

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**



**Sensores químicos cromogénicos y fluorogénicos para la  
detección de iones y moléculas neutras.**

**TESIS DOCTORAL**

Presentada por:

**Beatriz García Acosta**

Dirigida por:

**Dr. Ramón Martínez Máñez**

**Dr. Félix Sancenón Galarza**

Valencia 2007



*A mi familia.*

*A mis amigos.*

*A todos los que han tenido que ver con este trabajo, gracias.*





## RESUMEN.

El trabajo realizado durante esta Tesis Doctoral se puede dividir en dos grandes bloques, en el primero se estudió el comportamiento de colorantes ya conocidos, como sensores frente a diferentes especies iónicas y neutras, de interés medioambiental, o biomoléculas. La mayor parte de estos estudios de selectividad se realizaron en disolventes orgánicos aunque también se ensayaron algunos de los colorantes incorporados en matrices poliméricas en agua. El segundo bloque está dedicado a la síntesis y caracterización de nuevos sistemas cromo-/fluorogénicos que pueden tener aplicación en el campo de los sensores químicos en un futuro próximo.

Así, dentro del primer bloque se estudiaron varias familias de colorantes funcionalizadas con heterociclos. Uno de estos sistemas está basado en el empleo de sales de pirilio 2,4,6-trisustituidas como sensores moleculares para el reconocimiento óptico de especies aniónicas y nucleofílicas. Se sintetizaron también monómeros del tipo 2,6-difenil-4-(*p*-metacriloxi)fenil pirilio que se emplearon para preparar polímeros con diferentes grados de hidrofilia. El uso de estos materiales posibilita la detección de aniones como cianuro y carbonato en medio acuoso. Para lograr la selectividad por algún anión en específico se varía el pH del medio. En el caso del cianuro (a pH 11) se produce un ataque nucleofílico sobre el anillo de pirilio, provocando la apertura de este, acompañado de un cambio de color de amarillo a rojo. Igual cambio de color provoca la presencia de carbonato a pH 7.5, esta vez por el aumento de la concentración del anión hidroxilo en el interior de la membrana polimérica, que se produce al difundir el carbonato a través de ella. El hidroxilo también ataca al anillo de pirilio con la consecuente apertura del mismo.

Los derivados de pirilio 4-arilvinil-2,6-arilsustituidos se emplearon para la detección selectiva de aminas. Cuando a la disolución de colorante se le añade una amina primaria se forma la sal de piridino correspondiente, por el ataque nucleofílico del grupo amino sobre el anillo de pirilio. Se aprovechó el mayor carácter nucleofílico del grupo amino de una amina primaria con respecto al de un  $\alpha$ -aminoácido para efectuar el reconocimiento de aminas biógenas en matrices alimenticias.

Las 4-(*p*-fenilamino)-2,6-difenilpiridinas, con el N del grupo amino sustituido con éteres corona, se estudiaron como sistemas dador-aceptor para el reconocimiento de especies iónicas. Estos receptores formaron dos tipos de complejos con cationes

metálicos, uno al coordinar con la anilina (grupo dador) y otro al coordinar con la unidad de piridina (grupo aceptor). Los complejos formados presentaron colores distintos ya que los complejos de coordinación con la piridina absorben en la zona visible (son amarillos) mientras que los resultantes de la complejación con la anilina lo hacen en la zona UV (son incoloros). El ligando 10-[4-(2,6-difenilpiridin-4-il)-fenil]-10-aza-1,4-dioxa-7,13-ditia-ciclopentadecano (**3b**) forma, de una manera selectiva, un complejo incoloro con Hg(II) debido a que el ciclo que forma parte de esta molécula (10-aza-1,4-dioxa-7,13-ditiaciclopentadecano) interacciona selectivamente con este catión. Estas especies ligando:catión metálico forman compuestos ternarios con aniones, de diferentes colores dependiendo de la intensidad de la interacción. Estos cambios de color con aniones son poco selectivos aunque ciertos sistemas ligando-metal si que han dado respuesta selectiva a un cierto anión (como por ejemplo el caso del ligando **3b** con el catión  $Pb^{2+}$  que ha servido para el reconocimiento selectivo del anión acetato). De todas maneras con todos los complejos se ha aplicado el análisis estadístico del comportamiento del conjunto de ligandos llegándose a determinar patrones de selectividad para ciertos aniones.

En el segundo bloque de esta Tesis se han sintetizado una serie de compuestos heterocíclicos con propiedades cromo-/fluorogénicas, la mayoría de ellos conteniendo un anillo de tiofeno en su estructura. Los bitiofenos funcionalizados con anillos macrocíclicos con heteroátomos como N, S y O pueden ser usados para la detección de cationes metálicos. Otra familia de compuestos que se ha sintetizado son los triheterociclos con el pirrol como anillo central *N*-sustituido por el *p*-aminobenceno. Este amino terminal puede servir para anclar grupos con capacidad para coordinar aniones como puedan ser ureas, tioureas, guanidinas, amidas y sales de amonio cuaternario. Por último se han sintetizado *N*-feniltiosemicarbazonas de 2'-tiofenos-5'-sustituidos. Estos heterociclos contienen agrupaciones N-H y C-H con capacidad para formar enlaces de hidrógeno con aniones, que están formando parte de la estructura del cromóforo. La mayoría de estos heterociclos no han sido sintetizados anteriormente, por lo que se realizó la caracterización espectroscópica de los mismos.

## RESUM.

El treball realitzat en aquesta Tesi Doctoral es pot dividir en dos blocs, en el primer s'estudia el comportament de colorants ja coneguts, com a sensors davant de diferents espècies iòniques i neutres, d'interès per al medi ambient o biomolècules. La major part d'aquests estudis de selectivitat es realitzaren en dissolvents orgànics, encara que també es feren assajos amb alguns dels colorants incorporats en matrius polimèriques en medi aquós. El segon bloc està dedicat a la síntesi i caracterització de nous sistemes cromo-/fluorogènics que poden tindre aplicació dins del camp dels sensors químics en un futur pròxim.

Així, dins del primer bloc, s'estudien famílies de colorants funcionalitzats amb heterocicles. Un d'aquests sistemes està basat en l'ús de sals de pirili 2,4,6-trisubstituïdes com sensors moleculars per al reconeixement òptic d'espècies aniòniques i nucleofíliques. Es sintetitzaren també monòmers del tipus 2,6-difenil-4-(*p*-metacriloxi)fenil pirili que s'utilitzaren per a preparar polímers amb diferents graus d'hidrofilia. L'ús d'aquests materials permet la detecció d'anions com cianur i carbonat en medi aquós. Per aconseguir la selectivitat per algun anió específic es canvia el pH del medi. En el cas del cianur (a pH 11) es produeix un atac nucleofilic sobre l'anell de pirili, provocant l'obertura d'aquest, acompanyada d'un canvi de color de groc a vermell. El mateix canvi es produeix amb carbonat a pH 7.5, però aquesta vegada per l'increment de la concentració de l'anió hidroxil dins de la membrana polimèrica degut a la difusió del carbonat. L'hidroxil també ataca l'anell de pirili amb la conseqüent obertura de este.

Els derivats de pirili 4-arilvinil-2,6-arilsubstituïts s'empraren per a la detecció selectiva d'amines. Quan se li afegeix a la dissolució de colorant una amina primària es forma la sal de piridini corresponent, per l'atac nucleofilic del grup amino a l'anell de pirili. S'aprofita el major caràcter nucleofilic del grup amino d'una amina primària respecte al d'un  $\alpha$ -aminoàcid per aconseguir el reconeixement d'amines biogèniques en matrius alimentàries.

Les 4-(*p*-fenilamino)-2,6-difenilpiridines, amb el N del grup amino substituït amb èters corona, s'estudiaren com sistemes donor-acceptor per al reconeixement d'espècies iòniques. Aquests receptors formaren dos tipus de complexos amb cations metàl·lics, un al coordinar amb l'anilina (grup donor) i l'altre al coordinar amb la unitat de piridina (grup acceptor). Els complexos formats tenen diferents colors, ja que els complexos de coordinació amb la piridina absorbeixen en la regió visible (són grocs), i els que resulten de la complexació amb l'anilina ho fan en la

regió ultraviolada (són incoloros). El lligand 10-[4-(2,6-difenilpiridin-4-il)-fenil]-10-aza-1,4-dioxa-7,13-ditia-ciclopentadecà (**3b**) forma, d'una manera selectiva, un complexe incolor amb Hg(II) degut a què el cicle que forma part d'aquesta molècula (10-aza-1,4-dioxa-7,13-ditiaciclopentadecà) interacciona selectivament amb aquest catió. Aquestes espècies lligand-catió metàl·lic formen compostos ternaris amb anions, de diferents colors depenent de la intensitat de la interacció. Aquestos canvis de color amb anions són poc selectius encara que alguns sistemes lligand-metall sí que han donat una resposta selectiva a un determinat anió (com per exemple el cas del lligand **3b** amb el catió  $Pb^{2+}$  que s'ha utilitzat per al reconeixement selectiu de l'anió acetat). Tanmateix, s'ha aplicat l'anàlisi estadístic del comportament del conjunt dels lligands amb tots els complexos, determinant per a certs anions, patrons de selectivitat.

En el segon bloc d'aquesta Tesi s'han sintetitzat una sèrie de compostos heterocíclics amb propietats cromo-/fluorogèniques, la major part d'ells contenint un anell de tiofè en la seua estructura. Els bitiofens funcionalitzats amb anells macrocíclics amb heteroàtoms com N, S i O poden ser utilitzats per a la detecció de cations metàl·lics. Una altra família de compostos que s'han sintetitzat són els triheterocicles amb pirrol com anell central *N*-substituït pel *p*-aminobenzè. Aquest amino terminal pot utilitzar-se per ancorar grups amb capacitat per coordinar anions com poden ser urees, tiourees, guanidines, amides i sals d'amoni quaternari. Per últim, s'han sintetitzat *N*-feniltiosemicarbazones de 2'-tiofens-5'-substituïts. Aquestos heterocicles contenen agrupacions N-H i C-H amb capacitat per formar enllaços d'hidrogen amb anions, que estan formant part de l'estructura del cromòfor. La major part d'aquestos heterocicles no s'havien sintetitzat anteriorment, pel que s'ha realitzat la seua caracterització espectroscòpica.

## ABSTRACT.

The work performed during this Ph. D. is divided in two groups. The first one is dedicated to the study of known dyes as sensors for certain ions and neutral molecules. Most of the studies were done in organic solvents, but some of the dyes were incorporated into polymeric films, in order to use them in water. The second part of the work describes the synthesis and characterization of new chromo-/fluorogenic systems based on five-membered heterocycles, which could be used as chemosensors in the future.

2,4,6-trisubstituted pyrylium salts were used as molecular sensors for the recognition of anionic and nucleophilic species. The 2,6-diphenyl-4-(*p*-metacriloxi)phenyl pyrylium monomers were synthesized for the preparation of polymers with different hydrophilic properties. Anions such as carbonate and cyanide could be detected with these materials. The selectivity of these polymeric materials is function of the pH of the solution. At pH 11 the polymeric materials showed selectivity toward cyanide. The nucleophilic attack of cyanide to the pyrylium ring induced a color change from yellow to red caused by the ring opening. The presence of carbonate at pH 7.5 induced the same color change. The diffusion of the carbonate anion inside the polymeric film induced a local increase in the concentration of the hydroxide anion, which is able to open the pyrylium ring through out a nucleophilic attack, resulting in the color changes observed.

4-arylvinyl-2,6-aryl substituted derivatives were employed in the selective detection of amines. When a primary amine is added to solutions of one of these dyes, a pyridinium salt is formed, due to the nucleophilic attack of the amino to the pyrylium ring. We took advantage of the greater nucleophilicity of the amino group in an amines compare to the amino group in the amino acids, for carrying out the selective recognition of biogenic amines in food.

