625 nm ($\lambda_{\text{exc}} = 365$ nm).

Si se analiza la gráfica se puede observar que el máximo de emisión es prácticamente el mismo en presencia y ausencia de dopamina, no se da variación (línea azul). Se añade un gran exceso de disolución de dopamina (línea gris), pero el único efecto que se observa es la disminución de la señal relacionada con el efecto del agua en el BODIPY. A tenor de estos resultados se puede concluir que,

de haber interacción entre el compuesto **53** y la dopamina, esta interacción no da lugar a un cambio de las propiedades fluorescentes del quimiodosímetro.

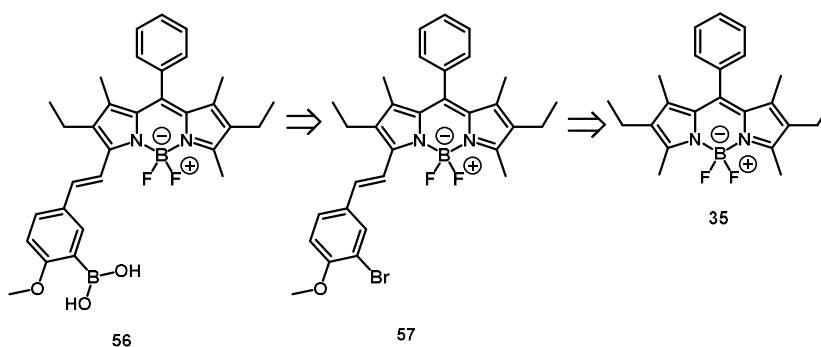
Estos resultados parecen apoyar la necesidad de que el BODIPY interaccione también con el grupo catecol de la catecolamina por medio del ácido borónico. Ello debería inducir cambios importantes en la rigidez del dosímetro lo que se traduciría en un cambio en su intensidad de fluorescencia.

6.3.5 Ensayos de funcionalización del BODIPY con un ácido fenilborónico

Una vez funcionalizado el núcleo de BODIPY en la posición 3- con un éster de NHS capaz de interaccionar con los grupos amino y aminoalcohol de los analitos, se decidió ensayar la incorporación de un derivado del ácido fenilborónico en el extremo opuesto del BODIPY (posición 5-), para interaccionar selectivamente con el grupo catecol de los analitos.

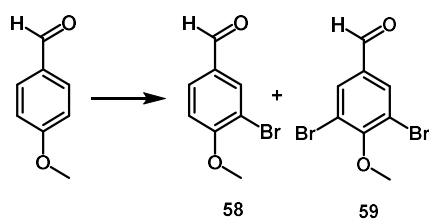
Para ello, se decidió llevar a cabo previamente el estudio de las condiciones óptimas de reacción para incorporar el ácido fenilborónico empleando como reactivo de partida el BODIPY **35** previamente sintetizado y utilizando de las condiciones clásicas de la reacción de Knoevengel para la obtención de derivados estirénicos.

En un primer momento se pensó sintetizar el bromoderivado **57** a partir de **35** y posteriormente obtener el ácido borónico **56** a partir de una reacción de borilación de Miyaura con el compuesto **57**.



Esquema 69: Síntesis 56.

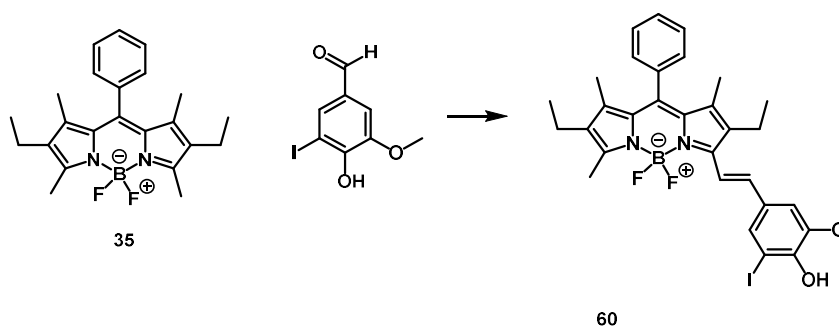
Para ello se partió de *p*-anisaldehído, que se hizo reaccionar con bromo en DCM, con lo que se obtuvo tanto el producto monobromado **58** como el dibromado **59**, con rendimientos del 41 % y 16 % respectivamente (Esquema 70).



Esquema 70: Síntesis del compuesto 58.

De nuevo se intentó llevar a cabo una condensación de Knoevenagel, entre el aldehído del **58** y el BODIPY **35**, pero se volvieron a recuperar los productos de partida.

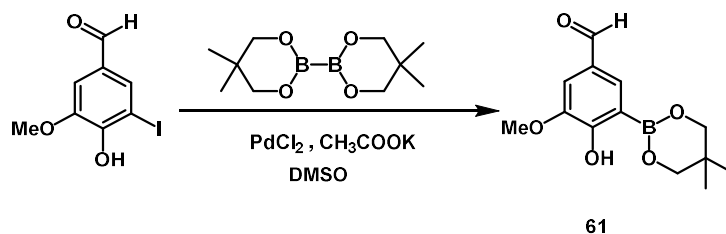
Por si el problema se derivara de la presencia del bromo, y dado que en el grupo se habían llevado a cabo satisfactoriamente reacciones de condensación entre el metilo en la posición **3** de derivados de BODIPY y 5-iodovainillina o sustratos parecidos, se decidió llevar a cabo la reacción de Knoevenagel entre el compuesto **35** y 5-iodovainillina en presencia de piperidina y ácido acético. En este caso sí pudo obtenerse el compuesto **60**, aunque con un rendimiento muy bajo.



Esquema 71: Síntesis del compuesto 60.

El siguiente paso era hacer reaccionar el compuesto **60** con Bis(glicolato de neopentilo)diboro en presencia de una cantidad catalítica de Pd(0), para la introducción del ácido borónico (borilación de Miyaura). Como la cantidad obtenida del compuesto **60** era muy pequeña se decidió llevar a cabo primero la reacción con 5-iodovainillina comercial para buscar las condiciones de reacción más adecuadas. Se encontró finalmente que la reacción entre iodovainillina y diborano en presencia de acetato potásico y PdCl₂ en

DMSO durante 16 horas (Esquema 72) permitió la obtención del boronato **61**, aunque con un rendimiento muy bajo (4 %).



Esquema 72: Síntesis compuesto 61.

A pesar de ello, se intentó hacer reaccionar el BODIPY **60** con diboro glicolato de neopentilo, en las mismas condiciones que la reacción anterior para intentar obtener el compuesto **61** (Figura 51), pero no se obtuvo el producto deseado y tampoco pudo recuperarse el reactivo de partida, observándose una mezcla muy compleja de productos que no pudo identificarse.

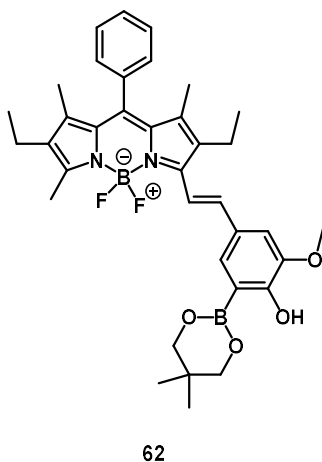


Figura 51: Compuesto 62.

6.3.6 Cuarta aproximación: Introducción de un ácido fenilborónico en la posición *meso* del núcleo de BODIPY

Dadas las dificultades encontradas en todos los intentos de funcionalizar las posiciones 3 o 5 del BODIPY con un ácido fenilborónico, se decidió cambiar el paradigma y diseñar un quimiosíntesis donde el ácido borónico estuviera unido al cuerpo del BODIPY a través de la posición *meso* y el aldehído se encontrara directamente unido al cuerpo del BODIPY en la posición 2. Para ello se decidió sintetizar los compuestos **63** y **64** (Figura 52) que se diferencian entre sí por la posición del ácido borónico respecto al cuerpo del BODIPY.

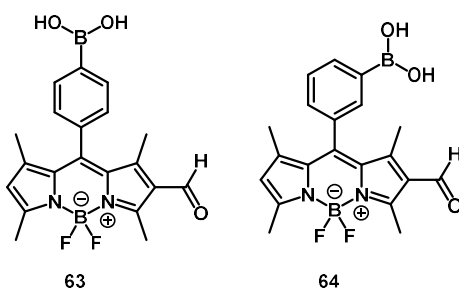
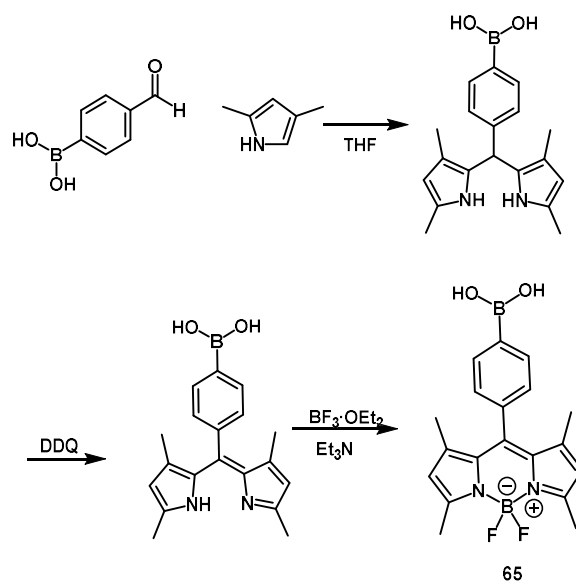


Figura 52: Estructura compuestos **63** y **64**.

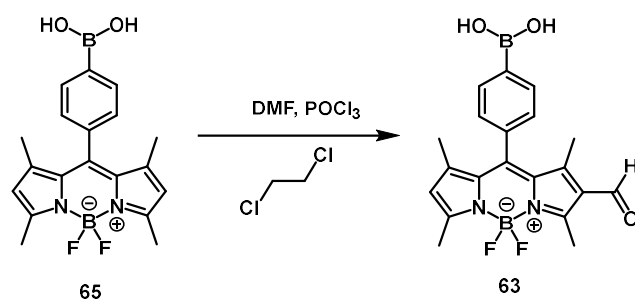
En primer lugar, se llevó a cabo la síntesis del compuesto **63**. Este aldehído podría obtenerse por formilación del correspondiente BODIPY **65**, obtenido a su vez mediante el procedimiento general para la síntesis de BODIPY anteriormente citado, utilizando dimetilpirrol y el ácido 4-formilfenilborónico. Así, se hizo reaccionar ácido 4-formilfenilborónico con el pirrol correspondiente en THF seco. Pasados

30 minutos se añadió TFA y DDQ. Tras dejar reaccionar esta mezcla se añadió $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ y trietilamina y se dejó reaccionar hasta obtener el compuesto **65**, con un rendimiento del 20 %.