4-(*p*-phenylamino)-2,6-diphenylpyridines, with the N of the amino group substituted with crown ethers of different size and with different heteroatom, were studied as donor-acceptor systems for the recognition of ionic species. These receptors form two types of complexes with metal cations, one of them when the coordination occurs with the anilinium unit (donor group), and the other one, upon coordination with the pyridine unit (acceptor group). These complexes have different colors properties: yellow (coordination with the pyridine) and colorless (coordination with the aniline). The coordination behavior of these receptors was studied through UV-Vis titrations. Three kinds of responses were observed: (i) dual

coordination, (ii) selective coordination and (iii) no coordination. The receptor 10-[4-(2,6-diphenylpyridin-4-yl)-phenyl]-10-aza-1,4-dioxo-7,13-dithia-cyclopentadecane (**3b**) form, in a selective way, an uncolored complex with Hg(II), due to the fact that 10-aza-1,4-dioxo-7,13-dithiacyclopentadecane macrocycle presented a high affinity for this cation.

These receptor-metal cation complexes were further employed for differential anion sensing. Addition of an anion to a weakly coordinated complex can lead to the formation of a ternary ion pair complex, change the preference for coordination, induce dissociation of the complex or have no effect. The colour changes depend on the effect of the anion. Various patterns of spectral changes were obtained and analysis of the data yielded clear differential recognition patterns for acetate, fluoride, iodide and cyanide anions.

In the second part of this Thesis a serial of heterocyclic compounds with chromo-/fluorogenic properties are synthesized, most of them containing a thiophene ring. The bithiophenes with macrocyclic rings can be used for the detection of metal cations. Triheterocycles with *p*-aminobenzene *N*-substituted pyrrol as central ring were also synthesized. The terminal amino group of these heterocycles can be easily transformed in ureas, thioureas, guanidinium salts, amides and quaternary ammonium salts, moieties that have been extensively used in the design of anion receptors. We used thiosemicarbazones as a novel coordinative subunit for the development of receptors for anions. A family of *N*-phenylthiosemicarbazones of 2'-thiophenes functionalized in the 5' position has been synthesized for this purpose. These receptors contain N-H and C-H moieties that will be able to form coordination complexes with anions through out hydrogen bonding interactions. Most of the heterocycles were spectroscopically characterized, considering that they have never been synthesized.



## ÍNDICE

OBJETIVOS .....	1
Capítulo 1. INTRODUCCIÓN. ....	3
<b>1.1 Propiedades ópticas como señales del reconocimiento molecular.</b> .....	3
<b>1.2 Definición de sensor. Sensores químicos ópticos.</b> .....	8
<b>1.3 Sensores fluorogénicos.</b> .....	11
<b>1.4 Sensores moleculares cromogénicos.</b> .....	21
<b>1.4.1 Cromóforos dador-aceptor.</b> .....	23
<b>1.5 Detección de iones usando sensores ópticos.</b> .....	28
<b>1.6 Sensores ópticos usados en la detección de moléculas neutras.</b> .....	32
<b>1.7 Sensores ópticos soportados en matrices sólidas</b> .....	37
<b>1.8 Actualidad y perspectivas en el uso de sensores ópticos.</b>	46
Capítulo 2. SALES DE PIRILIO EN EL RECONOCIMIENTO DE ANIONES Y ESPECIES NEUTRAS.....	51
<b>2.1 Introducción.</b> .....	51
<b>2.1.1 Propiedades físico-químicas de las sales de pirilio.</b> ..	51
<b>2.1.2 Relación estructura-color.</b> .....	52
<b>2.1.3 Reactividad.</b> .....	54
<b>2.2 Sales de pirilio soportadas en polímeros orgánicos. Uso en el reconocimiento de aniones.</b> .....	55
<b>2.2.1 Reconocimiento de cianuro.</b> .....	60
<b>2.2.2 Reconocimiento de carbonato.</b> .....	65
<b>2.3 Sales de pirilio usadas para la detección de aminas biógenas.</b> .....	73
<b>2.3.1 Aminas biógenas en alimentos y su toxicidad.</b> .....	73
<b>2.3.2 Estructura química de los ligandos utilizados para el reconocimiento selectivo de aminas.</b> .....	77
<b>2.3.3 Pruebas preliminares. Selectividad frente a aminas en presencia de aminoácidos.</b> .....	79
<b>2.3.4 Ensayos en pescados.</b> .....	83
<b>2.3.5 Ensayos en vinos.</b> .....	86
<b>2.3.6 Ensayos en carnes.</b> .....	91
<b>2.3.7 Consideraciones finales.</b> .....	94
Capítulo 3. DERIVADOS DE PIRIDINAS EN EL RECONOCIMIENTO DE ESPECIES IÓNICAS. ....	95
<b>3.1 Piridinas 2,4,6-trisustituidas en el reconocimiento de cationes y aniones de interés medioambiental.</b> .....	95

3.2	<b>Reconocimiento de cationes.</b>	100
3.3	<b>Reconocimiento de aniones.</b>	109
3.4	<b>Síntesis de las piridinas 2,4,6-trisustituidas.</b>	117
Capítulo 4.	<b>SÍNTESIS DE SISTEMAS HETEROCÍCLICOS AROMÁTICOS CON PROPIEDADES CROMO-/FLUOROGÉNICAS.</b>	127
4.1	<b>Introducción.</b>	127
4.1.1	<b>Bitiofenos sustituidos: sistemas conjugados de tipo dador-aceptor de gran versatilidad.</b>	128
4.1.2	<b>Sistemas triheterocíclicos que contienen un anillo de pirrol N-sustituido para su posterior funcionalización.</b>	131
4.1.3	<b>Tiosemicarbazonas en el reconocimiento molecular.</b>	135
4.2	<b>Síntesis y caracterización de los derivados heterocíclicos.</b>	136
4.2.1	<b>Síntesis y caracterización de bitiofenos.</b>	136
4.2.2	<b>Síntesis y caracterización de triheterociclos.</b>	140
4.2.3	<b>Síntesis y caracterización de feniltiosemicarbazonas.</b>	148
4.3	<b>Parte Experimental.</b>	157
	<b>CONCLUSIONES</b>	171
	<b>CONCLUSIONS</b>	173
	<b>ANEXOS</b>	175
	Anexo I. Nomenclatura de los compuestos químicos sintetizados.	175
	Anexo II. Disolventes y equipos.	177
	Anexo III. Síntesis de los polímeros con sales de pirilio.	179
	Anexo IV. Publicación. "Sensory hybrid host materials for the selective chromo-fluorogenic detection of biogenic amines"	181

## **OBJETIVOS**

El objetivo que se perseguía al comenzar la presente Tesis Doctoral era la síntesis, caracterización y estudio de coordinación de varias familias de sensores ópticos para el reconocimiento de iones y especies neutras. De esta manera, y teniendo en cuenta los trabajos precedentes realizados por miembros del grupo de investigación se decidió centrar los objetivos en los siguientes puntos:

1.- Seguir explorando el uso de sensores ópticos conteniendo el anillo de pirilio debido a la versatilidad del mismo para dar reacciones acopladas a cambios de color como se ha demostrado en los distintos trabajos publicados por otros miembros del grupo de investigación. Estudiar la posibilidad de anclar estos receptores en polímeros orgánicos, como una manera de aumentar la selectividad y la aplicabilidad de estos sistemas sensores en muestras reales (acuosas). Un punto importante será la comparación de la selectividad alcanzada con estos materiales y con los mismos receptores en disolución. Se estudiarán también las capacidades de reconocimiento de los derivados de pirilio y de los materiales poliméricos en presencia de aniones y moléculas neutras de interés medioambiental y biológico. Fundamentalmente, se centrará la atención en la detección de moléculas neutras con carácter nucleofílico (aminas, tioles) ya que estas especies pueden dar lugar a reacciones con el anillo de pirilio que es altamente electrofílico.

2.- Sintetizar y caracterizar derivados macrocíclicos (conteniendo átomos de oxígeno, azufre y nitrógeno) funcionalizados con 2,4,6-trifenilpiridina. Estudio de las propiedades fotofísicas y de complejación frente a cationes metálicos de interés medioambiental. Estudiar la posibilidad de emplear estos complejos de cationes metálicos para el reconocimiento de aniones inorgánicos de interés.

3.- Dentro de la multitud de agrupaciones con color y fluorescentes que se han venido empleando, para la preparación de sensores ópticos de aniones y cationes, los heterociclos conteniendo anillos de tiofeno no han sido muy empleados. De esta forma uno de los objetivos que se proponen es la preparación de agrupaciones orgánicas conjugadas conteniendo anillos de tiofeno, pirrol y furano con determinados grupos funcionales que puedan ser fácilmente modificables, y que puedan actuar como unidades indicadoras ópticas y electroquímicas para el desarrollo de nuevos receptores para cationes y aniones. La idea es que una vez obtenida la unidad indicadora esta sea funcionalizada de una manera fácil con grupos con capacidad coordinante de cationes (macrocielos de distintos tamaños conteniendo átomos dadores como nitrógeno, oxígeno y azufre) y con grupos con

*Objetivos.*

capacidad para coordinar aniones (ureas, tioureas, sales de guanidinio, sales de tiouronio, amidas y sales de amonio cuaternario). Esto permitirá tener una amplia familia de receptores para cationes y para aniones que puedan ser estudiados mediante espectroscopia UV-visible, fluorescencia y medidas electroquímicas.

## **Capítulo 1. INTRODUCCIÓN.**

### **1.1 Propiedades ópticas como señales del reconocimiento molecular.**

El color es una de las sensaciones que percibimos a diario. Es una parte importante de cada experiencia visual y emocional en los seres humanos. El color se puede definir como la sensación visual creada por los estímulos que el ojo recibe producto de la luz reflejada por los cuerpos.

Existen dos tipos de objetos visibles: los que emiten luz por si mismos y los que la reflejan. Su color depende del espectro de la luz incidente y de la absorción del objeto, la cual determina qué ondas son reflejadas.

El sistema visual humano sólo está adaptado para percibir diferentes colores en un pequeño rango del conjunto de las radiaciones electromagnéticas: la radiación visible. Los colores observados están determinados por la distribución espectral de la radiación transmitida.<sup>1</sup>

La radiación electromagnética se caracteriza por su longitud de onda, amplitud y frecuencia. Es sólo en la franja del espectro electromagnético (figura 1.1), correspondiente a longitudes de onda entre los 380 nm y los 770 nm donde se localiza la región visible, que comprende del violeta al rojo.

---

<sup>1</sup> R. C. Denney, R. Sinclair, Visible and Ultraviolet Spectroscopy, John Wiley & Sons Ed., 1987.

Introducción.

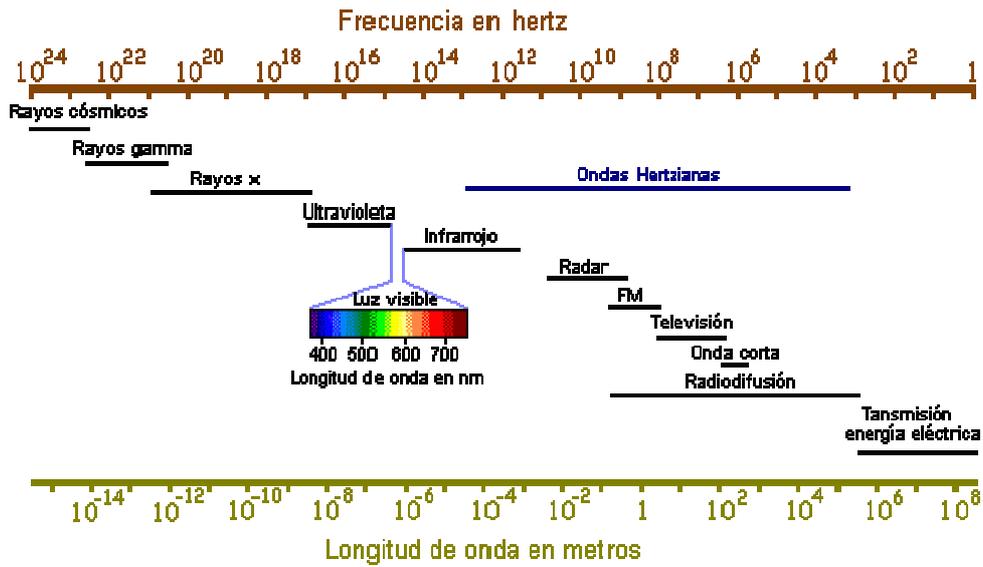


Figura 1.1. Espectro electromagnético.

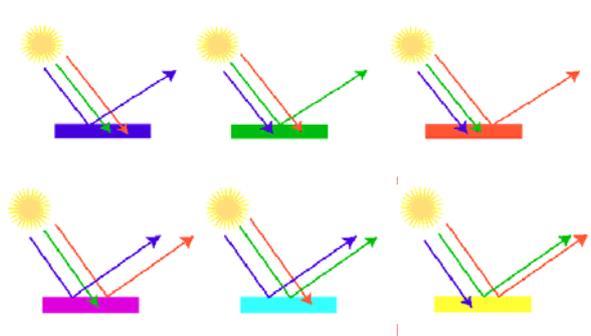
La fuente más común de radiación electromagnética con la que estamos familiarizados en la Tierra es el Sol. El mismo emite energía radiante que cubre un amplio rango de frecuencias del espectro electromagnético, teniendo el máximo de emisión en la región visible. Cuando dicha energía interacciona con un objeto, parte de esta es dispersada o absorbida, mientras que el resto es reflejada o transmitida.

A la luz solar se le denomina luz blanca, pues contiene todas las longitudes de onda del espectro visible en proporciones iguales. La luz blanca está compuesta por la unión de 7 colores básicos, los colores del arco iris, cada uno con su correspondiente longitud de onda. La distribución espectral aproximada de cada color se muestra en la tabla 1.1.

**Tabla 1.1.** Rango de longitudes de onda correspondiente a cada color del espectro electromagnético.

Tipo de radiación	Longitudes de onda (nm)
Violeta	380-436
Añil (Índigo)	436-470
Azul	470-495
Verde	495-566
Amarillo	566-589
Anaranjado	589-627
Rojo	627-770

La absorción de la luz visible o ultravioleta puede dar lugar a transiciones de electrones entre el estado fundamental y los estados excitados de los átomos y las moléculas.<sup>2</sup> Estas excitaciones electrónicas son las responsables del color de los objetos. Por ejemplo una hoja de una planta es verde porque la clorofila absorbe en las regiones azul (470 nm) y roja (650 nm) del espectro de la luz visible. En la figura 1.2 se representa el color que observamos en los objetos dependiendo de las longitudes de onda que estos absorben. Podemos decir entonces que las excitaciones electrónicas se pueden detectar (con resolución limitada) sin la ayuda de ningún equipo pues el ojo humano es sensible a este tipo de radiación.

**Figura 1.2.** Relación entre la absorción de los colores primarios por diferentes objetos con los colores observados.

<sup>2</sup> T. Engel, P. Reid, “*Química Física*”, Pearson Educación S. A, (Traducción de Physical Chemistry, 1ª edición), 2006.

## Introducción.

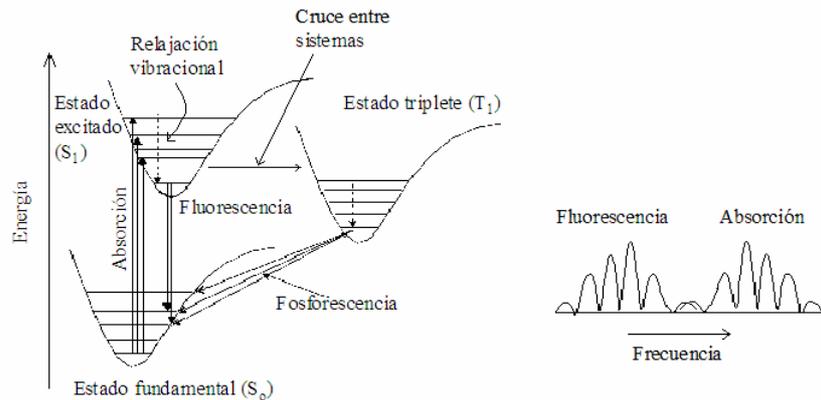
La espectroscopía electrónica de una molécula está directamente ligada a sus niveles de energía, que a su vez están determinados por su estructura y composición química. El átomo o grupo de átomos en la cual se localiza, aproximadamente, la transición electrónica responsable de una determinada banda espectral de absorción se denomina cromóforo<sup>3</sup>. Los cromóforos absorben sólo las radiaciones de longitudes de onda tales que coinciden con la diferencia de energía entre sus orbitales ocupados y desocupados. En la mayoría de los casos se presentan sistemas cromofóricos por la conjugación de orbitales  $\pi$  en las moléculas o por la formación de complejos metálicos.

La luz absorbida por las moléculas puede ser emitida a través de dos procesos luminiscentes: la fluorescencia y la fosforescencia.<sup>4</sup> También existen diversos procesos no radiativos que le permiten a la molécula regresar al estado fundamental como son la relajación vibracional, la conversión interna (transición no radiativa entre estados del mismo espín inducida por colisiones) y el cruce de sistemas (figura 1.3). Estos procesos ocurren, por lo general, de forma más rápida que la emisión de fotones, por lo que es más probable que una molécula excitada vuelva al estado fundamental mediante mecanismos de desactivación no radiantes que radiantes.

---

<sup>3</sup> Otras definiciones de cromóforo que encontramos en la literatura son: (a) Entidad química que absorbe radiación en diferentes moléculas a casi la misma longitud de onda. Son cromóforos comunes en espectroscopia electrónica los grupos C=C, C=O, C=N o C=S. (J. Griffiths, *Colour and Constitution of Organic Molecules*, Elsevier, 1976). (b) Átomo o grupo de átomos de una molécula donde está localizada aproximadamente la transición electrónica responsable de una banda espectral determinada. (J. M. Costa, *Diccionario de Química Física*, Publicacions i edicions de la Universitat de Barcelona, 2005). (c) En la industria de colorantes se emplea para indicar el grupo de la molécula que origina el color del colorante. (Referencia idem. a la anterior)

<sup>4</sup> Cuando la transferencia de energía de la entidad molecular ocurre sin que cambie el espín del electrón (por ejemplo entre estados singletes) estamos ante un proceso fluorescente, si hay cambios de espín es un proceso fosforescente.



**Figura 1.3.** Diagrama parcial de energía para un sistema fotoluminiscente.

Cómo puede observarse en la figura, la fluorescencia se produce desde el nivel vibracional más bajo del estado excitado ( $S_1$ ) a los diferentes niveles vibracionales del estado fundamental ( $S_0$ ), por lo que generalmente la banda aparece a frecuencias menores que la de absorción. Este desplazamiento de la banda de fluorescencia, se conoce como desplazamiento de Stokes. En moléculas muy rígidas se puede observar como la banda de absorción y de fluorescencia son imágenes especulares una de la otra.

Para que ocurra la fluorescencia, el resto de mecanismos que compiten con ella en la relajación de la molécula deben actuar de forma ineficiente, o sea, deben tener una constante de velocidad desfavorable. El tiempo de vida del estado excitado debe permitir que la emisión de un fotón, por fluorescencia, que ocurre entre  $10^{-11}$  y  $10^{-7}$  segundos, sea posible. La fluorescencia está limitada a un número relativamente pequeño de sistemas que incorporan características estructurales determinadas y un entorno químico favorecedor de este proceso. Normalmente, en hidrocarburos aromáticos, la intensidad de fluorescencia aumenta con el número de anillos y con su grado de condensación. La fluorescencia más intensa y más útil es la que presentan los compuestos que contienen grupos funcionales aromáticos con transiciones de baja energía ( $\pi-\pi^*$ ).

La absorción de luz por parte de las moléculas se puede medir por la absorbancia ( $A$ ), que es proporcional a la concentración de la especie absorbente, en disoluciones diluidas. El equipo utilizado para las medidas de absorbancia es el espectrofotómetro.

En el caso de las especies fluorescentes se mide la emisión de energía radiante. La intensidad de la radiación emitida es cuantificada en los espectrofluorímetros y es

proporcional a la potencia radiante de la luz incidente y a la concentración de la especie emisora.

El desarrollo de sensores ópticos se basa en el uso de las sustancias que son capaces de absorber luz en la región visible y en aquellas que se desactivan por emisión fluorescente. Este tipo de compuestos tiene la capacidad de reconocer cuantitativamente la presencia de un determinado analito mediante cambios en sus propiedades ópticas.

## **1.2 Definición de sensor. Sensores químicos ópticos.**

Los sensores químicos se definen generalmente como dispositivos que informan de una transformación química mediante señales analíticas medibles.<sup>5</sup> El término quimiosensor, traducción libre del término ‘chemosensor’, ha sido definido como molécula de origen abiótico que señala la presencia de materia o energía.<sup>6</sup>

Cuando un determinado receptor está unido (mediante un enlace covalente o no) a otra agrupación química que es capaz de transformar el evento molecular de la coordinación del analito en una señal macroscópica fácilmente medible, estamos ante lo que denominaremos un sensor químico molecular.

Los sensores químicos se pueden clasificar, en base a sus tipos de respuesta en: térmicos, de masas, electroquímicos, magnéticos y ópticos. El objeto de estudio de este trabajo de investigación son los sensores ópticos.

Un sensor óptico consiste en una molécula que contiene una unidad coordinante, un cromóforo o fluoróforo, y un mecanismo de comunicación entre ambos.<sup>7</sup> La unión del analito al receptor produce cambios en las propiedades ópticas del sensor, absorción o fluorescencia, o en ambas.

Las principales ventajas que proporciona el uso de sensores ópticos son:

- Permiten la detección ocular.
- Requieren una instrumentación simple, asequible y económica.
- Métodos de detección no destructivos.
- Utilización de poca cantidad de muestra.
- Las medidas son llevadas a cabo en tiempo real.

---

<sup>5</sup> T. W. Bell, N. M. Hext, *Chem. Soc. Rev.*, 33, **2004**, 589.

<sup>6</sup> A. W. Czarnik, “*Advances in Supramolecular Chemistry*”, ed. G. W. Gokel, JAI Press, Greenwich, Connecticut, 3, **1993**.

<sup>7</sup> A. W. Czarnik, *Acc. Chem. Res.*, 27, **1994**, 302.

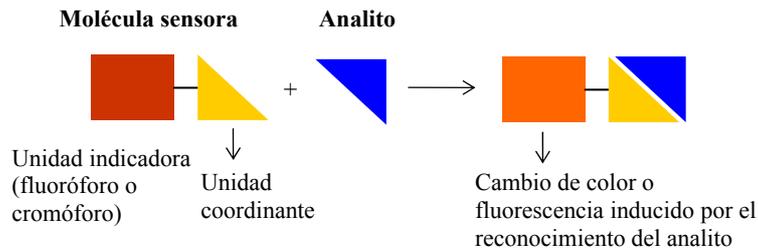
Los sistemas cromogénicos pueden ser empleados en el desarrollo de sistemas de determinación y detección rápida o en óptodos, donde el sensor cromogénico es sustentado sobre una superficie transductora de la señal (Ej. fibra óptica).

Los sensores fluorogénicos se caracterizan por su alta sensibilidad ya que son capaces de reconocer especies que se encuentran en disolución con una concentración hasta de  $10^{-8}$  M. Además por su elevada especificidad, pues en un sistema donde coexistan varias especies seleccionando la  $\lambda$  excitación/emisión se puede llegar al reconocimiento del analito de interés. Dichos sensores brindan una información multiparamétrica, pudiéndose observar en las mediciones cambios espectrales y de intensidad, también es posible medir tiempos de vida de fluorescencia.