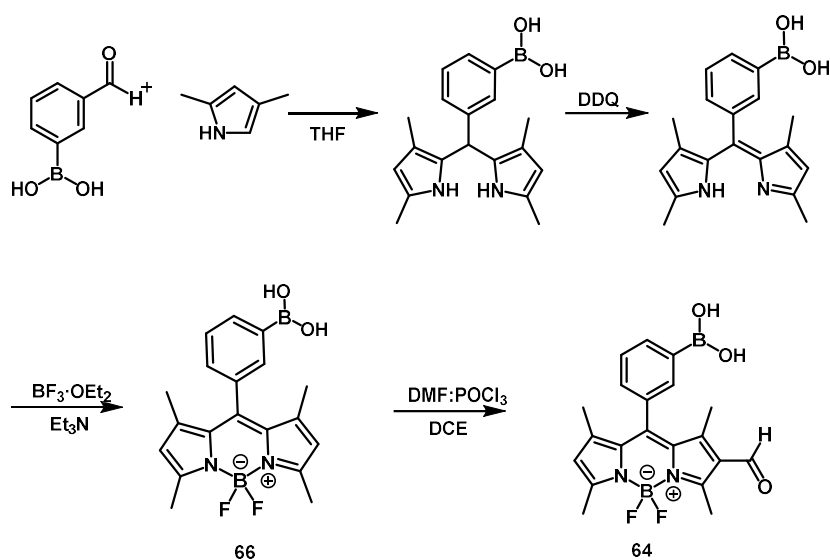
Esquema 73: Síntesis del compuesto 65.

Una vez obtenido el compuesto **65**, se procedió a la oxidación selectiva de la posición 2 mediante una acilación de Vilsmeier-Haack haciendo reaccionar **65** con una mezcla 1:1 DMF: POCl_3 . El compuesto **63** se obtuvo con un rendimiento del 20 % (Esquema 74).



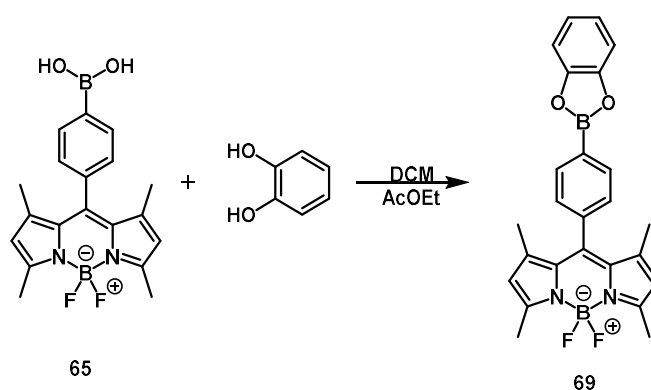
Esquema 74: Síntesis de 63.

Para sintetizar el compuesto **64** se llevó a cabo exactamente la misma ruta sintética, únicamente variando el ácido fenilborónico de partida (3-formilbencenoborónico), obteniéndose el BODIPY correspondiente con un rendimiento del 25 %.



Esquema 75: Síntesis del compuesto 64.

Así pues, se estudió la reacción entre el compuesto **65** y catecol, en una mezcla de DCM y AcOEt, obteniéndose el éster borónico **69** con un 26 % de rendimiento (Esquema **76**).



Dado el esfuerzo sintético descrito en este capítulo con pocos resultados, nos pareció adecuado realizar un estudio, mediante espectroscopía de emisión de fluorescencia, de la capacidad de los compuestos **63** y **64**, para actuar como quimiosímetros fluorescentes en la detección de dopamina y catecol.

6.3.7 Estudios de fluorescencia de los BODIPYs **63** y **64** en presencia de dopamina y otros dioles y aminas.

Se registraron los espectros de fluorescencia de los compuestos **63** ($\lambda_{\text{exc}}=486$ nm) y **64** ($\lambda_{\text{exc}}=490$ nm) en MeOH (10^{-5} M), que mostraron una banda de emisión de fluorescencia próxima a $\lambda=510$ nm en ambos casos y se estudiaron los cambios observados tras la adición de un exceso de distintos compuestos: dopamina, catecol, etilenglicol, bencilamina y anilina (Figura 53). Los resultados se muestran en la Gráfica 19, donde los sensores se encuentran disueltos en concentración en un rango de 10^{-5} M en MeOH.

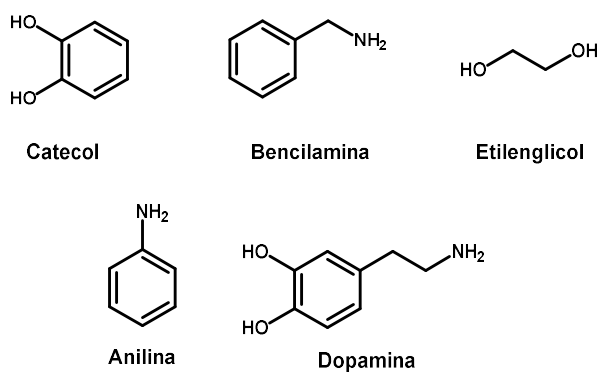
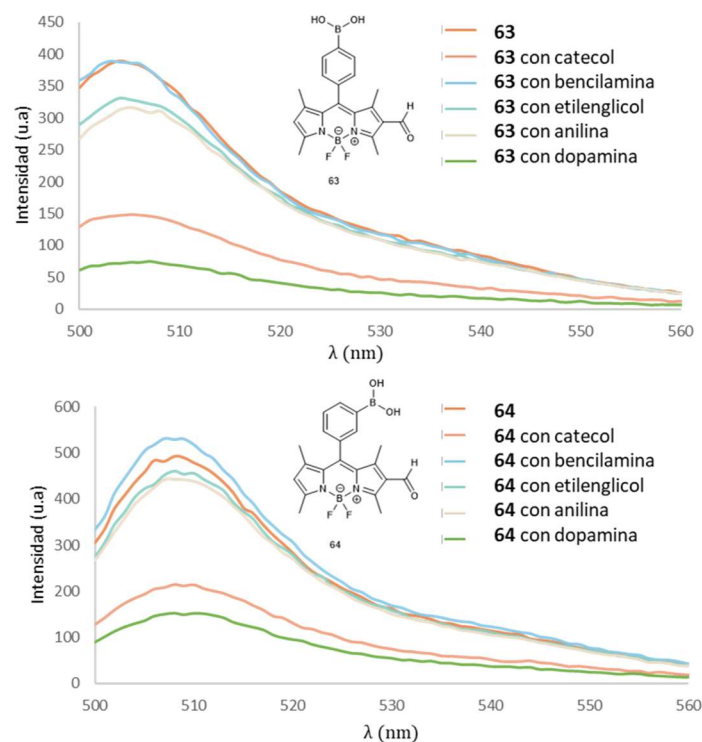


Figura 53: Analitos para ensayos de fluorescencia.



Gráfica 19: (Arriba) estudio de fluorescencia de **63** (10⁻⁵ M en MeOH) (λ_{exc}=486 nm) con dopamina y posibles interferentes (10⁻³ M). (Abajo) estudio de fluorescencia de **64** (10⁻⁵ M en MeOH) con distintos neurotransmisores (λ_{exc}=490 nm).

Observando las gráficas de fluorescencia (Gráfica 19) se puede apreciar la destacada disminución de la intensidad de fluorescencia de los correspondientes BODIPYs en presencia de catecol y dopamina. Este cambio indica que se está produciendo una interacción del grupo catecol de los sustratos con el ácido borónico de los compuestos **63** y **64**. Por su parte, las aminas (anilina o bencilamina) producen muy pocos cambios en la fluorescencia, lo que nos indica una baja interacción con el grupo aldehído.

Por ello y a falta de más tiempo se determinó que los compuestos **63** y **64** son importantes candidatos para llevar a cabo futuros estudios de detección de catecolaminas. Ha quedado claro que los ácidos borónicos son buenas unidades de reconocimiento para catecoles y debemos encontrar una forma más adecuada para la detección del grupo amina y generar así el sistema ditópico que necesitamos para la detección selectiva de estas aminas biógenas.

6.4 Conclusiones

En este capítulo se ha abordado el diseño de un dosímetro para la detección fluorescente de catecolaminas empleando las propiedades fluorescentes de los BODIPYs. Para ello, se han abordado diversas estrategias y se han sintetizado y caracterizado diversos BODIPYs.

Se han intentado reacciones de Knoevenagel, que a pesar de estar descritas en la bibliografía como método habitual de obtención de BODIPYs en posiciones 3 y 5, no han dado lugar a los productos deseados en este trabajo, probablemente debido a que la reacción es muy sensible a los efectos electrónicos de la molécula.

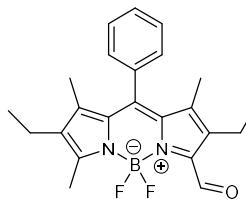
Se han diseñado concretamente las sondas **63** y **64** que han demostrado tener propiedades óptimas para la detección de las catecolaminas ya que presentan cambios de fluorescencia en presencia de dopamina y catecol, debido a la interacción entre el grupo 1,2-dihidroxibenceno y el ácido borónico de la sonda.

Para futuras investigaciones se deben realizar los experimentos pertinentes para evaluar el límite de detección del dosímetro con cada una de estas catecolaminas. Además, se deben evaluar los BODIPYs precursores que no poseen el grupo fenilborónico pero sí el aldehído, como posibles sondas.

6.5 Procedimiento experimental

Síntesis del compuesto 35

En un matraz fondo redondo de 3 bocas sumergido en baño de hielo (0°C) provisto de agitador magnético y bajo atmósfera de argón se añadió 3-etil-2,4-dimetilpirrol (2 mL, 14.8 mmol), benzaldehído (717 µL, 7.06 mmol), TFA (27 µL, 0.35 mmol) y 150 mL de DCM seco. Se dejó reaccionar 60 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se añadió DDQ (1.6 g, 7.06 mmol) y se continuó con la agitación. Pasados 60 min se añadieron 16 mL de trietilamina y 30 min después 16 mL de BF₃·OEt₂. La mezcla se dejó reaccionar 4 horas y se paró la reacción evaporando el disolvente.



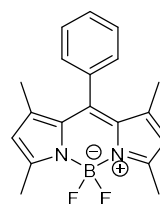
El crudo de reacción se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice, usando como eluyente una mezcla de hexano: AcOEt 9:1 obteniendo así 364.5 g (13.6 %) del compuesto **35**

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) 7.44 (m, 3H), 7.26 (m, 2H), 2.51 (s, 6H), 2.26 (q, J= 7,5 Hz, 4H), 1.25 (s, 6H), 0.96 (t, J= 7,5 Hz, 6H).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 156.17, 153.54, 140.20, 138.48, 132.71, 131.17, 129.64, 127.9, 115.62, 17.07, 14.62, 12.49, 11.85.

Síntesis del compuesto **34**

En un matraz fondo redondo de 3 bocas sumergido en baño de hielo (0 °C) se añade DDQ (553 mg, 2.436 mmol) en 6 mL de THF seco. Mediante un embudo de adición compensada se añadió gota a gota y con agitación una disolución de **35** (200 mg, 0.52 mmol) en una mezcla THF/H₂O 15:0.15 mL, y se dejó reaccionar bajo agitación durante 2 días.



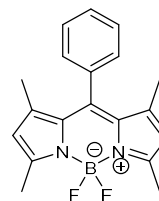
El crudo de reacción se extrajo con DCM y salmuera; la fase orgánica se secó con MgSO₄ anhidrido y posteriormente se eliminó el disolvente.

La purificación del producto se llevó a cabo mediante cromatografía de columna utilizando como fase estacionaria gel de sílice y como eluyente una mezcla de hexano:AcOEt 9:1 obteniendo 94.5 mg (48 % de rendimiento) del compuesto **34**.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 10,40 (s, 1H), 7,53 (m, 3H), 7,28 (m, 2H), 2,72 (q, J= 7,5 Hz, 4H), 2,66 (s, 3H), 2,34 (q, J=7,5 Hz, 3H), 1,36 (s, 4H), 1,27 (t, J= 7,5 Hz, 3H), 1,27 (s, 3H) 1,03 (t, 6H).