Para el diseño de los sensores químicos se aplicarán los conceptos de química molecular y supramolecular, según si el proceso de reconocimiento provoca la formación de un enlace covalente o no. La unión del analito con el quimiosensor debe ocurrir de forma reversible. Esto permite medir la concentración del analito en el equilibrio, mediante las propiedades ópticas tanto del quimiosensor libre, como de la especie coordinada (quimiosensor-analito). Además se pueden realizar medidas en continuo con una respuesta óptica dinámica que varía con los cambios de concentración del analito.

Si el proceso de reconocimiento no es reversible ya no se podría hablar de sensor, por lo que se introduce el término dosímetro químico, para denominar a los reactivos que son capaces de realizar la detección selectiva de un analito de forma irreversible. Al estar basados en reacciones químicas irreversibles, los dosímetros químicos pueden ser usados sólo para una determinación, aquí radica su principal desventaja.

La mayoría de los sensores ópticos se basan en la aproximación unidad coordinante-unidad indicadora, donde el receptor puede estar unido a la unidad transductora de la señal directamente, mediante un grupo espaciador, o incluso pueden estar formando parte de la misma molécula (Figura 1.4).

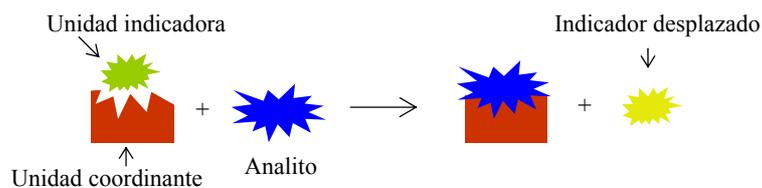


**Figura 1.4.** Aproximación unidad coordinante - unidad indicadora.

La unidad coordinante del sensor no tiene porqué ser de origen biológico, como sería el caso de una enzima o un anticuerpo, sino que puede ser un receptor artificial. Los receptores bióticos tienen de ventajoso su alta afinidad y selectividad por los analitos biológicos, pero en general las biomoléculas son sensibles al pH, a los agentes oxidantes y al calor, características que dificultan su uso práctico en el reconocimiento.

Los receptores artificiales poseen otras ventajas: pueden ser sintetizados con componentes más estables, diseñados para que coordinen a más de un analito y sus propiedades físicas son ajustables según los requerimientos específicos de cada caso. Al coordinar más débilmente con el analito que los naturales lo que se intenta es aumentar la fuerza de la interacción, para lograr una mayor afinidad por el analito de interés.

Los sensores moleculares también pueden ser diseñados de forma que la unidad coordinante no se encuentre unida covalentemente a la unidad indicadora, sino formando un complejo de coordinación. En este caso es posible la detección de un analito que forme con la unidad coordinante un complejo más estable que el complejo de partida. Esta aproximación se denomina sensores por desplazamiento, pues la unidad indicadora es desplazada del complejo que formaba con el receptor, en ausencia del analito, ver figura 1.5.



**Figura 1.5.** Esquema de sensores que funcionan por desplazamiento.

El concepto de sensores por desplazamiento lo encontramos en muchos biosensores que se basan en ensayos competitivos, antígeno-anticuerpo. Cuando se añade un determinado analito a este tipo de sensores, se produce un desplazamiento de la unidad indicadora a la disolución, debido a la formación del complejo más estable unidad coordinante-analito. Si las características espectroscópicas de la unidad indicadora, cuando está formando el complejo, y cuando se encuentra libre, son distintas, se obtiene una respuesta que puede ser indicativa de la presencia del analito. Se puede lograr cierta selectividad mediante una selección cuidadosa del complejo unidad coordinante-unidad indicadora. Este debe tener una constante de formación más alta que los complejos que pudiese formar la unidad coordinante con las posibles especies interferentes.

Otros sistemas usados en la detección óptica se basan en la aproximación del dosímetro químico. Aquí no se trata de desarrollar sistemas de coordinación altamente selectivos como en los casos anteriores, sino reacciones químicas específicas inducidas por el analito y que estén asociadas a un cambio de intensidad de la emisión fluorescente o del color. El término dosímetro químico hace referencia al efecto acumulativo en este tipo de reacciones generalmente irreversibles. Otro término que también se utiliza es el de reactivo fluoro- ó cromogénico.

### **1.3 Sensores fluorogénicos.**

La fluorescencia ha sido empleada como una herramienta muy versátil en campos como química analítica, bioquímica y biología celular. Se caracteriza por la emisión de un fotón en forma de transición radiante entre estados con el mismo número cuántico de espín. Normalmente todas las especies emiten radiación a longitudes de onda mayores que la empleada para la excitación. La variación en la intensidad de la fluorescencia tras el proceso de coordinación ha sido comúnmente utilizada como señal de respuesta en sensores moleculares.

La posición del máximo de fluorescencia puede verse afectada por cambios en la estructura molecular, ya que estos implican cambios en las energías de los estados fundamental y excitados. Además el disolvente juega un papel importante en la posición espectral y la intensidad de las bandas de fluorescencia. La excitación viene acompañada de una transición electrónica que implica un cambio en el momento dipolar de la molécula. El nuevo estado electrónico puede verse más o menos estabilizado que el estado fundamental en el disolvente correspondiente. El efecto es más acentuado cuando pasamos de un disolvente menos polar a uno más

polar, por lo que observamos cambios en la  $\lambda$  de emisión con la variación de la polaridad del disolvente. La formación de enlaces de hidrógeno en el estado excitado de menor energía también podría provocar una pérdida en la intensidad de fluorescencia. Todos estos factores hay que tenerlos en cuenta a la hora de diseñar un sensor fluorescente y al elegir el medio donde se va a realizar la determinación analítica.

Los mecanismos fotoluminiscentes que participan en la detección de los analitos en el caso de sensores fluorescentes son los que se mencionan a continuación:<sup>8</sup>

- Por transferencia de carga (CT).
  - Transferencia de carga interna (ICT).
  - Transferencia de carga Metal-Ligando (MLCT).
  - Transferencia interna de carga con torsión (TICT).
  - Transferencia de carga a través de los enlaces.
- Por transferencia electrónica fotoinducida (PET).
- Por formación/desaparición de exímeros.
- Por transferencia de energía electrónica (EET).
  - Transferencia de energía por resonancia (FRET o RET).
- Por transferencia de protón en el estado excitado (ESPT).

Existen múltiples descripciones y clasificaciones para sistemas fluorogénicos. Encontramos otros autores que dividen los sensores fluorogénicos por el efecto que provoca el reconocimiento: efectos de rigidez (observable en mecanismos del tipo MLCT), desplazamiento del disolvente, efecto del átomo pesado, activación de la fluorescencia por formación de complejos (chelation-enhanced fluorescente, CHEF) o desactivación de la fluorescencia por formación de complejos (chelation-enhanced quenching, CHEQ), entre otros. Pasaremos a describir algunos ejemplos de sensores fluorogénicos y los tipos de mecanismos involucrados en cada caso.

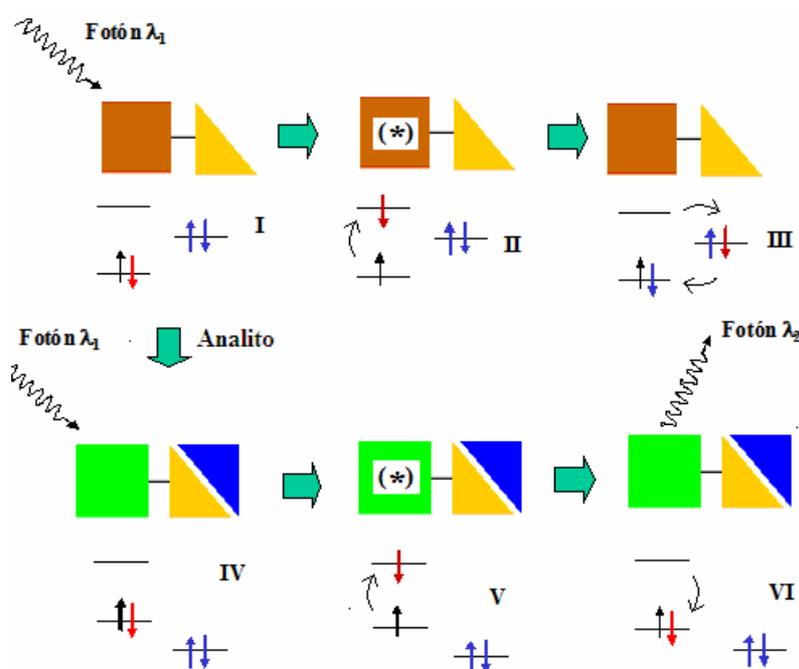
Lo más frecuente es el uso de receptores que están diseñados para que la coordinación module procesos de *transferencia electrónica fotoinducida* (photo-induced electron transfer, PET). Se denomina de esta manera a la transferencia electrónica que resulta de un estado electrónico producido por una interacción

---

<sup>8</sup> (a) A. P. de Silva, H. Q. N. Gunaratne, T. Gunnlaugsson, A. J. M. Huxley, C. P. McCoy, J. T. Rademacher, T. E. Rice, *Chem. Rev.*, 97, 1997, 1515. (b) B. Valeur, I. Leray, *Coord. Chem. Rev.* 205, 2000, 3.

resonante de radiación electromagnética con materia.<sup>9</sup> Este proceso de modulación se representa en la figura 1.6. En este esquema, la molécula I es excitada con luz, lo que consigue promover un electrón desde el orbital molecular ocupado de más alta energía (HOMO) al orbital molecular no ocupado de más baja energía (LUMO) para dar el estado excitado II. Sobre este esquema básico de orbitales moleculares puede suceder que un orbital de otra parte de la molécula, por ejemplo del centro coordinante, o de otra entidad molecular tenga una energía entre el HOMO y el LUMO del fluoróforo. Desde este orbital ajeno al fluoróforo se puede producir una transferencia electrónica fotoinducida al HOMO del fluoróforo. Una nueva transferencia electrónica desde el LUMO del fluoróforo al orbital externo restaura el estado fundamental (III).

Siguiendo esta secuencia (I→III) se produce una desactivación del estado excitado de forma no radiante. Lo que se observa a nivel macroscópico es una baja intensidad de emisión o ausencia total de fluorescencia.



**Figura 1.6.** Esquema del reconocimiento molecular mediante transferencia electrónica fotoinducida.

<sup>9</sup> J. L. Bourdelande, S. Nonell, A. U. Acuña, R. Sastre, "Glosario de términos usados en fotoquímica". 2ª edición. Universitat Autònoma de Barcelona, Servei de Publicacions Bellaterra, 1999.

### *Introducción.*

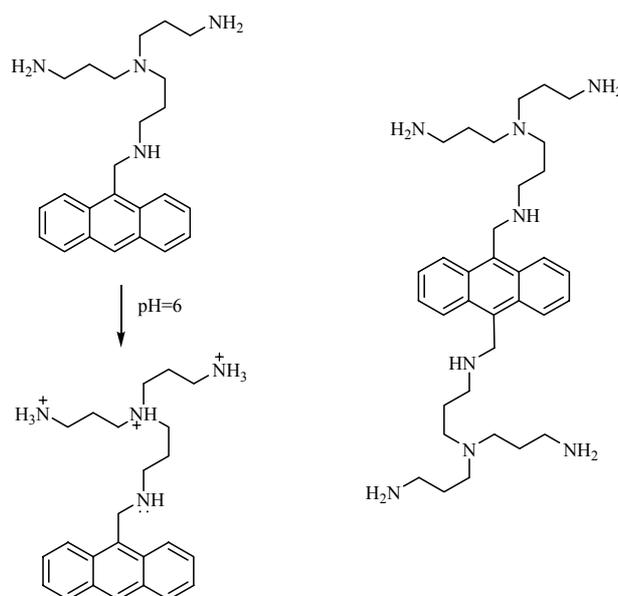
En el esquema de la figura 1.6 el orbital ajeno al fluoróforo que induce la desactivación no radiante pertenece al sistema coordinante. Cuando se produce la coordinación con un determinado analito (IV) se reordenan los niveles energéticos de los orbitales del receptor. Si el sistema está diseñado adecuadamente, la coordinación hará que el orbital externo que se situaba entre el HOMO y el LUMO del fluoróforo disminuya su energía. En presencia del analito, el complejo IV al absorber luz pasa al estado excitado V, ahora no es posible un mecanismo de desactivación por transferencia de electrones, por lo que el complejo excitado V es capaz de pasar al estado fundamental VI emitiendo radiación fluorescente. Lo que se observa a nivel macroscópico es un cambio de la intensidad de emisión, indicativa de la presencia del analito y proporcional a la concentración de este.

El primer sensor fluorogénico para aniones que funciona por el mecanismo de *transferencia electrónica fotoinducida* fue descrito por M. E. Huston, E. U. Akkaya y A. W. Czarnik.<sup>10</sup> En este caso las moléculas sensoras estudiadas fueron antrilpoliaminas, a pH 6 tres de los grupos amino que forman parte de la estructura se encuentran protonados y uno de ellos libre (el más cercano al antraceno), el cuál es el causante de la desactivación de la fluorescencia (Figura 1.7). En presencia de oxoaniones (como ATP, fosfato, sulfato, citrato, acetato), los grupos amino protonados son capaces de formar complejos y ocurre una transferencia protónica del anión al grupo amino libre, provocando un aumento de la fluorescencia, que los autores describen como efecto CHEF. Se considera que un sistema PET “off-on” donde la relación de aumento de la fluorescencia sea del doble al producirse la coordinación ya es útil para su utilización como sensor<sup>11</sup> y en este caso tenemos aumentos de más de 6 veces en la intensidad de la fluorescencia en presencia de algunos de los aniones.

---

<sup>10</sup> M. E. Huston, E. U. Akkaya, A. W. Czarnik, *J. Am. Chem. Soc.*, 111, **1989**, 8735.

<sup>11</sup> J. F. Callan, A. P. de Silva, D. C. Magri, *Tetrahedron.*, 61, **2005**, 8551.



**Figura 1.7.** Moléculas sensoras utilizadas en el reconocimiento de oxoaniones.

Estos mismos autores fueron los primeros en describir esta activación o aumento de la fluorescencia por formación de complejos (efecto CHEF) causada por la presencia de cationes.<sup>12</sup> En este caso el sistema utilizado para la detección también estaba basado en poliaminas unidas al antraceno.

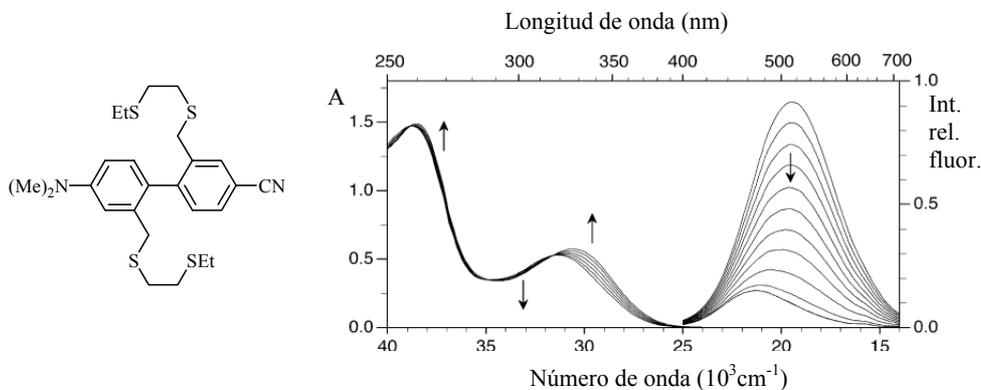
Como ejemplo de sensor dónde actúa un mecanismo de *transferencia de carga* podemos poner el diseñado por Cody y colaboradores<sup>13</sup> para la detección de Cu(I). Un sistema altamente selectivo al cobre se obtiene integrando el 4-dimetilamino-4'-cianobifenilo con un grupo receptor rico en electrones, los tioéteres. El grupo bifenilo sustituido con un grupo electrodonador y uno electroceptor actúa como fluoróforo, presentando una emisión por transferencia de carga intramolecular, la cual es muy sensible a cambios conformacionales en el ángulo de torsión interanular. Con la coordinación del catión el ligando sufre un gran cambio conformacional que provoca el desplazamiento hipsocrómico de la banda de transferencia de carga fotoinducida (Figura 1.8). Mientras que el ligando libre muestra en el estado fundamental una equilibrada distribución de sus rotámeros, el Cu(I) impone una conformación más cerrada que resulta en una geometría más plana con respecto a los dos anillos aromáticos. En la especie coordinada la

<sup>12</sup> M. E. Huston, K. W. Haider, A. W. Czarnik, *J. Am. Chem. Soc.*, 110, **1988**, 4460.

<sup>13</sup> J. Cody, C. J. Fahrni, *Tetrahedron*, 60, **2004**, 11099.

## Introducción.

relajación rotacional se ve inhibida y hay menor distorsión geométrica por lo que se observa la banda desplazada hipsocrómicamente. La disminución en la intensidad de la banda puede deberse a la formación de un nuevo estado excitado no emisor al cual se accede por transferencia reductiva de un electrón del Cu(I) al fluoróforo bifenilo.



**Figura 1.8.** Reconocimiento de Cu(I). En la gráfica a la izquierda se representa la absorción y a la derecha la emisión de fluorescencia cuando el ligando ( $100 \mu m$  en EtOH) es valorado con alícuotas 0.1 M de  $[Cu(CH_3CN)_4]PF_6^-$ .

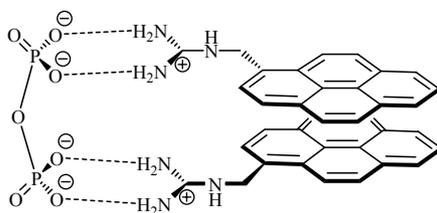
Para indicar cambios relacionados con la polaridad del medio y la acidez comúnmente se han utilizado sistemas fluorescentes basados en el mecanismo de *transferencia interna de carga con torsión* (TICT). Este término fue acotado para describir el rotamerismo que existe en numerosos compuestos del tipo dador-aceptor donde el estado excitado  $\pi-\pi^*$  inducido por la absorción de la luz es mucho más polar que el estado fundamental.<sup>14</sup> El mecanismo está bien estudiado en moléculas aromáticas que tienen sustituyentes electrodonadores y electroaceptores en posiciones conjugadas (el prototipo es el *p*-(dimetilamino)benzonitrilo) y ocurre principalmente en disolventes polares, caracterizándose por un gran desplazamiento de Stokes. El estado excitado que se produce inicialmente es plano, responsable de la emisión en solventes inertes, pero en medios con gran capacidad de solvatación, si no hay restricción en la rotación alrededor del enlace C-N entre el grupo amino y el anillo bencénico, ocurre una transferencia de carga intramolecular apareciendo un estado excitado torsionado altamente polar. La aparición de este estado excitado provoca un desplazamiento hipsocrómico de la

<sup>14</sup> W. Rettig, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 25, 1986, 971.

banda y la pérdida de su intensidad por relajación al estado fundamental mediante mecanismos no radiativos, debido a la perpendicularidad en que se encuentran los grupos dador y aceptor que hacen que la transición electrónica al estado fundamental esté prohibida por simetría.

Otro mecanismo generador de señal utilizado en el diseño de sensores fluorogénicos es la *formación de excímeros*. Un excímero es un dímero excitado electrónicamente, “no enlazante” en el estado fundamental.<sup>9</sup> Por ejemplo, un complejo formado por la interacción de una entidad molecular excitada con otra especie de la misma estructura en su estado fundamental.

Los excímeros presentan bandas de emisión desplazadas hacia el rojo (emisión del excímero) cuando se compara con la emisión del propio fluoróforo (emisión del monómero) y en numerosos casos se observan las dos emisiones (del monómero y del excímero) a la vez. Así la formación o ruptura de excímeros, como resultado de la adición de un analito, sirve para detectar la presencia del mismo. Los excímeros se forman de manera habitual cuando, (i) se emplean fluoróforos aromáticos y planos (como por ejemplo hidrocarburos aromáticos policíclicos tales como el pireno y el antraceno) y (ii) cuando dos unidades del fluoróforo estén próximas en el espacio y sean capaces de dar interacciones (generalmente de  $\pi$ -stacking), necesarias para la formación del excímero. Un ejemplo de cambio de fluorescencia de un sensor debido a la formación de excímeros al coordinarse con un analito es el estudiado por Nishizawa y colaboradores.<sup>15</sup> En este caso se observa que el monómero de pireno en metanol posee una banda de emisión ancha centrada a 400 nm. En presencia de pirofosfato ( $P_2O_7^{4-}$ ), aparece una banda estructurada a 476 nm debido a la formación del excímero del complejo formado al coordinarse este anión, figura 1.9.



**Figura 1.9.** Formación de un excímero en presencia de una especie determinada ( $P_2O_7^{4-}$ ).

<sup>15</sup> S. Nishizawa, Y. Kato, N. Teramae, *J. Am. Chem. Soc.*, 121, **1999**, 9463.

Los sistemas que se basan en el mecanismo de *transferencia de energía electrónica* (EET) están compuestos por dos o más moléculas de fluoróforos diferentes enlazadas mediante grupos espaciadores saturados. La mayoría de ellos se basan en los cambios conformacionales que ocurren con la coordinación de un analito.<sup>8a</sup> Como la energía de un sistema siempre tiende a disminuir, un estado excitado de mayor energía le donará su excitación a un estado excitado de menor energía. Así, el mecanismo de EET consiste en el proceso fotofísico por el que un estado excitado de una entidad molecular (el dador) se desactiva a un estado electrónico de menor energía mediante la transferencia de su energía a una segunda entidad molecular (el aceptor) la cual pasa a un estado de mayor energía.

Cuando los dos estados excitados (el de mayor y el de menor energía) pertenecientes a cada uno de los fluoróforos que forman parte del receptor se encuentran a una distancia mayor que 0.5 nm, los dipolos de ambos pueden interactuar. Esta interacción da lugar al proceso que se conoce como Transferencia de energía por resonancia de Förster (FRET).<sup>16</sup> Si la coordinación del analito provoca que los fluoróforos se acerquen, la excitación a la longitud de onda característica de uno de ellos puede causar la emisión del otro fluoróforo. Midiendo la relación entre las bandas de ambos fluoróforos podemos saber la proporción de receptor que se encuentra formando parte de la entidad de coordinación y por lo tanto la cantidad de analito presente.

Un ejemplo de sensor fluorescente basado en el concepto de FRET es reportado por Albers y colaboradores.<sup>17</sup> Ellos utilizan un receptor compuesto por un grupo cumarina dador, y una fluoresceína funcionalizada con ésteres borónicos que actúa como fluoróforo aceptor, unidos por un espaciador rígido, para el reconocimiento de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). En ausencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, y debido a la presencia de los ésteres borónicos que bloquean los hidroxilos de la fluoresceína, el grupo aceptor adopta una forma cerrada, incolora y no fluorescente. En este caso el solapamiento entre la emisión de la cumarina y la absorción de la fluoresceína está minimizado, por lo que no se observan procesos FRET y sólo se observa la banda de emisión azul de la cumarina al ser excitada la molécula. Al adicionar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se

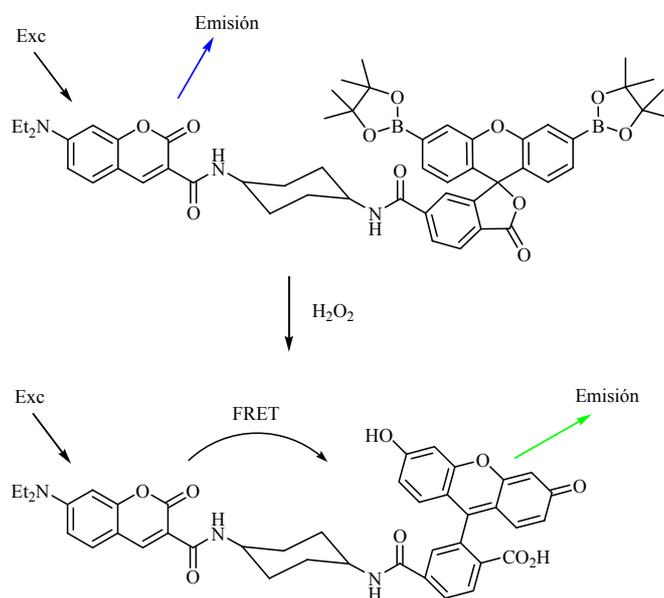
---

<sup>16</sup> Transferencia de excitación de Förster (transferencia de excitación por interacción dipolodipolo).