Síntesis del compuesto 38

En un matraz de fondo redondo de 3 bocas de 250 mL, se añadieron ácido benzaldehído (353 mg, 3.33 mmol), 30 mL de THF seco y 2,4-dimetil-1H-pirrol (633 mg, 7 mmol) bajo atmosfera de argón. La mezcla se agita, y se añaden 8 gotas de TFA. La disolución inicialmente presenta color amarillo y se va oscureciendo hacia un color marrón. Se dejó reaccionar a temperatura ambiente.



Siguiendo la reacción por cromatografía de capa fina, una vez que se ha consumido el aldehído, unos 30 minutos, se añade DDQ (756 mg, 3.33 mmol). La disolución pasa a color granate. Se dejó reaccionando un día, con agitación y bajo atmosfera inerte.

Una vez transcurrido el tiempo de reacción, se añadió diisopropiletilamina (4 mL, 23 mmol) (la disolución se volvió amarilla) y $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (6 mL, 47 mmol), pasando a un color morado y se dejó reaccionar 6 horas más.

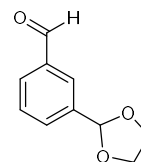
La mezcla de reacción se extrajo 3 veces con 100 mL de agua y otras 3 veces con 100 mL de salmuera. La fase orgánica se secó sobre MgSO_4 anhidrido y se filtró a gravedad, obteniendo el crudo de reacción. Este crudo se purificó mediante cromatografía de columna utilizando como fase estacionaria sílica gel y como eluyente una mezcla de hexano: AcOEt 1:3. Obtenemos 251.7 mg del compuesto **38** (20.1 % de rendimiento).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 7,48 (m, 3H), 7,26 (m, 2H), 5,98 (m, 2H), 2,56 (s, 6H), 1,37 (s, 6H).

HRMS(EI): m/z(%) la masa calculada para $C_{19}H_{21}B_2F_2N_2O_2$ es 369.1747 g/mol y la masa $[M+Na]^+$ obtenida es 369.1743.

Síntesis del compuesto 39

En un matraz de fondo redondo de 50 mL de 3 bocas provisto de agitación magnética se disolvió isoftaldehído (268 mg, 2.00 mmol), una punta de espátula de ácido p-toluensulfónico y etilenglicol (111 μ L, 2.00 mmol) en 15 mL de tolueno seco. Se calentó a reflujo durante 4 horas con montaje destilación Dean-Star.



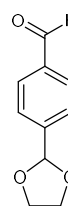
Se extrajo el crudo con 20 mL de DCM y 10 mL x 3 H_2O pH (8-10). La fase orgánica se secó con $MgSO_4$ anhidrido y posteriormente se eliminó el disolvente a vacío.

La purificación del producto se llevó a cabo mediante cromatografía de columna utilizando como fase estacionaria sílica gel y como eluyente una mezcla de DCM: Hexano 9:1 obteniendo 97.8 mg del compuesto **39** (27 % de rendimiento).

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 10,04 (s, 1H), 8,01 (t, 1H), 7,88 (d, 1H), 7,56 (t, 1H), 5,88 (s, 1H), 4,15 (m, 4H).

Síntesis del compuesto 40

En un matraz de fondo redondo de 50 mL y de 3 bocas provisto de agitación magnética y bajo atmosfera de argón se disolvió tereftaldehído (1 g, 7.46 mmol) en 20 mL de tolueno seco, a continuación, se añadió etilenglicol (0.45 mL, 8.26 mmol) y una cantidad catalítica de ácido p-toluensulfónico. La mezcla de reacción se calentó durante 3 horas a 130 °C.

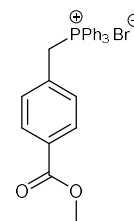


La purificación del producto se llevó a cabo mediante cromatografía de columna utilizando como fase estacionaria sílica gel y como eluyente una mezcla de DCM: hexano 8:2 obteniéndose 0.17 g del producto **40** (13 % de rendimiento).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 10.04 (s, 1H), 7.90 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 7.65 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 5.88 (s, 1H), 4.15 (m, 4H).

Síntesis del compuesto 43

En un matraz de fondo redondo (50 mL) de 3 bocas provisto de agitación se introducen tereftaldehído (900 mg, 8.81 mmol), borohidruro de sodio (77 mg, 2.04 mmol); la reacción se mantiene bajo atmósfera de argón y a 0°C y se añaden 6.75 mL de THF seco y 4.50 mL de etanol. Se dejó bajo agitación durante toda la noche. Se acidifica hasta pH= 6 con HCl 2 M.



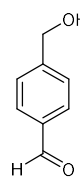
Se extrajo el producto con 30 mL de AcOEt y (10 mL x 3) de salmuera, se secó con MgSO_4 anhidrido y se eliminó el disolvente.

La purificación del producto llevó se a cabo mediante cromatografía de columna utilizando como fase estacionaria sílica gel y como eluyente una mezcla de hexano:AcOEt 6:4 obteniéndose 516 mg del producto **43** (43 % de rendimiento).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 10,14 (s, 1H), 7,87 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 7,56 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 4,82 (s, 2H).

Síntesis del compuesto **47**

En un matraz de fondo redondo de 50 mL y 2 bocas provisto de agitación magnética se disolvió 4-(bromometil)benzoato de metilo (500 mg, 2.18 mmol) y trifenilfosfina (573 mg, 2.18 mmol) en 10 mL de acetona, bajo atmósfera de argón. Se calentó la mezcla a reflujo durante 1 hora y media.

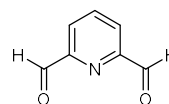


Se observó un precipitado blanco insoluble en acetona, se filtró y se le eliminó el disolvente a vacío. No fue necesaria la purificación adicional del producto obteniéndose 483 mg (54 % de rendimiento) del producto **47**.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7.76 (m, 9H), 7.63 (m, 4H), 5.68 (d, 2H), 3.87 (s, 3H).

Síntesis del compuesto 50

En un matraz de fondo redondo de 50 mL y 3 bocas provisto de agitación magnética y a 0°C se disolvió dicloruro de piridina-2,6-dicarbonilo (5 g, 24.5 mmol) en 15 mL de DCM, bajo atmósfera de argón. En un embudo de adición, se adiciona una disolución de pirrolidina (9.16 mL, 109.67 mmol) en 25 mL de DCM y se adiciona gota a gota. Una vez se ha adicionado todo el contenido del embudo se dejó reaccionar durante 2 horas.

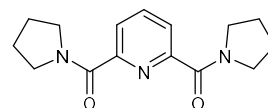


Se añadió a la reacción, gota a gota, 10 mL de HCl, se extrajo el producto con 30 mL de DCM y (10 mL x 3) de HCl 2 M, se secó con MgSO₄ anhidrido y se eliminó el disolvente a vacío. Se obtuvieron 5.51 g (82%) de producto puro que se identifica como **50**.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7,87 (m, 3H), 3,69 (m, 8H), 1,91 (m, 8H).

Síntesis del compuesto 51

En un matraz de fondo redondo de 100 mL de tres bocas provisto de agitación magnética y a 0°C se añade producto **50** (5.51 g, 20.15 mmol), bajo atmósfera de argón, y se introduce 37 mL de THF seco. Mediante un embudo de adición compensada se añaden gota a gota LiAlH₄ (569.30 mg, 15 mmol) disueltos en 50 mL de THF seco. Una vez completada la adición se dejó reaccionar durante 40 minutos.

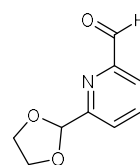


Se añade a la reacción gota a gota 10 mL de HCl, se extrae el producto con 30 mL de DCM y (10 mL x 3) de HCl 2 M, se secó con MgSO₄ anhidrido y se eliminó el disolvente. Se obtuvieron 0.46 g de **51** puro (17 % de rendimiento).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 10.16 (s, 2H), 8.19 (d, J= 8,6 Hz, 2H), 8.10 (q, J= 8,6 Hz, 1H).

Síntesis del compuesto 52

En un matraz de fondo redondo de 50 mL y tres bocas provisto de agitación magnética se disolvió de **51** (255 mg, 1.88 mmol), ácido p-toluensulfónico (17.04 mg, 0.0895 mmol) y etilenglicol (0.05 mL, 0.88 mmol) en 15 mL de tolueno seco, bajo atmósfera de argón. Se calienta a reflujo con un montaje Dean-Stark durante 15 minutos.



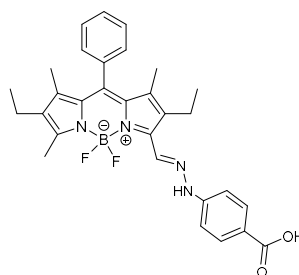
Se filtró el crudo de reacción y la fase acuosa se extrae con 20 mL de AcOEt y 10 mL de agua, se secó la fase orgánica con MgSO₄ anhidrido y se eliminó el disolvente a vacío.

La purificación del producto se llevó a cabo mediante cromatografía de columna utilizando como fase estacionaria sílica gel y como eluyente una mezcla de hexano:AcOEt 4:6, obteniéndose 35.6 mg del producto **52** (11 % de rendimiento).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 10.11 (s, 1H), 7.95 (m, 2H), 7.79 (dd, 1H), 5.94 (s, 1H), 4.12 (m, 4H).

Síntesis del compuesto 54

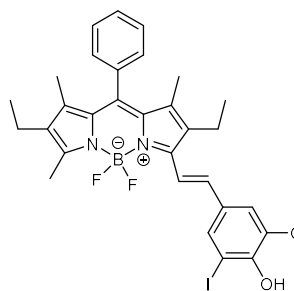
En un balón de 2 bocas de 25 mL provisto de agitación magnética, sistema de reflujo y bajo atmósfera de argón, se añaden del compuesto **34** (20 mg, 0.0507 mmol) y ácido 4-hidrazinobenzoico (8 mg, 0.0526mmol). A continuación, se añaden 10 mL de EtOH y se dejó reaccionar a 85°C durante toda la noche. Posteriormente se eliminó el disolvente a vacío. La purificación del producto se llevó a cabo mediante cromatografía de columna utilizando como fase estacionaria sílica gel y como eluyentes Hex:AcOEt 8:2, dando lugar a 20 mg de **54** (75 % de rendimiento).



$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, Cloroformo-d) δ 8.36(s,1H), 8.27 (s,1H), 8.02 (d, J=8.8Hz, 2H), 7.55-7.46 (m, 3H), 7.31 (dd, J=6.5, 3.0Hz, 2H), 7.08 (d, J=8.8Hz, 2H), 2.8 (c, J=7.4Hz, 2H), 2.57 (s, 3H), 2.32 (c, J=7.6 Hz, 2H), 1.33 (s,3H), 1.26 (s, 3H), 1.16 (m, 3H), 1.00 (t, J=7.6Hz, 3H)

Síntesis del compuesto 58

En un matraz de fondo redondo de 250 mL provisto de un sistema de reflujo, agitación magnética y bajo atmósfera de argón, se añadió *p*-Anisaldehído (2.68 mL, 22.06 mmol)) y 10 mL de DCM. Posteriormente y mediante un embudo de

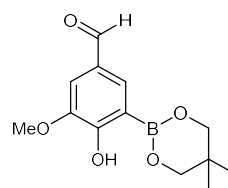


adición compensada se añade gota a gota una disolución de Br₂ (12.5 mL, 25.03 mmol) en 20 mL de DCM. Se dejó a 50°C durante 12 h. Al finalizar la reacción, se le añadió al crudo una disolución acuosa de NaHSO₃ y se extrajo con DCM y se secó la fase orgánica con MgSO₄ anhidrido. Para terminar, se evaporó el disolvente y se purificó el producto mediante cromatografía de columna utilizando como fase estacionaria sílica gel y como eluyente una mezcla de hexano: AcOEt 9:1. Se obtuvieron 1.93 g del compuesto **58** (41% de rendimiento). También se obtuvo un 16% del compuesto dibromado **59**.