Mecanismo de transferencia de energía de excitación entre entidades moleculares separadas por distancias que exceden considerablemente la suma de sus radios de van der Waals. Se describe en términos de una interacción entre momentos dipolares de transición (mecanismo dipolar).(Referencia 9)

<sup>17</sup> A. E. Albers, V. S. Okreglak, C. J. Chang, *J. Am. Chem. Soc.*, 128, **2006**, 9640.

rompen los ésteres borónicos y la fluoresceína muestra una fuerte absorción en la región en la que emite la cumarina, por lo que al excitar la cumarina se observa la emisión verde de la fluoresceína. Los cambios en la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  pueden ser medidos por la relación existente entre las bandas de emisión de ambos fluoróforos.



**Figura 1.10.** Molécula compuesta por dos fluoróforos que es capaz de cuantificar  $\text{H}_2\text{O}_2$  mediante un mecanismo de FRET.

La *transferencia de protón en el estado excitado* (ESPT) es un mecanismo de fluorescencia que ha comenzado a ser utilizado recientemente para el reconocimiento de especies aniónicas. Es bien conocido que las moléculas cambian sus propiedades, con respecto a las que poseen en el estado fundamental, cuando se encuentran en estados electrónicos excitados debido al cambio en la distribución de la densidad de carga con la excitación. Muchos sistemas aromáticos sustituidos por grupos con capacidad para formar enlaces de hidrógeno presentan, cuando se encuentran en disolventes polares próticos, una segunda banda de fluorescencia caracterizada por un gran desplazamiento de Stokes, la cual es atribuida a un fototautómero creado por la transferencia de protones en el estado excitado singlete.<sup>18</sup> Para otras moléculas donde no aparece esta segunda banda en

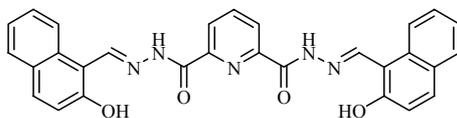
<sup>18</sup> J. Herbich, J. Dobkowski, R. P. Thummel, V. Hedge, J. Waluk, *J. Phys. Chem. A.*, 101, 1997, 5839.

disolventes alcohólicos, la ESPT ha sido postulada sobre la base de la gran desactivación de la fluorescencia observada, pues el movimiento cooperativo de protones favorece la conversión interna como mecanismo de relajación.

La eficiencia de la ESPT depende de la viscosidad del disolvente, ya que, antes de que ocurra la translocación del protón en el estado excitado, es necesaria una reorientación del disolvente para lograr una geometría favorable para la transferencia protónica. Esta reacción por lo general se observa a bajas temperaturas y en disolventes de baja viscosidad.

Las moléculas que sufren un aumento de su acidez en el estado excitado son llamadas fotoácidos. El 1-naftol es un ejemplo de fotoácido y debido a esta propiedad es posible mediante su incorporación en polímeros de polivinilalcohol, conocer la hidratación de estos.<sup>19</sup> La pérdida de la intensidad de fluorescencia de la forma neutra del naftol (1-ROH\*) y el aumento de la banda correspondiente a la forma aniónica (1-RO\*) son sensibles a la hidratación del polímero.

Por su parte Zhao y colaboradores<sup>20</sup> estudiaron un derivado del 1-naftol (la hidrazona del ácido bis(2-hidroxi-1-naftaldehído)-2,6-piridinodicarboxílico, figura 1.11) para el reconocimiento selectivo de fluoruro. Además del fluoruro ensayaron aniones como el fosfato, nitrato y sulfato. Este receptor fluorescente es capaz de coordinar aniones por formación de enlaces de hidrógeno y señalar el reconocimiento mediante un mecanismo de transferencia protónica en el estado excitado. En los enlaces de hidrógeno participan el NH del grupo amida y el OH de los anillos de naftaleno, la acidez de los protones de estos grupos aumenta drásticamente con la foto-excitación haciendo posible la ESPT.



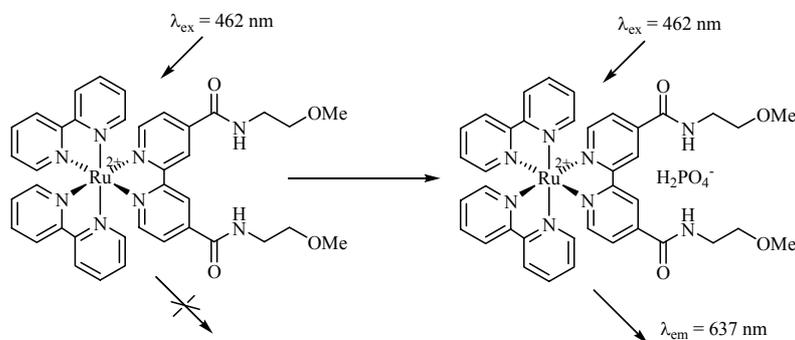
**Figura 1.11.** Ejemplo de sensor fluorescente por ESPT.

Otro factor que ha sido propuesto para explicar variaciones en la intensidad de la emisión fluorescente son los denominados *efectos de rigidez*. Aunque es un mecanismo que ciertos autores no aceptan como tal, ha sido ampliamente utilizado como argumento para justificar aumentos de fluorescencia producidos por la

<sup>19</sup> A. C. Kumar, A. K. Mishra, *Talanta*, 71, **2006**, 2003.

<sup>20</sup> Y.-G. Zhao, B.-G. Zhang, C.-Y. Duan, Z.-H. Lin, Q.-J. Meng, *New. J. Chem.*, 30, **2006**, 1207.

coordinación en ciertos receptores fluorogénicos. La explicación subyacente es que como consecuencia de la coordinación del analito se incrementa la rigidez del complejo formado, lo que hace menos probable la desactivación no radiante del estado excitado dando lugar a aumentos en la intensidad de emisión. Muchos de los sistemas descritos basados en este concepto utilizan el complejo  $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$  como unidad generadora de señal acoplada covalentemente a determinados grupos coordinantes de aniones. En estos sistemas, se observa generalmente un aumento de la emisión fluorescente tras el proceso de coordinación. Un ejemplo se muestra en la figura 1.12, donde el reconocimiento se realiza con un complejo que contiene unidades amida como sitios de coordinación de aniones.<sup>21</sup> La banda de emisión del complejo muestra un aumento de la intensidad tras la adición del anión dihidrógeno fosfato o cloruro en dimetilsulfóxido. El aumento de la intensidad se atribuye a un efecto de rigidez que adopta el complejo (por ejemplo la coordinación de los aniones en las amidas impiden la libre rotación de estos grupos) en contraste con la falta de rigidez estructural del ligando libre.



**Figura 1.12.** Ejemplo de sensor fluorescente mediante cambio en la rigidez de la molécula al efectuar el reconocimiento.

#### 1.4 Sensores moleculares cromogénicos.

Los cambios de color han sido ampliamente utilizados en procesos de detección, pues requieren el uso de equipos y técnicas simples, y la detección puede ser realizada “a simple vista”. En la literatura encontramos muchas determinaciones analíticas en donde el último paso es la formación de un compuesto coloreado que

<sup>21</sup> F. Szemes, D. Heseck, Z. Chen, S. W. Dent, M. G. B. Drew, A. J. Goulden, A. R. Graydon, A. Grieve, R. J. Mortimer, T. J. Wear, J. S. Weightman, P. D. Beer, *Inorg. Chem.* **35**, **1996**, 5868.

T. Duff, A. Grüßing, J. L. Thomas, M. Duati, J. G. Vos, *Polyhedron* **22**, **2003**, 775.

es indicativo de la presencia de un determinado analito.<sup>22</sup> Estos métodos colorimétricos han sido extensamente empleados en la detección de iones y son la inspiración para el diseño de sensores cromogénicos.

Los compuestos coloreados presentan bandas de absorción en la zona comprendida entre aproximadamente 380 y 770 nm. En compuestos orgánicos se han realizado muchos estudios a fin de obtener correlaciones entre la estructura química de estos sistemas (colorantes) y el color que presentan. Así por ejemplo, está bien establecido que muchos colorantes tienen sistemas de enlaces conjugados que hacen que las diferencias en energías entre el HOMO y el LUMO correspondan exactamente a la zona visible del espectro. También se sabe que, comparando sistemas similares, cuanto más extendida está la conjugación en el sistema menor es la diferencia entre el estado fundamental y el excitado resultando en un desplazamiento de la banda de absorción hacia longitudes de onda mayores (desplazamiento batocrómico). Adicionalmente, sobre la base de un sistema conjugado existe una forma química de modificar la longitud de onda donde aparece la banda de absorción, mediante el anclaje de grupos electrodonadores (NR<sub>2</sub>, NHR, NH<sub>2</sub>, OH, OMe, O<sup>-</sup>, X<sup>-</sup>, etc.) o electroaceptores (NO<sub>2</sub>, HSO<sub>3</sub><sup>-</sup>, SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, COOH, C=O, etc.).

En el desarrollo de sensores cromogénicos está ampliamente estudiado el uso de complejos metálicos como unidades indicadoras. Una característica especial de los metales de transición es la presencia de orbitales *d* parcialmente ocupados. Se puede decir que en general los diagramas de orbitales moleculares de complejos metálicos están compuestos por orbitales *d* parcialmente ocupados principalmente localizados en el metal y orbitales confinados en los ligandos, tanto ocupados (enlazantes) como no ocupados (antienlazantes).

En estos sistemas, producto de la excitación con luz se pueden observar varios tipos de transiciones:

- Transiciones *d-d* que involucran un salto electrónico entre orbitales *d* del metal.
- Bandas de transferencia de carga metal-ligando (MLCT de metal to ligand charge transfer) o ligando-metal (LMCT de ligand to metal charge transfer) que implican una transferencia de electrones desde orbitales llenos del ligando a orbitales *d* no ocupados del metal (bandas MLCT) o viceversa.

---

<sup>22</sup> (a) E. B. Sandell, H. Onishi, *Colorimetric Detection of Traces of Metals*, 4ta ed. New York: Interscience, **1978**. (b) D. F. Boltz, J. A. Howell, *Colorimetric Determination of Nonmetals*, 2da ed., Eds. New York: Wiley, **1978**.

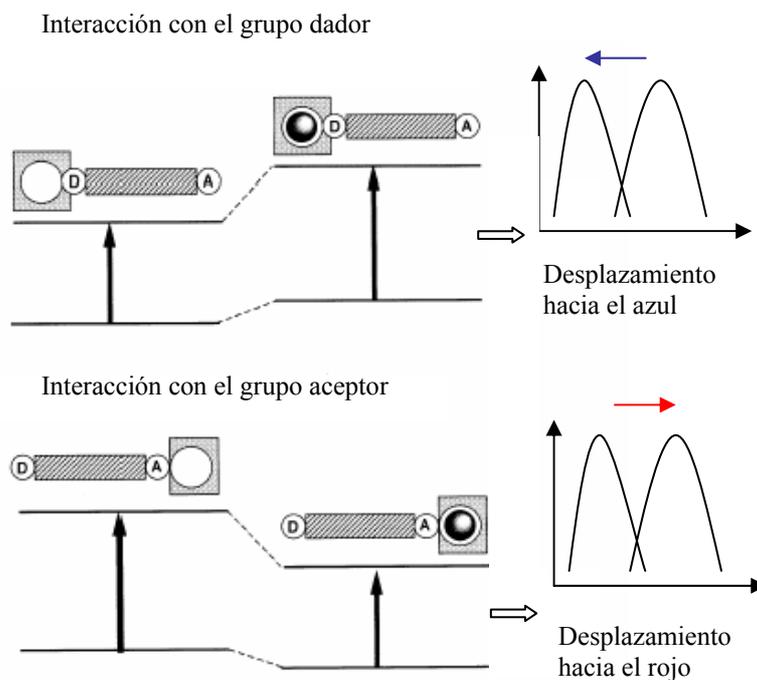
En relación a procesos de reconocimiento, la coordinación de ciertos aniones con el centro metálico de un complejo puede inducir la aparición de nuevas bandas de transferencia de carga, que cuando se localiza en la zona visible del espectro permiten el reconocimiento colorimétrico del anión.

#### **1.4.1 Cromóforos dador-aceptor.**

Cuando en una misma entidad molecular existe un grupo dador y uno aceptor conectados electrónicamente por un sistema de enlaces conjugados, se puede observar una banda, generalmente intensa, denominada banda de transferencia de carga. Esta banda corresponde a una transición en donde, tras excitar con luz, hay una importante fracción de carga electrónica que se transfiere desde el dador hasta el aceptor.

Lo que resulta importante desde el punto de vista del diseño de sensores es que la interacción de un analito con el grupo dador o aceptor puede afectar a la posición de la banda de transferencia de carga y, como resultado, producir una variación del color.

Para comprender a nivel electrónico que ocurre cuando este tipo de cromóforos se utiliza para el reconocimiento de otras especies podríamos analizar como sería su interacción con especies catiónicas. Los cambios fotofísicos que ocurren con la coordinación del catión pueden ser descritos en términos de interacción carga-dipolo. Si consideramos sólo el caso en que el estado excitado tiene un momento dipolar mayor que el estado fundamental, observamos que cuando el catión interactúa con el grupo dador este es desestabilizado en un mayor grado que el aceptor, ocurriendo un desplazamiento hipsocrómico (hacia el azul) en el espectro de absorción y emisión. Mientras que si el catión interactúa con el grupo aceptor, el estado excitado está ahora más estabilizado que el fundamental, lo cual provoca un desplazamiento batocrómico (hacia el rojo) de la banda de absorción y emisión del cromóforo (figura 1.13).



**Figura 1.13.** Interacción de los cromóforos dador-aceptor con un catión.

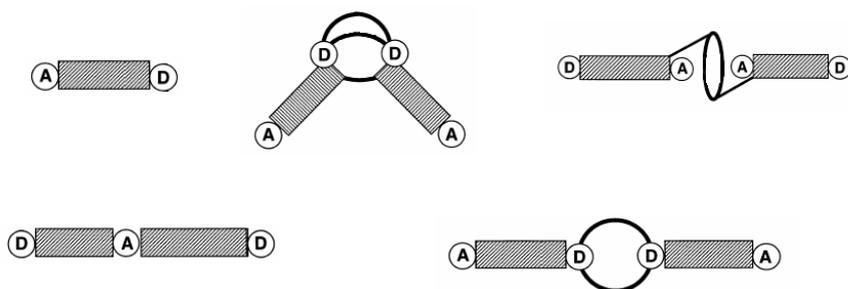
Los estados excitados de transferencia de carga difieren marcadamente del estado fundamental del que se originan, tanto en su estructura electrónica como en la geometría molecular.<sup>23</sup> Las moléculas que contienen sistemas dador-aceptor tienen una libertad limitada para adaptarse a la distribución de densidad electrónica provocada por la transferencia de carga intramolecular.

La mayoría de los colorantes conocidos están compuestos por este sistema que consiste en grupos electrodonadores y electroaceptores unidos por puentes insaturados conjugados, que pueden ser cadenas polimetínicas acíclicas o cíclicas, aromáticas, o combinaciones de estas.<sup>24</sup> También en muchos casos encontramos el

<sup>23</sup> Z. R. Grabowski, K. Rotkiewicz, *Chem. Rev.*, 103, **2003**, 3899.

<sup>24</sup> A.T. Peters, H.S. Freeman, *Advances in colour chemistry series. Vol.3 Moderns Colorants: Synthesis and Structure*, Chapman & Hall, **1995**.<sup>25</sup> Transición de transferencia de carga (TC). Transición electrónica en la cual una fracción importante de una carga electrónica se transfiere de modo intramolecular desde una región, denominada “dadora de electrón”, a otra, denominada “aceptora de electrones”, (TC intramolecular), o bien de modo intermolecular, desde una entidad molecular a otra (TC intermolecular). Es típica en complejos dador-aceptor o en entidades moleculares multicromofóricas. En algunos casos

grupo aceptor y el dador unidos directamente, o sea funcionan como puentes ellos mismos. Algunas de las geometrías más usuales en que encontramos estos cromóforos se muestran en la figura 1.14.<sup>8</sup>



**Figura 1.14.** Geometrías usuales de los cromóforos dador-aceptor.

Estos sistemas tienen en común que en el estado fundamental hay un cierto grado de polarización de la nube  $\pi$ , del grupo dador al aceptor. Usualmente la absorción de luz está acompañada de una mayor migración de la densidad electrónica en esta dirección, reportándose muchas veces que esta transición tiene carácter de transferencia de carga.<sup>25</sup>

En algunos casos es tan fuerte la interacción entre el grupo dador y el aceptor en el estado fundamental que el grupo dador pasa a tener mayor deficiencia electrónica que el aceptor, y la absorción de la luz puede resultar en un flujo de densidad electrónica en la dirección inversa.

En el diseño de cromóforos dador-aceptor se pueden utilizar diferentes estrategias para optimizar el corrimiento batocrómico, o sea para lograr que la banda de absorción molecular se encuentre desplazada hacia el rojo. Se intenta asegurar que si la interacción como molécula sensora se produce con una especie que provoca un desplazamiento hipsocrómico de la banda, el cambio de color pueda ser observado a simple vista.

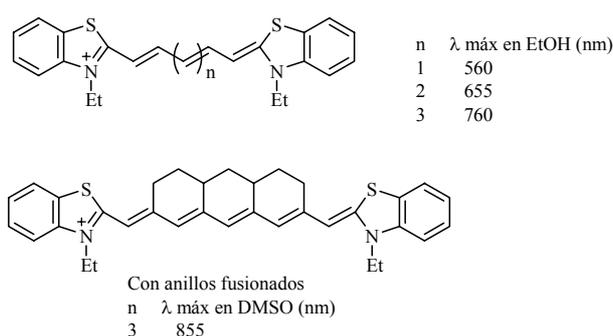
---

la banda de absorción de transferencia de carga puede estar enmascarada por las de absorción de los componentes. (según referencia 9)

## Introducción.

Una de las formas más usuales de lograr desplazamientos batocrómicos de las bandas de absorción es realizar modificaciones estructurales en el puente conjugado de la molécula cromófora. Para ello en algunos casos basta con incrementar la longitud del puente conjugado introduciendo cadenas carbonadas insaturadas. Aunque este aumento en la extensión de la conjugación trae aparejado un aumento de la asimetría electrónica que es contraproducente. Vemos que cuando el puente que une el grupo dador con el aceptor se alarga mucho (6 o más grupos carbonos) la banda de absorción comienza a parecer muy ancha y baja su intensidad. Aquí se combinan varios fenómenos: aumenta la probabilidad de que ocurra isomería cis-trans, hay una pérdida de la planaridad de la molécula y aumenta la probabilidad de formación de agregados. Además la molécula se hace más inestable frente a la luz y el calor y por su gran tamaño, más insoluble en los disolventes orgánicos comunes y en matrices poliméricas, lo que restringe mucho sus aplicaciones prácticas.

Una solución eficaz para aumentar la longitud del puente conjugado sin que se presenten estas desventajas es introducir grupos cíclicos, que provocan un aumento en la rigidez del sistema. En la siguiente figura se muestran moléculas con similitudes estructurales, dónde sólo se han efectuado cambios en el puente conjugado.<sup>26</sup> Es de destacar que la molécula con anillos fusionados en el puente es la que presenta la banda más desplazada hacia el rojo.



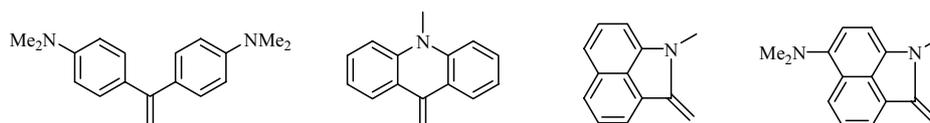
**Figura 1.15.** Efecto del aumento en la longitud del puente conjugado en cromóforos dador-aceptor.

Las modificaciones estructurales en la cadena conjugada que pueden ocasionar corrimientos batocrómicos incluyen la introducción de grupos electrodonadores o electroaceptores en ciertas posiciones de la cadena, para ello la modelización

<sup>26</sup> G. Heilig, W. Lüttke, *Chem. Ber.*, 119, **1986**, 3102.

usando la teoría de perturbación de los orbitales moleculares (PMO) puede ser de gran ayuda, un ejemplo son los colorantes cianínicos en que las predicciones de cálculos mecánico-cuánticos resultan muy acertadas. También podría efectuarse la sustitución de átomos por otros más o menos electronegativos, como puede ser un C por un N, y la introducción de otras insaturaciones en ciertas posiciones de la cadena.

Otra estrategia seguida es el incremento de la fuerza donante del grupo dador del cromóforo. Para ello se pueden incorporar grupos como los que se muestran en la figura 1.16.



**Figura 1.16.** Grupos con gran potencial electrodonador.

Iguales resultados se obtienen con el incremento de la fuerza aceptora del grupo aceptor. Aunque analizando grupos que por separado tienen gran capacidad electroaceptora, como el nitro y el trifluorsulfónico, vemos que al ser introducidos en sistemas cromóforos dador-aceptor no producen un desplazamiento batocrómico evidente y la polisustitución con estos es, en la mayoría de los casos, ineficaz. El requerimiento estérico que presentan algunos grupos, causa una pérdida en la planaridad de las moléculas, lo que disminuye el efecto espectroscópico esperado. El grupo que sí puede ser utilizado con este fin, incluso en sistemas multisustituídos, es el grupo ciano, por su forma cilíndrica y su poco requerimiento estérico. Este grupo es considerado una unidad aceptora muy efectiva, a pesar de que su constante de sustitución de Hammett<sup>27</sup> no es tan alta como la de otros grupos electroaceptores.

Los residuos neutros electroaceptores más poderosos para diseñar cromóforos dador-aceptor con absorción a altas longitudes de ondas se basan en sistemas policianínicos como los que se muestran a continuación (figura 1.17).

<sup>27</sup> La Constante de Sustitución de Hammett ( $\sigma$ ) muestra la capacidad electrodonadora/electroaceptora de un sustituyente por su habilidad para dar o retirar electrones de un sitio de reacción y es independiente de la naturaleza del sitio de reacción. Da una medida total de los efectos electrónicos (inductivos y de resonancia). Un valor de  $\sigma$  alto implica un alto poder electroaceptor del grupo en particular. IUPAC Compendium of Chemical Terminology. 2da Edición, 1997.