¹H-NMR (300 MHz, Cloroformo-d) δ 9.84 (s, 1H), 8.08 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.82 (dd, J = 8.5, 2.0 Hz, 1H), 7.01 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 3.99 (s, 3H).

Síntesis del compuesto 60

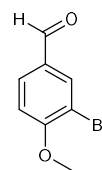
En un balón de 100 mL de 3 bocas acoplado a un colector Dean-Stark, un sistema de reflujo y bajo atmósfera de argón se añadió el compuesto **35** (90 mg, 0.236mmol) y 5-iodovainillina (2.57 mg, 0.205mmol). Se añadieron 45 mL de tolueno, piperidina (0.4 mL, 4.05mmol) y ácido acético glacial (0.1 mL, 1.021 mmol) y se dejó reaccionar a 150°C durante 4 horas. El crudo de reacción se extrae con 30 mL de DCM y 10 mL de salmuera, la fase orgánica se secó con MgSO₄ anhidrido y posteriormente se eliminó el disolvente a vacío. La purificación del producto se llevó a cabo mediante cromatografía de columna utilizando como fase estacionaria sílica gel y como eluyente una mezcla de hexano: AcOEt 6:4. Se obtienen 10 mg del compuesto **60** (7,6%).



¹H-NMR (300 MHz, Cloroformo-d) δ 7.50 – 7.47 (m, 3H), 7.30 (m, 2H), 7.17 (m, 1H), 7.10 (dd, J = 6.3, 1.7 Hz, 2H), 6.92 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 5.75 (s, 1H), 3.99 (s, 3H), 2.64 – 2.54 (m, 5H), 2.32 (q, J = 7.6 Hz, 2H), 1.31 (s, 3H), 1.29 (s, 3H), 1.15 (t, J = 7.5 Hz, 3H), 0.99 (t, J = 7.6 Hz, 3H).

Síntesis del compuesto 61

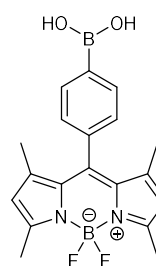
En balón de fondo redondo de 2 bocas y bajo atmósfera de argón, se añadió 5-Iodovainillina (139 mg, 0.5 mmol), diboro glicolato de neopentilo (135 mg, 0.6 mmol), acetato potásico (147 mg, 1.5mmol) y PdCl₂ (11 mg, 0.015 mmol). Se añaden 30 mL de DMSO y se vuelve a gasificar con argón el matraz de reacción. La reacción se calienta a 80°C durante 16 horas. El crudo de reacción una vez a temperatura ambiente se vertió sobre agua helada (100 mL) y se extrajo con 30 mL de DCM por triplicado. A continuación, se secó el disolvente y se purificó el producto mediante cromatografía de columna utilizando como fase estacionaria gel de sílice y como eluyente una mezcla de éter etílico:DCM 1:1. Se obtuvieron 5 mg del compuesto **61** (3.8 % rendimiento).



¹H-NMR (300 MHz, MeOH-d₄) δ 9.74 (s, 1H), 7.69 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 7.37 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 5.32 (s, 1H), 3.91 (s, 3H), 3.81 (dd, J = 6.3, 3.8 Hz, 4H), 1.32 – 1.27 (m, 6H).

Síntesis del compuesto 65

En un matraz de 3 bocas de 250 ml, se añaden ácido 4-formilbencenoboronico (500 mg, 3.33 mmol), 30 ml de THF seco y 2,4-dimetil-1H-pirrol (633 mg, 7 mmol) bajo atmosfera de argón. La mezcla se agita, y se añaden 8 gotas de TFA. La disolución inicialmente presenta color amarillo y se va oscureciendo hacia un color marrón. Se dejó reaccionar a temperatura ambiente, siguiendo la reacción por cromatografía de capa fina. Una vez consumido el aldehído (unos 30 minutos), se añadió DDQ (756 mg, 3.33 mmol). La disolución pasó a color granate. Se dejó reaccionando un día, con agitación y bajo atmosfera de argón.



Una vez transcurrido el tiempo de reacción, se añadió diisopropiletilamina (4 mL, 23 mmol) (la disolución se volvió amarilla) y $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (6 ml, 47 mmol), pasando a un color morado y se dejó reaccionar 6 horas más.

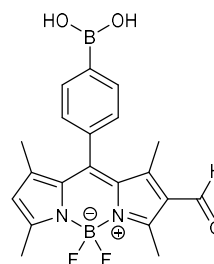
La mezcla de reacción se extrajo 3 veces con 100 mL de H_2O y otras 3 veces con 100 mL de salmuera. La fase orgánica se secó sobre MgSO_4 anhidrido y se filtró a gravedad, obteniendo el crudo de reacción. Este crudo se purificó mediante cromatografía de columna utilizando como fase estacionaria gel de sílice y como eluyente una mezcla de hexano: AcOEt 1:3. Se obtuvieron 251.7 mg del compuesto **65** (20.1 % de rendimiento).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 8.23 (s, 2H, -OH), 7.95 (s, 2H, -Ar), 7.32 (d, 2H, -Ar), 6.17 (d, 2H, Ar), 2.44 (d, $J = 4.8$ Hz, 6H, 2- CH_3), 1.32 (d, $J = 2.7$ Hz, 6H, 2- CH_3).

HRMS(EI): m/z calculada para $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{B}_2\text{F}_2\text{N}_2\text{O}_2 \cdot \text{Na}$ ($[\text{M} + \text{Na}]^+$) es 369,1747 g/mol y la masa obtenida fue 369,1743.

Síntesis del compuesto 63

Se disolvió el compuesto **65** (50 mg, 0.1385 mmol), 1,2-dicloroetano (13.4 mL, 0.1385 mmol) y se añaden a un matraz de 3 bocas que contiene de una mezcla 1:1 de POCl_3 y DMF (2.68 mL, 0.1385 mmol), bajo atmosfera inerte. Se dejó reaccionar 2 horas a 60°C .



Se dejó enfriar, primero a temperatura ambiente y luego en baño de hielo, para añadir 30 ml de NaHCO_3 1 M, dejándolo reaccionar 30 minutos bajo agitación.

Tras pasar el tiempo, la reacción se extrajo 3 veces con 100 mL de agua y otras 3 veces con 100 mL de salmuera. La fase orgánica se secó con MgSO_4 anhidrido y se filtró a gravedad, obteniendo el crudo de reacción. Este crudo se purificó mediante cromatografía de columna utilizando como fase estacionaria sílica gel y como eluyente una mezcla de hexano:AcOEt 7:3. Se obtuvieron 10.4 mg del compuesto **63** (19 % de rendimiento).

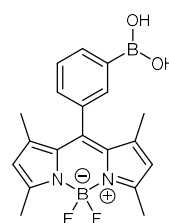
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 9.95 (s, 1H, -C=O), 8.28 (s, 2H, -OH), 7.99 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, -Ar), 7.39 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, -Ar), 6.45 (s, 1H, -Ar), 2.55 (s, 3H, -CH₃), 2.48 (s, 3H, -CH₃), 1.8 (s, 3H, -CH₃), 1.19 (s, 3H, -CH₃).

HRMS(EI): m/z calculada para $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{B}_2\text{F}_2\text{N}_2\text{O}_3 \cdot \text{Na}$ ($[\text{M} + \text{Na}]^+$) es 397,1706 g/mol y la masa obtenida es 397,1704.

UV-Vis (MeOH), $\lambda_{\text{max}}=490$ nm; emisión (MeOH) $\lambda_{\text{max}}=515$ nm ($\lambda_{\text{exc}}=490$ nm)

Síntesis del compuesto 66

En un matraz de 3 bocas de 250 mL se añade ácido 3-formilbencenoborónico (505 mg, 3.37 mmol), 30 ml de THF seco y 2,4-dimetil-1H-pirrol (633 mg, 7 mmol). A la mezcla, con agitación y bajo atmósfera



inerte, se añadieron 8 gotas de TFA. La disolución inicialmente es color amarillo claro y se va oscureciendo hacia un color granate. Se dejó reaccionando a temperatura ambiente, hasta que se consume el aldehído, siguiendo la reacción por cromatografía de capa fina, durante 30 minutos.

Una vez consumido el aldehído se añadió DDQ (756 mg, 3.33 mmol). La disolución sigue de color granate. Se dejó reaccionando un día con agitación y bajo atmósfera inerte.

Al transcurrir el tiempo de reacción, se añadió diisopropiletilamina (4 mL, 23 mmol), la disolución se vuelve amarilla,

y entonces se adicionan $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (6 ml, 47 mmol) la disolución pasa a un color morado. Se dejó reaccionar 6 horas.

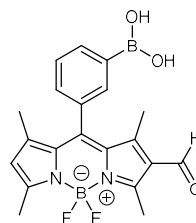
Finalizado este tiempo, la disolución se extrajo 3 veces con 100 mL de agua y otras 3 veces con 100 mL de salmuera, la fase orgánica se secó sobre MgSO_4 anhidrido y se filtró a gravedad, obteniendo el crudo de reacción. Este crudo se purificó mediante cromatografía de columna utilizando como fase estacionaria gel de sílice y como eluyente una mezcla de hexano:AcOEt 1:3. Se obtuvieron 341.9 mg del compuesto **66** (Rendimiento del 28 %)

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO-d_6) δ 8.23 (s, 2H), 7.96 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.33 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 6.17 (s, 2H), 2.45 (s, 6H), 1.33 (s, 2H).

HRMS(EI): m/z calculada para $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{B}_2\text{F}_2\text{N}_2\text{O}_2 \cdot \text{Na}$ ($[\text{M} + \text{Na}]^+$) es 369.1757 g/mol y la masa obtenida es 369.1743 g/mol.

Síntesis del compuesto 64

Se disolvió el compuesto **66** (341.9 mg, 0.9286 mmol), en 1,2-dicloroetano (89.9 mL, 0.9286 mmol) y se añadió a un matraz de 3 bocas de 250 mL, bajo atmosfera de argón, que contiene una mezcla de 1:1 de POCl_3 y DMF (18 mL, 0.9286 mmol). Se dejó reaccionar 2 horas a 60°C .



Se dejó enfriar primero a temperatura ambiente y después en baño de hielo antes de añadir 300 mL de NaHCO₃, dejando reaccionar la mezcla 30 minutos.

Tras pasar el tiempo la reacción se extrajo 3 veces con 100 mL de agua y otras 3 veces con 100 mL de salmuera. La fase orgánica se secó con MgSO₄ anhidrido y se filtró a gravedad, obteniendo el crudo de reacción. Este crudo se purificó mediante cromatografía de columna utilizando como fase estacionaria gel de sílice y como eluyente una mezcla de hexano:AcOEt 7:3. Se obtuvieron 91.9 mg del compuesto **64** (25 % de rendimiento).

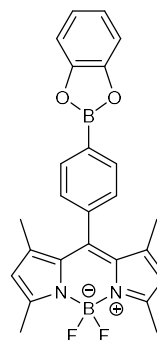
¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.95 (s, 1H), 8.28 (s, 2H), 7.99 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.39 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 6.44 (s, 1H), 2.71 (s, 3H), 2.55 (s, 3H), 1.59 (s, 3H), 1.38 (s, 3H).

HRMS(EI): *m/z* calculada para C₂₀H₂₁B₂F₂N₂O₃ Na ([M+ Na]⁺) es 397.1706 g/mol y la masa obtenida es 397.1704 g/mol.

UV-Vis (MeOH), λ_{max}=490 nm; emisión (MeOH) λ_{max}=515 nm (λ_{exc}=490 nm)

Síntesis del compuesto 68

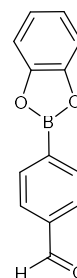
Se disolvió ácido 4-formil borónico (50.2 mg, 0.3 mmol) y catecol (52.5 mg, 0.45 mmol) en 45 mL de DCM y 5 mL de AcOEt y se dejó reaccionar a temperatura ambiente 24 horas, con agitación. No se observó un precipitado por lo que se evaporó el disolvente en rotavapor y se obtuvieron 50.9 mg de compuesto **68** con un rendimiento del 75.72 %.



$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 9.97 (s, 1H), 7.78 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 7.66 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H), 6.72 (dd, $J = 5.9, 3.5$ Hz, 2H), 6.66 – 6.56 (m, 2H).

Síntesis del compuesto 69

En un balón de 250 mL, se disolvió **63** (17.3 mg, 0.047 mmol) y catecol (7.7 mg, 0.07 mmol) en 0,4 mL de DCM y 5 mL de AcOEt. Se dejó reaccionar 6 horas con agitación a temperatura ambiente. Tras este tiempo, la mezcla se concentró en el rotavapor y se purificó mediante cromatografía de columna utilizando como fase estacionaria gel de sílice y como eluyente una mezcla de hexano:AcOEt 7:3. Se obtuvieron 5.7 mg del compuesto **69** (26.5 % de rendimiento).



$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 7.60 (s, 2H), 7.19 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 6.79 – 6.68 (m, 2H), 6.61 (dd, $J = 6.9, 5.7$ Hz, 2H), 6.16 (s, 2H), 2.44 (s, 6H), 1.35 (s, 6H)

7. Bibliografía

1. Pedersen, C. J. The Discovery of Crown Ethers (Nobel Lecture). *Angew. Chemie Int. Ed. Engl.* **27**, 1021–1027 (1988).
2. Cram, D. J. The Design of Molecular Hosts, Guests, and their Complexes. *Angew. Chemie Int. Ed. Engl.* **21**, 155–173 (1982).
3. Lehn, J. Supramolecular Chemistry- Scope and Perspectives Molecules, Supermolecules, and Molecular Devices. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **27**, 89–112 (1988).
4. J.M. Lehn. Supramolecular Chemistry. Concepts and Perspectives. *Angew. Chemie Int. Ed.* **107**, 2617 (1995).
5. Rogers, C. W. & Wolf, M. O. Luminescent molecular sensors based on analyte coordination to transition-metal complexes. *Coord. Chem. Rev.* **233–234**, 341–350 (2002).
6. Martínez-Máñez, R. & Sancenón, F. Fluorogenic and chromogenic chemosensors and reagents for anions. *Chem. Rev.* **103**, 4419–4476 (2003).
7. Moragues, M. E., Martínez-Máñez, R. & Sancenón, F. Chromogenic and fluorogenic chemosensors and reagents for anions. A comprehensive review of the year 2009. *Chem. Soc. Rev.* **40**, 2593–2643 (2011).
8. Wu, J. *et al.* Chromogenic/Fluorogenic Ensemble Chemosensing Systems. *Chem. Rev.* **115**, 7893–7943 (2015).
9. Lavigne, J. J. & Anslyn, E. V. Sensing a paradigm shift in the field of molecular recognition: From selective to differential receptors. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **40**, 3118–3130 (2001).

10. Gunnlaugsson, T. *et al.* Fluorescent Photoinduced Electron Transfer (PET) sensors for anions; From design to potential application. *J. Fluoresc.* **15**, 287–299 (2005).
11. Gunnlaugsson, T., Glynn, M., Tocci (née Hussey), G. M., Kruger, P. E. & Pfeffer, F. M. Anion recognition and sensing in organic and aqueous media using luminescent and colorimetric sensors. *Coord. Chem. Rev.* **250**, 3094–3117 (2006).
12. Amendola, V., Esteban-Gómez, D., Fabbrizzi, L. & Licchelli, M. What anions do to N-H-containing receptors. *Acc. Chem. Res.* **39**, 343–353 (2006).
13. Wiskur, S. L., Ait-Haddou, H., Lavigne, J. J. & Anslyn, E. V. Teaching old indicators new tricks. *Acc. Chem. Res.* **34**, 963–972 (2001).
14. Nguyen, B. T. & Anslyn, E. V. Indicator-displacement assays. *Coord. Chem. Rev.* **250**, 3118–3127 (2006).
15. Quang, D. T. & Kim, J. S. Fluoro- and chromogenic chemodosimeters for heavy metal ion detection in solution and biospecimens. *Chem. Rev.* **110**, 6280–6301 (2010).
16. Xu, Z., Chen, X., Kim, H. N. & Yoon, J. Sensors for the optical detection of cyanide ion. *Chem. Soc. Rev.* **39**, 127–137 (2010).
17. Barba-Bon, A. *et al.* A new selective fluorogenic probe for trivalent cations. *Chem. Commun.* **48**, 3000–3002 (2012).
18. Gale, P. A., Twyman, L. J., Handlin, C. I. & Sessler, J. L. A colourimetric calix[4]pyrrole-4-nitrophenolate based anion sensor. *Chem. Commun.* **2**, 1851–1852 (1999).
19. Juárez, L. A. *et al.* A new chromo-fluorogenic probe based on

- BODIPY for NO₂ detection in air. *Chem. Commun.* **51**, 1725–1727 (2015).
20. Engel, T. & Reid, P. *Química Física - Thomas Engel*. (2006).
 21. Robert M Christie. *Synthesis, Properties and Applications of Organic Dyes and Pigments*. 3rd revised edition. (2003).
 22. Snowden, T. S. & Anslyn, E. V. Anion recognition : synthetic receptors for anions and their application in sensors. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **3**, 740–746 (1999).
 23. Jun, M. E., Roy, B. & Ahn, K. H. ““Turn-on”” fluorescent sensing with ““reactive”” probes. *Chem. Commun.* **47**, 7583–7601 (2011).
 24. Faugeras, P. A. *et al.* When cyclodextrins meet click chemistry. *European J. Org. Chem.* 4087–4105 (2012).
 25. Kobayashi, H., Ogawa, M., Alford, R., Choyke, P. L. & Urano, Y. New Strategies for Fluorescent Probe Design in Medical Diagnostic Imaging. *Chem. Rev.* **110**, 2620–2640 (2010).
 26. Silva, A. P. De *et al.* Signaling Recognition Events with Fluorescent Sensors and Switches. *Chem. Rev.* **97**, 1515–1566 (1997).
 27. Ji, H., Brown, G. M. & Dabestani, R. Calix [4] arene-based Cs + selective optical sensor. *Chem. Commun.* **7**, 609–610 (2008).
 28. Narita, M., Higuchi, Y., Hamada, F. & Kumagai, H. Metal sensor of water soluble dansyl-modified thiacalix[4]arenes. *Tetrahedron Lett.* **39**, 8687–8690 (1998).
 29. Métivier, R. *et al.* A highly sensitive and selective fluorescent molecular sensor for Pb (II) based on a calix [4] arene bearing four dansyl groups A new fluorescent molecular sensor based

- on a calix [4] arene acetonitrile – water for lead and the changes of emission. *Chem. Commun.* **1**, 996–997 (2003).
30. Costero, A. M., Colera, M., Gaviña, P. & Gil, S. Fluorescent sensing of maleate versus fumarate by a neutral cyclohexane based thiourea receptor. *Chem. Commun.* **1**, 761–763 (2006).
 31. McKervery, M. A., Seward, E. M., Ferguson, G., Ruhl, B. & Harris, S. J. Synthesis, x-ray crystal structures, and cation transfer properties of alkyl calixaryl acetates, a new series of molecular receptors. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **7**, 388–390 (1985).
 32. Cao, D., Zhu, L., Liu, Z. & Lin, W. Through bond energy transfer (TBET)-based fluorescent chemosensors. *J. Photochem. Photobiol. C Photochem. Rev.* **44**, 1–73 (2020).
 33. Meyer, R. *Explosives*. (1977).
 34. Dubnikova, F. *et al.* Decomposition of triacetone triperoxide is an entropic explosion. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 1146–1159 (2005).
 35. Matyáš, R., Pachman, J. & Ang, H. G. Study of TATP: Spontaneous transformation of TATP to DADP - Full paper. *Propellants, Explos. Pyrotech.* **34**, 484–488 (2009).
 36. Matyáš, R., Šelešovský, J. & Musil, T. Decreasing the friction sensitivity of TATP, DADP and HMTD. *Cent. Eur. J. Energ. Mater.* **10**, 263–275 (2013).
 37. Hengwei Lin, K. S. S. Colorimetric sensor array for Detection of Triacetone Triperoxide TATP vapor. *Hengwei Lin Kenneth S. Suslick* **132**, 15519–15521 (2010).
 38. Ryter, S. W. & Otterbein, L. E. Carbon monoxide in biology and

- medicine. *BioEssays* **26**, 270–280 (2004).
39. Abeyrathna, N., Washington, K., Bashur, C. & Liao, Y. Nonmetallic carbon monoxide releasing molecules (CORMs). *Org. Biomol. Chem.* **15**, 8692–8699 (2017).
 40. Raub, J. A. & Benignus, V. A. Carbon monoxide and the nervous system. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **26**, 925–940 (2002).
 41. Bauer, C. *et al.* A Mid-infrared QEPAS sensor device for TATP detection. *J. Phys. Conf. Ser.* **157**, 012002 (2009).
 42. Black, C., D’Souza, T., Smith, J. C. & Hearn, N. G. R. Identification of post-blast explosive residues using direct-analysis-in-real-time and mass spectrometry (DART-MS). *Forensic Chem.* **16**, 100185 (2019).
 43. Widmer, L., Watson, S., Schlatter, K. & Crowson, A. Development of an LC/MS method for the trace analysis of triacetone triperoxide (TATP). *Analyst* **127**, 1627–1632 (2002).
 44. Blanco, S. *et al.* Microwave Detection of Wet Triacetone Triperoxide (TATP): Non-Covalent Forces and Water Dynamics. *Chem. - A Eur. J.* **27**, 1680–1687 (2021).
 45. Lubczyk, D., Grill, M., Baumgarten, M., Waldvogel, S. R. & Müllen, K. Scaffold-optimized dendrimers for the detection of the triacetone triperoxide explosive using quartz crystal microbalances. *Chempluschem* **77**, 102–105 (2012).
 46. Vahcic, M. *et al.* A Powdered Simulant of Triacetone Triperoxide. (2020).
 47. George, G. *et al.* Luminescence characteristics of rare-earth-doped barium hexafluorogermanate BaGeF₆ nanowires: fast subnanosecond decay time and high sensitivity in H₂O₂

- detection. *RSC Adv.* **8**, 39296–39306 (2018).
48. Zheng, P. *et al.* A simple organic multi-analyte fluorescent prober: One molecule realizes the detection to DNT, TATP and Sarin substitute gas. *J. Hazard. Mater.* **409**, 124500 (2021).
49. Hormozi Jangi, S. R., Akhond, M. & Absalan, G. A field-applicable colorimetric assay for notorious explosive triacetone triperoxide through nanozyme-catalyzed irreversible oxidation of 3, 3'-diaminobenzidine. *Microchim. Acta* **187**, 1–10 (2020).
50. Fan, S., Lai, J., Burn, P. L. & Shaw, P. E. Solid-State Fluorescence-based Sensing of TATP via Hydrogen Peroxide Detection. *ACS Sensors* **4**, 134–142 (2019).
51. To, K. C., Ben-Jaber, S. & Parkin, I. P. Recent Developments in the Field of Explosive Trace Detection. *ACS Nano* **14**, 10804–10833 (2022).
52. Calvo-Gredilla, P. *et al.* Solvent-Free Off–On Detection of the Improvised Explosive Triacetone Triperoxide (TATP) with Fluorogenic Materials. *Chem. - A Eur. J.* **23**, 13973–13979 (2017).
53. García-Calvo, J. *et al.* Surface functionalized silica nanoparticles for the off-on fluorogenic detection of an improvised explosive, TATP, in a vapour flow. *J. Mater. Chem. A* **6**, 4416–4423 (2018).
54. Climent, E. *et al.* Multiplexed Detection of Analytes on Single Test Strips with Antibody-Gated Indicator-Releasing Mesoporous Nanoparticles. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **59**, 23862–23869 (2020).

55. Cramer, F. (Springer-V. *Tomorrow's Chemistry Today Concepts in Nanoscience, Organic Materials and Environmental Chemistry*. (1954).
56. Hashimoto, H. Present Status of Industrial Application of Cyclodextrins in Japan. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **448**, 57–62 (2002).
57. Szejtli, J. Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry. *Chem. Rev.* **98**, 1743–1753 (1998).
58. Nazarov, V. B., Avakyan, V. G. & Alfimov, M. V. Photosensitized long-lived room-temperature phosphorescence of naphthalene-d8 as a result of T–T energy transfer inside the 4'-tert-butylacetophenone- naphthalene-d8@2 β -cyclodextrin inclusion complex. *J. Lumin.* **219**, 116909 (2020).
59. Ogoshi, T. & Harada, A. Chemical sensors based on cyclodextrin derivatives. *Sensors* **8**, 4961–4982 (2008).
60. Schneiderman, E. & Stalcup, A. M. Cyclodextrins: A versatile tool in separation science. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **745**, 83–102 (2000).
61. Willenbacher, J. *et al.* Reversible single-chain selective point folding via cyclodextrin driven host-guest chemistry in water. *Chem. Commun.* **50**, 7056–7059 (2014).
62. Carrazana, J., Jover, A., Meijide, F., Soto, V. H. & Tato, J. V. Complexation of adamantyl compounds by β -cyclodextrin and monoaminoderivatives. *J. Phys. Chem. B* **109**, 9719–9726 (2005).
63. Ali, T. A., Mohamed, G. G., El-Sonbati, A. Z., Diab, M. A. &

- Elkfass, A. M. A Potentiometric Sensor for Determination of Doxycycline Hydrochloride in Pharmaceutical Preparation and Biological Fluids. *Russ. J. Electrochem.* **54**, 1081–1095 (2018).
64. Akihiko Ueno, Shingo Minato, Twao Suzuki, Mitsuru Fukushima, Masahiro Ohkubo, Tetsuo Osa, Fumio Hamada, K. M. Host-guest sensory system Dansyl-modified B-cyclodextrin for detecting steroidal compounds by dansyl fluorescence. *Chem. Lett.* 605–608 (1990).
 65. Yong Wang, Tsukasa Ikeda, Hiroshi Ikeda, Akihiko Ueno, F. T. dansyl-b-cyclodextrins as fluorescent sensors responsive to organic compounds. *Bull Chem Soc Jpn* **67**, 1598–1607 (1994).
 66. Ying-Hsia Li, Ib Lai-Man Chan, Ic L. T. & Robert T. Moody, Chester M. Hirnel, Ic and D. M. H. Study of Solvent Effects on the Fluorescence of 1 -(Dimethylamino)-5-naphthalenesulfonic Acid and Related Compounds. *J. Am. Chem. Soc.* **97**, 3118–3126 (1975).
 67. Roberto Corradini, Arnaldo Dossena, Rosangela Marchelli, Anna Panagia, G. S. & Michele Saviano, Angela Lombardi, and V. P. A Modified Cyclodextrin with a Fully Encapsulated Dansyl Group : Self-Inclusion in the Solid State and in Solution. *Chem. Eur. J* **2**, 373–381 (1996).
 68. Ueno, A., Wang, Y., Ikeda, T. & Toda, F. Syntheses and Molecular Recognition Abilities of 6-O-, 2-O-, and 3-O-Dansyl- γ -Cyclodextrins. *Chem. Lett.* **21**, 863–866 (1992).
 69. Hamasaki, K. *et al.* Fluorescent sensors of molecular recognition. Modified cyclodextrins capable of exhibiting guest-responsive twisted intramolecular charge transfer

- fluorescence. *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 5035–5040 (1993).
70. Fumio Moriwaki, Hiromi Kaneko, Akihiko Ueno, T. O. Excimer Formation and Induced-Fit Type of Complexation of Bciclodextrin capped by two naphthyl moieties. *Bull Chem Soc Jpn* **60**, 3619–3623 (1987).
 71. Wagner, B. D., Fitzpatrick, S. J. & McManus, G. J. Fluorescence suppression of 7-methoxycoumarin upon inclusion into cyclodextrins. *J. Incl. Phenom.* **47**, 187–192 (2003).
 72. Dubnikova, F. *et al.* Decomposition of Triacetone Triperoxide Is an Entropic Explosion. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 1146–1159 (2005).
 73. Tripodo, G., Wischke, C., Neffe, A. T. & Lendlein, A. Efficient synthesis of pure monotosylated beta-cyclodextrin and its dimers. *Carbohydr. Res.* **381**, 59–63 (2013).
 74. Bonomo, R. P. *et al.* Conformational Features and Coordination Properties of Functionalized Cyclodextrins. Formation, Stability, and Structure of Proton and Copper(II) Complexes of Histamine-Bearing β -Cyclodextrin in Aqueous Solution. *Inorg. Chem.* **30**, 2708–2713 (1991).
 75. Corradini, R. *et al.* Fluorescent chemosensor for organic guests and copper(II) ion based on dansyldiethylenetriamine-modified β -cyclodextrin. *J. Org. Chem.* **62**, 6283–6289 (1997).
 76. Kolb, H. C., Finn, M. G. & Sharpless, K. B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **40**, 2004–2021 (2001).
 77. Royal, T. H. E., Academy, S. & Sciences, O. F. Scientific Background on the Nobel Prize in Chemistry 2022 Click

chemistry and bioorthogonal chemistry. The Nobel Committee for Chemistry. **50005**, (2022).

78. Huisgen, R. Centenary Lectures. *Proc. Chem. Soc.* 357–395 (1961).
79. Tang, W. & Ng, S. C. Facile synthesis of mono-6-amino-6-deoxy- α -, β -, γ -cyclodextrin hydrochlorides for molecular recognition, chiral separation and drug delivery. *Nat. Protoc.* **3**, 691–697 (2008).
80. Ikeda, H. *et al.* Fluorescent cyclodextrins for molecule sensing: Fluorescent properties, NMR characterization, and inclusion phenomena of N-dansylleucine-modified cyclodextrins. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 10980–10988 (1996).
81. Dulebohn, J. I., Haefner, S. C., Berglund, K. A. & Dunbar, K. R. Reversible Carbon Monoxide Addition to Sol-Gel Derived Composite Films Containing a Cationic Rhodium(I) Complex: Toward the Development of a New Class of Molecule-Based CO Sensors. *Chem. Mater* **3**, 506–508 (1992).
82. Zheng, K., Lin, W., Tan, L., Chen, H. & Cui, H. A unique carbazole-coumarin fused two-photon platform: Development of a robust two-photon fluorescent probe for imaging carbon monoxide in living tissues. *Chem. Sci.* **5**, 3439–3448 (2014).
83. Borges, F., Roleira, F., Milhazes, N., Santana, L. & Uriarte, E. Simple Coumarins and Analogues in Medicinal Chemistry: Occurrence, Synthesis and Biological Activity. *Curr. Med. Chem.* **12**, 887–916 (2005).
84. Matos, M. J. *et al.* New halogenated phenylcoumarins as tyrosinase inhibitors. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **21**, 3342–

3345 (2011).

85. Bayraktutan, T. & Onganer, Y. Spectral-luminescent study of coumarin 35 as fluorescent “light-up” probe for BSA and DNA monitoring. *Dye. Pigment.* **142**, 62–68 (2017).
86. Jones, G., Jackson, W. R., Choi, C. Y. & Bergmark, W. R. Solvent effects on emission yield and lifetime for coumarin laser dyes. Requirements for a rotatory decay mechanism. *J. Phys. Chem.* **89**, 294–300 (1985).
87. Nad, S., Kumbhakar, M. & Pal, H. Photophysical properties of coumarin-152 and coumarin-481 dyes: Unusual behavior in nonpolar and in higher polarity solvents. *J. Phys. Chem. A* **107**, 4808–4816 (2003).
88. Pawlicki, M., Collins, H. A., Denning, R. G. & Anderson, H. L. Two-photon absorption and the design of two-photon dyes. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **48**, 3244–3266 (2009).
89. Zou, Q. *et al.* Synthesis and in vitro photocytotoxicity of coumarin derivatives for one- and two-photon excited photodynamic therapy. *J. Med. Chem.* **56**, 5288–5294 (2013).
90. Fischer, A., Cremer, C. & Stelzer, E. H. K. Fluorescence of coumarins and xanthenes after two-photon absorption with a pulsed titanium–sapphire laser. *Appl. Opt.* **34**, 1989–2003 (1995).
91. Fan, Y. *et al.* Coumarin-based near-infrared fluorogenic probes: Recent advances, challenges and future perspectives. *Coord. Chem. Rev.* **480**, 215020 (2023).
92. Dai, J., Ma, C., Zhang, P., Fu, Y. & Shen, B. Recent progress in the development of fluorescent probes for detection of

- biothiols. *Dye. Pigment.* **177**, 108321 (2020).
93. Liu, J. *et al.* A carboxylic acid-functionalized coumarin-hemicyanine fluorescent dye and its application to construct a fluorescent probe for selective detection of cysteine over homocysteine and glutathione. *RSC Adv.* **4**, 64542–64550 (2014).
94. Pal, S. *et al.* A new fluorogenic probe for the selective detection of carbon monoxide in aqueous medium based on Pd(0) mediated reaction. *Chem. Commun.* **51**, 4410–4413 (2015).
95. Theophil Eicher, V. S. Synthese und Eigenschaften von o-hydroxyphenyl- und o-acetylaminophenyl-substituierten Cyclopropenonen. Eine neuartige thermische Umwandlung funktionalisierter Diarylcyclopropenone. *Synthesis (Stuttg.)* **5**, 372–378 (1989).
96. Wu, X. F., Neumann, H. & Beller, M. Synthesis of heterocycles via palladium-catalyzed carbonylations. *Chem. Rev.* **113**, 1–35 (2013).
97. Chenal, T., Cipres, I., Jenck, J., Kalck, P. & Peres, Y. Carbon monoxide as a building block in organic synthesis. Part II. One-step synthesis of esters by alkoxycarbonylation of naturally occurring allylbenzenes, propenylbenzenes and monoterpenes. *J. Mol. Catal.* **78**, 351–366 (1993).
98. Ferguson, J., Zeng, F. & Alper, H. Synthesis of coumarins via Pd-catalyzed oxidative cyclocarbonylation of 2-vinylphenols. *Org. Lett.* **14**, 5602–5605 (2012).
99. Sasano, K., Takaya, J. & Iwasawa, N. Palladium(II)-catalyzed

- direct carboxylation of alkenyl C-H bonds with CO₂. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 10954–10957 (2013).
100. Casanova, N., Seoane, A., Mascareñas, J. L. & Gulías, M. Rhodium-catalyzed (5+1) annulations between 2-alkenylphenols and allenes: A practical entry to 2,2-disubstituted 2H-chromenes. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **54**, 2374–2377 (2015).
 101. Liu, X. G. *et al.* Cp*Co(III)-Catalyzed Annulations of 2-Alkenylphenols with CO: Mild Access to Coumarin Derivatives. *Org. Lett.* **17**, 5404–5407 (2015).
 102. Inamoto, K., Kadokawa, J. & Kondo, Y. Ruthenium-catalyzed carbonylative C-H cyclization of 2-arylphenols: A novel synthetic route to 6 H-dibenzo[b,d]pyran-6-ones. *Org. Lett.* **15**, 3962–3965 (2013).
 103. Luo, S., Luo, F. X., Zhang, X. S. & Shi, Z. J. Synthesis of dibenzopyranones through palladium-catalyzed directed C-H activation/carbonylation of 2-arylphenols. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **52**, 10598–10601 (2013).
 104. Kujawa, S., Best, D., Burns, D. J. & Lam, H. W. Synthesis of spirocyclic enones by rhodium-catalyzed dearomatizing oxidative annulation of 2-alkenylphenols with alkynes and enynes. *Chem. - A Eur. J.* **20**, 8599–8602 (2014).
 105. Yang, D., Zhu, Y., Yang, N., Jiang, Q. & Liu, R. One-Step Synthesis of Substituted Benzofurans from ortho-Alkenylphenols via Palladium-Catalyzed C=H Functionalization. *Adv. Synth. Catal.* **358**, 1731–1735 (2016).
 106. Crecente-Campo, J. Synthesis of 4-phenylcoumarin from 2-

- phenylcoumarin from 2- hydroxybenzophenone imine and diethyl hydroxybenzophenone imine and diethyl malonate by microwave assisted malonate by microwave assisted Knoevenagel condensation. *13rd Int. Electron. Conf. Synth. Org. Chem. Ecsoc* **13**, 3–5 (2009).
107. Shan, G., Yang, X., Ma, L. & Rao, Y. Pd-catalyzed C-H oxygenation with TFA/TFAA: Expedient access to oxygen-containing heterocycles and late-stage drug modification. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **51**, 13070–13074 (2012).
 108. Boisselier, E. & Astruc, D. Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity. *Chem. Soc. Rev.* **38**, 1759–1782 (2009).
 109. Zhao, W., Brook, M. A. & Li, Y. Design of gold nanoparticle-based colorimetric biosensing assays. *ChemBioChem* **9**, 2363–2371 (2008).
 110. Bunz, U. H. F. & Rotello, V. M. Gold nanoparticle-fluorophore complexes: Sensitive and discerning ‘noses’ for biosystems sensing. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **49**, 3268–3279 (2010).
 111. John Turkevich, Peter Cooper Stevenson, J. H. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discuss. Faraday Soc.* **11**, 55–75 (1951).
 112. Frens, G. Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions. *Nat. Phys. Sci.* **241**, 20–22 (1973).
 113. Lin, S. Y., Tsai, Y. T., Chen, C. C., Lin, C. M. & Chen, C. H. Two-step functionalization of neutral and positively charged thiols onto citrate-stabilized Au nanoparticles. *J. Phys. Chem. B* **108**,

2134–2139 (2004).

114. Giersig, M. & Mulvaney, P. Preparation of Ordered Colloid Monolayers by Electrophoretic Deposition. *Langmuir* **9**, 3408–3413 (1993).
115. Brust, M., Walker, M., Bethell, D., Schiffrin, D. J. & Whyman, R. Synthesis of Thiol-derivatised Gold Nanoparticles in a Two-phase Liquid-Liquid System. *Chem. Commun.* 801–802 (1994).
116. Maier, S. A. & Atwater, H. A. Plasmonics: Localization and guiding of electromagnetic energy in metal/dielectric structures. *J. Appl. Phys.* **98**, 01110 (2005).
117. Jauffred, L., Samadi, A., Klingberg, H., Bendix, P. M. & Oddershede, L. B. Plasmonic Heating of Nanostructures. *Chem. Rev.* **119**, 8087–8130 (2019).
118. Schuller, J. A. *et al.* Plasmonics for extreme light concentration and manipulation. *Nat. Mater.* **9**, 193–204 (2010).
119. Link, S., Wang, Z. L. & El-Sayed, M. A. Alloy formation of gold-silver nanoparticles and the dependence of the plasmon absorption on their composition. *J. Phys. Chem. B* **103**, 3529–3533 (1999).
120. Bai, X. *et al.* The basic properties of gold nanoparticles and their applications in tumor diagnosis and treatment. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 2480–2497 (2020).
121. Su, K. H. *et al.* Interparticle coupling effects on plasmon resonances of nanogold particles. *Nano Lett.* **3**, 1087–1090 (2003).
122. Falahati, M. *et al.* Gold nanomaterials as key suppliers in biological and chemical sensing, catalysis, and medicine.

- Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1864**, 129435 (2020).
123. Bouché, M. *et al.* Recent Advances in Molecular Imaging with Gold Nanoparticles. *Bioconjug. Chem.* **31**, 303–314 (2020).
124. Corma, A. & Garci, H. Supported gold nanoparticles as catalysts for organic reactions. *Chem. Soc. Rev.* **37**, 2096–2126 (2008).
125. Thambiraj, S., Hema, S. & Ravi Shankaran, D. Functionalized gold nanoparticles for drug delivery applications. *Mater. Today Proc.* **5**, 16763–16773 (2018).
126. Yu, L. & Li, N. Noble metal nanoparticles-based colorimetric biosensor for visual quantification: A mini review. *Chemosensors* **7**, (2019).
127. Priyadarshini, E. & Pradhan, N. Gold nanoparticles as efficient sensors in colorimetric detection of toxic metal ions: A review. *Sensors Actuators, B Chem.* **238**, 888–902 (2017).
128. Gaviña, P., Parra, M., Gil, S. & M. Costero, A. Red or Blue? Gold Nanoparticles in Colorimetric Sensing. *Gold Nanoparticles - Reaching New Heights* (2019). doi:10.5772/intechopen.80052
129. Liu, X., Atwater, M., Wang, J. & Huo, Q. Extinction coefficient of gold nanoparticles with different sizes and different capping ligands. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **58**, 3–7 (2007).
130. Kamat, P. V., Barazzouk, S. & Hotchandani, S. Electrochemical modulation of fluorophore emission on a nanostructured gold film. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **41**, 2764–2767 (2002).
131. Thomas, K. G. & Kamat, P. V. Chromophore-Functionalized

Gold Surface Binding Properties of Capped Au. **36**, 888–898 (2003).

132. Srivastava, S., Frankamp, B. L. & Rotello, V. M. Controlled plasmon resonance of gold nanoparticles self-assembled with PAMAM dendrimers. *Chem. Mater.* **17**, 487–490 (2005).
133. Martí, A., Costero, A. M., Gaviña, P. & Parra, M. Selective colorimetric NO(g) detection based on the use of modified gold nanoparticles using click chemistry. *Chem. Commun.* **51**, 3077–3079 (2015).
134. Feng, J. J. *et al.* Single molecular functionalized gold nanoparticles for hydrogen-bonding recognition and colorimetric detection of dopamine with high sensitivity and selectivity. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **5**, 1226–1231 (2013).
135. Chen, Z., Zhang, C. & Wang, C. A colorimetric assay of dopamine utilizing melamine modified gold nanoparticle probes. *Anal. Methods* **7**, 838–841 (2015).
136. Kong, B. *et al.* Sensitive and selective colorimetric visualization of cerebral dopamine based on double molecular recognition. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **50**, 1837–1840 (2011).
137. Godoy-Reyes, T. M. *et al.* Selective and sensitive colorimetric detection of the neurotransmitter serotonin based on the aggregation of bifunctionalised gold nanoparticles. *Sensors Actuators, B Chem.* **258**, 829–835 (2018).
138. Du, X., Zhang, X., Jiang, C., Zhang, W. & Yang, L. The trace detection of nitrite ions using neutral red functionalized SH- β -cyclodextrin @Au nanoparticles. *Sensors* **18**, (2018).
139. Benkhaled, A. *et al.* Synthesis and characterization of

- amphiphilic per-(6-thio-2,3-trimethylsilyl)cyclodextrin:
Application to Langmuir film formation. *Carbohydr. Polym.* **73**,
482–489 (2008).
140. Peng, L. *et al.* Reversible phase transfer of nanoparticles based
on photoswitchable host-guest chemistry. *ACS Nano* **8**, 2555–
2561 (2014).
 141. Gadelle, A. & Defaye, J. Selective Halogenation at Primary
Positions of Cyclomaltooligosaccharides and a Synthesis of
Per-3,6-anhydro Cyclomaltooligosaccharides. *Angew. Chemie
Int. Ed. English* **30**, 78–80 (1991).
 142. Baer, H. H. *et al.* Improved preparation of hexakis(6-
deoxy)cyclomalto-hexaose and heptakis(6-
deoxy)cyclomaltoheptaose. *Carbohydr. Res.* **228**, 307–314
(1992).
 143. Chmurski, K. & Defaye, J. An Improved Synthesis of Per(6-
Deoxyhalo) Cyclodextrins Using N-Halosuccinimides —
Triphenylphosphine in Dimethylformamide. *Proc. Ninth Int.
Symp. Cyclodextrins* 183–186 (1999).
 144. Turcu, I. *et al.* Lipoic acid gold nanoparticles functionalized
with organic compounds as bioactive materials.
Nanomaterials **7**, 1–9 (2017).
 145. Volkert, A. A., Subramaniam, V., Ivanov, M. R., Goodman, A.
M. & Haes, A. J. Salt-mediated self-assembly of thioctic acid
on gold nanoparticles. *ACS Nano* **5**, 4570–4580 (2011).
 146. Shipilov, D. A. *et al.* Direct esterification of the hydroxyl
groups of β -cyclodextrin with some aromatic monocarboxylic
acids. *Russ. J. Gen. Chem.* **85**, 2605–2608 (2015).

147. Hornig, S., Liebert, T. & Heinze, T. Synthesis and characterization of sulfur containing dextran- and β -cyclodextrin derivatives. *Polym. Bull.* **59**, 65–71 (2007).
148. Jana, N. R., Gearheart, L. & Murphy, C. J. Seeding growth for size control of 5-40 nm diameter gold nanoparticles. *Langmuir* **17**, 6782–6786 (2001).
149. Grabar, K. C., Hommer, M. B., Natan, M. J. & Freeman, R. G. Preparation and Characterization of Au Colloid Monolayers. *Anal. Chem.* **67**, 735–743 (1995).
150. Brown, K. R., Fox, A. P. & Natan, M. J. Morphology-dependent electrochemistry of cytochrome c at Au colloid-modified SnO₂ electrodes. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 1154–1157 (1996).
151. Amina, S. J. & Guo, B. A review on the synthesis and functionalization of gold nanoparticles as a drug delivery vehicle. *Int. J. Nanomedicine* **15**, 9823–9857 (2020).
152. Martí, A. *et al.* Functionalized gold nanoparticles as an approach to the direct colorimetric detection of DCNP nerve agent simulant. *European J. Org. Chem.* 4770–4779 (2013).
153. Susumu, K. *et al.* Multifunctional compact zwitterionic ligands for preparing robust biocompatible semiconductor quantum dots and gold nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 9480–9496 (2011).
154. Huang, X. & El-Sayed, M. A. Gold nanoparticles: Optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy. *J. Adv. Res.* **1**, 13–28 (2010).
155. Fukuda, T., Maeda, Y. & Kitano, H. Stereoselective Inclusion of DOPA Derivatives by a Self-Assembled Monolayer of Thiolated

- Cyclodextrin on a Gold Electrode. **2000**, 1887–1890 (2000).
156. Majewska, U. E., Chmurski, K., Biesiada, K. & Olszyna, A. R. Dopamine Oxidation at Per (6-deoxy-6-thio)- α -Cyclodextrin Monolayer Modified Gold Electrodes. *Electroanalysis* **18**, 1463–1470 (2006).
 157. Fragoso, A., Almirall, E. & Cao, R. A supramolecular approach to the selective detection of dopamine in the presence of ascorbate { . *Chem. Commun.* 2230–2231 (2004).
 158. Sheng, W., Lv, F., Tang, B., Hao, E. & Jiao, L. Toward the most versatile fluorophore : Direct functionalization of BODIPY dyes via regioselective C – H bond activation. *Chinese Chem. Lett.* **30**, 1825–1833 (2019).
 159. Treibs, V. A. & Kreuzer, F. Difluorboryl-Komplexe von Di- und Tripyrrylmethenen. *Liebigs Ann. Chem.* **718**, 208–223 (1968).
 160. Leen, V. & Dehaen, W. Fluorescent indicators based on BODIPY. *Chem Soc Rev* **41**, 1130–1172 (2012).
 161. Zhu, S. *et al.* Highly Water-Soluble Neutral BODIPY Dyes with Controllable Fluorescence Quantum Yields. (2011).
 162. Ulrich, G., Ziessel, R. & Harriman, A. The Chemistry of Fluorescent Bodipy Dyes : Versatility Unsurpassed. *Angew. Chem. Int. Ed* **47**, 1184–1201 (2008).
 163. Wagner, R. W. & Lindsey, J. S. Boron-dipyrromethene dyes for incorporation in synthetic multi-pigment light-harvesting arrays. *Pure Appl. Chem.* **68**, 1373–1380 (1996).
 164. Moon, S. Y., Cha, N. R., Kim, Y. H. & Chang, S. Fluoroionophore Based upon 8-Hydroxyquinoline. *J. Org. Chem* **69**, 181–183 (2004).

165. Baruah, M., Qin, W., Basarić, N., De Borggraeve, W. M. & Boens, N. BODIPY-based hydroxyaryl derivatives as fluorescent pH probes. *J. Org. Chem.* **70**, 4152–4157 (2005).
166. Shah, M. *et al.* Pyrromethene–BF₂ complexes as laser dyes:1. *Heteroat. Chem.* **1**, 389–399 (1990).
167. Boyer, J. H., Haag, A. M., Sathyamoorthi, G. & Pavlopoulos, T. G. Pyrromethene-BF, Complexes. *Heteroat. Chem.* **4**, 39–49 (1993).
168. Li, Z., Mintzer, E. & Bittman, R. First synthesis of free cholesterol-BODIPY conjugates. *J. Org. Chem.* **71**, 1718–1721 (2006).
169. Yakubovskiy, V. P., Shandura, M. P. & Kovtun, Y. P. Boradipyrromethenecyanines. *European J. Org. Chem.* 3237–3243 (2009).
170. Wu, L. & Burgess, K. A new synthesis of symmetric boraindacene (BODIPY) dyes. *Chem. Commun.* 4933–4935 (2008).
171. Poddar, M. & Misra, R. Recent advances of BODIPY based derivatives for optoelectronic applications. *Coord. Chem. Rev.* **421**, 213462 (2020).
172. Verbelen, B., Leen, V., Wang, L., Boens, N. & Dehaen, W. Direct palladium-catalysed C–H arylation of BODIPY dyes at the 3- and 3,5-positions. *Chem. Commun.* **48**, 9129–9131 (2012).
173. Niu, L. Y. *et al.* BODIPY-based ratiometric fluorescent sensor for highly selective detection of glutathione over cysteine and homocysteine. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 18928–18931 (2012).

174. Ulrich, G., Ziessel, R. & Haefele, A. A general synthetic route to 3,5-substituted boron dipyrromethenes: Applications and properties. *J. Org. Chem.* **77**, 4298–4311 (2012).
175. Wang, L. *et al.* UV-vis spectroscopy of the coupling products of the palladium-catalyzed C-H arylation of the BODIPY core. *Photochem. Photobiol. Sci.* **12**, 835–847 (2013).
176. He, H. & Dennis K. P. Ng. A ratiometric near-infrared pH-responsive fluorescent dye based on distyryl BODIPY. *Org. Biomol. Chem.* **9**, 2610–2613 (2011).
177. Wu, W., Guo, H., Wu, W., Ji, S. & Zhao, J. Organic triplet sensitizer library derived from a single chromophore (BODIPY) with long-lived triplet excited state for triplet-triplet annihilation based upconversion. *J. Org. Chem.* **76**, 7056–7064 (2011).
178. Shi, W. J., Lo, P. C., Singh, A., Ledoux-Rak, I. & Ng, D. K. P. Synthesis and second-order nonlinear optical properties of push-pull BODIPY derivatives. *Tetrahedron* **68**, 8712–8718 (2012).
179. Leen, V. *et al.* 1,7-disubstituted boron dipyrromethene (BODIPY) dyes: Synthesis and spectroscopic properties. *J. Org. Chem.* **76**, 8168–8176 (2011).
180. Goud, T. V., Tutar, A. & Biellmann, J. F. Synthesis of 8-heteroatom-substituted 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene dyes (BODIPY). *Tetrahedron* **62**, 5084–5091 (2006).
181. Peña-Cabrera, E. *et al.* Simple, general, and efficient synthesis of meso-substituted borondipyrromethenes from a single platform. *Org. Lett.* **9**, 3985–3988 (2007).

182. Sobenina, L. N. *et al.* General route to symmetric and asymmetric meso -CF₃-3(5)- aryl(hetaryl)- and 3,5-diaryl(dihetaryl)-BODIPY dyes. *Org. Lett.* **13**, 2524–2527 (2011).
183. Goze, C. *et al.* Synthesis and photophysical properties of borondipyrromethene dyes bearing aryl substituents at the boron center. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 10231–10239 (2006).
184. Tahtaoui, C. *et al.* Convenient Method To Access New 4 , 4-Dialkoxy- and 4 , 4-Diaryloxy-diaza- s -indacene Dyes : Synthesis and Spectroscopic Evaluation. *J. Org. Chem.* **72**, 269–272 (2007).
185. Didier, P., Ulrich, G., Mély, Y. & Ziessel, R. Improved push-pull-push E-Bodipy fluorophores for two-photon cell-imaging. *Org. Biomol. Chem.* **7**, 3639–3642 (2009).
186. Sun, W., Li, M., Fan, J. & Peng, X. Activity-Based Sensing and Theranostic Probes Based on Photoinduced Electron Transfer. *Acc. Chem. Res.* **52**, 2818–2831 (2019).
187. M. Costero, A., Parra, M., Gil, S. & Gaviña, P. *BODIPY Core as Signaling Unit in Chemosensor Design. BODIPY Dyes - A Privilege Molecular Scaffold with Tunable Properties* (2019).
188. Boens, N., Leen, V. & Dehaen, W. Fluorescent indicators based on BODIPY. *Chem. Soc. Rev.* **41**, 1130–1172 (2012).
189. Gotor, R., Costero, A. M., Gaviña, P. & Gil, S. Ratiometric double channel borondipyrromethene based chemodosimeter for the selective detection of nerve agent mimics. *Dye. Pigment.* **108**, 76–83 (2014).
190. Gotor, R. *et al.* BODIPY dyes functionalized with 2-(2-

- dimethylaminophenyl)ethanol moieties as selective OFF-ON fluorescent chemodosimeters for the nerve agent mimics DCNP and DFP. *RSC Adv.* **4**, 15975–15982 (2014).
191. Barba-Bon, A., Costero, A. M., Gil, S., Harriman, A. & Sancenón, F. Highly selective detection of nerve-agent simulants with BODIPY dyes. *Chem. - A Eur. J.* **20**, 6339–6347 (2014).
192. Barba-Bon, A., Costero, A. M., Gil, S., Martínez-Máñez, R. & Sancenón, F. Selective chromo-fluorogenic detection of DFP (a Sarin and Soman mimic) and DCNP (a Tabun mimic) with a unique probe based on a boron dipyrromethene (BODIPY) dye. *Org. Biomol. Chem.* **12**, 8745–8751 (2014).
193. Juárez, L. A. *et al.* A Boron Dipyrromethene (BODIPY)-Based Cull-Bipyridine Complex for Highly Selective NO Detection. *Chem. - A Eur. J.* **21**, 15486–15490 (2015).
194. Lee, J. S., Kim, H. K., Feng, S., Vendrell, M. & Chang, Y. T. Accelerating fluorescent sensor discovery: Unbiased screening of a diversity-oriented BODIPY library. *Chem. Commun.* **47**, 2339–2341 (2011).
195. Sekhar, A. R., Kaloo, M. A. & Sankar, J. Aliphatic amine discrimination by pentafluorophenyl dibromo BODIPY. *Chem. - An Asian J.* **9**, 2422–2426 (2014).
196. Zhu, S. *et al.* Controlled Knoevenagel reactions of methyl groups of 1,3,5,7-tetramethyl BODIPY dyes for unique BODIPY dyes. *RSC Adv.* **2**, 404–407 (2012).
197. Lakshmi, V. & Ravikanth, M. Synthesis of conjugated BODIPYs via the wittig reaction. *J. Org. Chem.* **78**, 4993–5000 (2013).

198. Secor, K. E. & Glass, T. E. Selective amine recognition: Development of a chemosensor for dopamine and norepinephrine. *Org. Lett.* **6**, 3727–3730 (2004).