## Introducción.

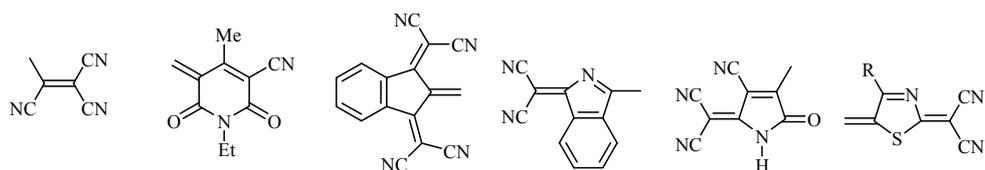
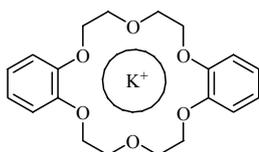


Figura 1.17. Grupos con gran potencial electroaceptor.

## 1.5 Detección de iones usando sensores ópticos.

En la literatura encontramos variados ejemplos de sensores cromogénicos utilizados en la detección de especies iónicas.<sup>28</sup> La mayoría de estos sensores, sobre todo en los inicios, estaban diseñados para el reconocimiento de cationes, ver figura 1.18. Los cationes son más pequeños y tienen energías de solvatación menores que los aniones. Además son especies que no están saturadas electrónicamente, por lo que van a interactuar eficazmente con cualquier receptor que sea rico en electrones.

Primer receptor para cationes metálicos  
descubierto por C. J. Pedersen.



Receptores para cationes desarrollados por  
M. Takagi y F. Vögtle respectivamente

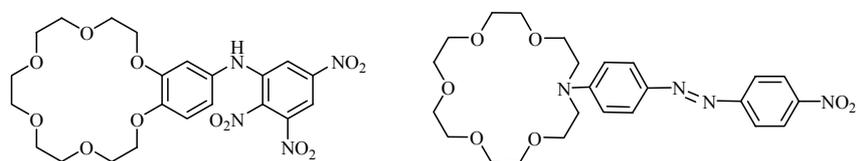


Figura 1.18. Ejemplos de sensores para cationes.

<sup>28</sup> (a) F. P. Schmitdchen, M. Berger, *Chem. Rev.*, 97, **1997**, 1609. (b) P. D. Beer, P. A. Gale, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 40, **2001**, 486. (c) Ikeda, A.; Shinkai, S. *Chem. Rev.* **1997**, 97, 1713. (d) C. Suksai, T. Tuntulani, *Chem. Soc. Rev.*, 32, **2003**, 192. (e) R. Martínez-Máñez, F. Sancenón, *Coord. Chem. Rev.*, 250, **2006**, 3081. (f) T. Gunnlaugsson, M. Glynn, G. M. Tocci, P. E. Kruger, F. M. Pfeffer, *Coord. Chem. Rev.*, 250, **2006**, 3094.

En la figura 1.18 se observan los primeros receptores sintetizados para cationes metálicos.<sup>29</sup> En 1967 C. J. Pedersen descubrió que el espectro UV del dibenzo-18-corona-6 cambiaba con la adición de cationes alcalinos.<sup>30</sup> Los primeros trabajos que describían un cambio de color selectivo fueron los de M. Takagi<sup>31</sup> y F. Vögtle.<sup>32</sup> En el caso del colorante diazónico este resultó ser selectivo a cationes bario (II), Vögtle y colaboradores llegaron a la conclusión de que el cambio de color que sufre el colorante con la adición de bario se debe a que este catión tiene el tamaño de la cavidad del ciclo y por su alta densidad de carga interacciona fuertemente con el par de electrones libres del nitrógeno.

Takagi y colaboradores, en los estudios llevados a cabo con el 4'-picrilaminobenzo-15-corona-5 que aparece en la figura, observaron que la selectividad en la extracción del  $K^+$  era 100 veces mayor que para el  $Na^+$  y 10 veces mayor que para el  $Rb^+$ . Las medidas de la absorbancia de este complejo a 560 nm fueron usadas para determinar  $K^+$  entre 10-400 ppm, comprobando que hasta 2000 ppm del catión  $Na^+$  no interferían en la determinación.

En gran parte de las moléculas sensoras las unidades coordinantes utilizadas para interactuar con las especies catiónicas son macrociclos que contienen heteroátomos (O, N, S). Otros sensores emplean diversos grupos como puede ser el carboxilato para realizar el reconocimiento. Por ejemplo para la detección de Cu(II) se han usado derivados de azobencenos como los que se observan en la figura 1.19.<sup>33</sup> En este caso se logra la determinación de Cu(II) a simple vista, a pH fisiológico y de forma reversible. Los autores proponen que en la coordinación del catión se ven involucrados el grupo metoxilos, los carboxilatos y el grupo amino, disminuyendo la capacidad de este último de participar en la banda de transferencia de carga interna del receptor, por lo que se produce el cambio de color.

---

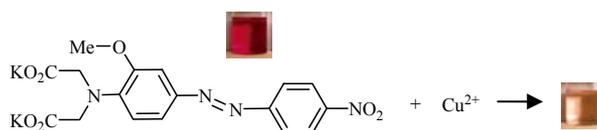
<sup>29</sup> H. S. Freeman, A. T. Peters, "Colorants for non-textile applications". *Cap.6: Functional Dyes for Molecular Recognition: Chromogenic and fluorescent receptors.* (M. Inouye) Elsevier, **2000**.

<sup>30</sup> C. J. Pedersen, *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, **1967**, 7017.

<sup>31</sup> M. Takagi, H. Nakamura, K. Ueno, *Anal. Lett.*, **10**, **1977**, 1115.

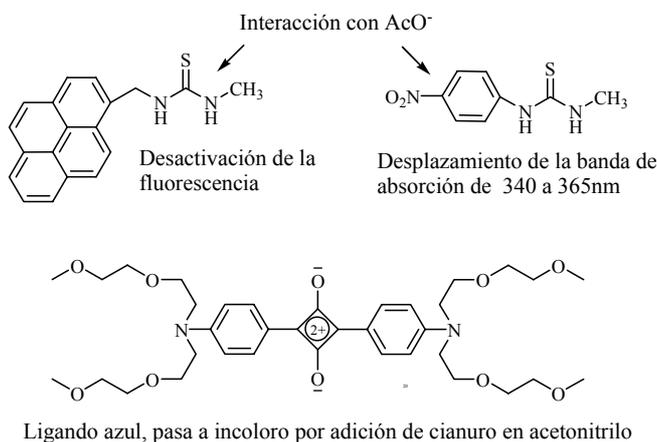
<sup>32</sup> J. P. Dix, F. Vögtle, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **17**, **1978**, 857.

<sup>33</sup> T. Gunnlaugsson, J. P. Leonard, N. S. Murray, *Org. Lett.*, **6**, **2004**, 1557.



**Figura 1.19.** Receptor del catión cobre (II).

La síntesis de receptores abióticos para especies aniónicas también es un campo de gran interés y en los últimos años han aparecido diversos trabajos en esta área.<sup>34</sup> Los aniones participan en innumerables procesos químicos y biológicos. Estos receptores para aniones son en general diferentes y habitualmente más complejos que los correspondientes receptores para cationes. Este hecho se debe a que los aniones presentan mayor complejidad estructural, pues adoptan distintas geometrías (esférica, tetraédrica, lineal, octaédrica, etc.), pueden cambiar de carga en función del pH del medio (ejemplo de ello son aniones como carbonato y fosfato) y son más grandes que los correspondientes cationes isoelectrónicos con lo que las interacciones electrostáticas son, en general, más débiles. Algunos ejemplos de estos receptores se muestran en la figura 1.20.



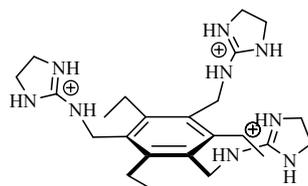
**Figura 1.20.** Moléculas utilizadas en el reconocimiento óptico de aniones.<sup>35,36,37</sup>

<sup>34</sup> (a) R. Martínez-Máñez, F. Sancenón, *Chem. Rev.*, 103, **2003**, 4419. (b) E. Bianchi, K. Bowman-James, E. García-España, *Supramolecular Chemistry of Anions*; New York: Wiley-VCH, **1997**.

<sup>35</sup> S. Nishizawa, H. Kaneda, T. Uchida, N. Teramae, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1998**, 2325.

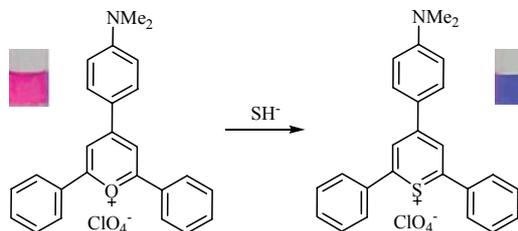
<sup>36</sup> S. Nishizawa, R. Kato, T. Hayashita, N. Teramae, *Anal. Sci.*, 14, **1998**, 595.

En diversos trabajos de Anslyn y colaboradores encontramos sensores para iones basados en el concepto de desplazamiento.<sup>38</sup> Uno de los más significativos es el reconocimiento de citrato usando como molécula receptora el 2,4,6-trietilbenceno sustituido con guanidinos, que inicialmente se encuentra formando un complejo con la 5-carboxifluoresceína (ver figura 1.21).<sup>39</sup> En presencia del anión citrato el indicador es desplazado a la disolución cambiando sus características espectrofotométricas, por lo que es fácilmente medible la cantidad de citrato presente.



**Figura 1.21.** Receptor que es capaz de reconocer citrato por desplazamiento de la 5-carboxifluoresceína.

Los dosímetros químicos se han empleado generalmente para la detección de aniones. En la figura 1.22 se muestra un ejemplo donde se aprovecha la reactividad de los derivados del 2,4,6-trifenilpirilio con diferentes nucleófilos, para llevar a cabo un ensayo colorimétrico capaz de cuantificar el anión sulfuro. El colorante disuelto en una mezcla de agua:acetonitrilo inicialmente presenta una banda de absorción alrededor de 540 nm, reacciona con el sulfuro para dar el correspondiente tiopirilio de color azul ( $\lambda_{\text{máx}}=580 \text{ nm}$ ).<sup>40</sup>



**Figura 1.22.** Reconocimiento colorimétrico del anión sulfuro por formación del tiopirilio.

<sup>37</sup> J. V. Ros-Lis, R. Martínez-Máñez, J. Soto, *Chem. Commun.* **2002**, 2248.

<sup>38</sup> S. L. Wiskur, H. Ait-Haddou, J. J. Lavigne, E. V. Anslyn, *Acc. Chem. Res.*, **34**, **2001**, 963.

<sup>39</sup> A. Metzger, E. V. Anslyn, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **37**, **1998**, 649.

<sup>40</sup> D. Jimenez, R. Martínez-Máñez, F. Sancenón, J.V. Ros-Lis, A. Benito, J. Soto, *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, **2003**, 9000.

También se han desarrollado dosímetros químicos donde el anión induce una reacción que da lugar a la liberación de una molécula con color o donde el anión cataliza una determinada reacción que está asociada a cambios espectroscópicos. El uso de estas reacciones inducidas por aniones tiene como principal ventaja el alto grado de selectividad alcanzado ya que si la reacción química está bien seleccionada, ésta sólo se produce en presencia de un determinada especie aniónica.

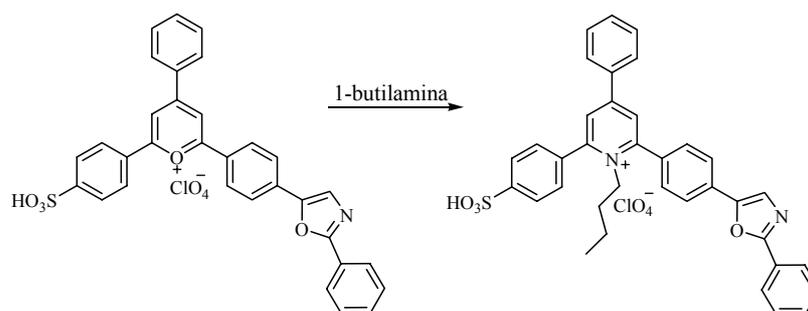
### **1.6 Sensores ópticos usados en la detección de moléculas neutras.**

En la naturaleza encontramos numerosas moléculas neutras que juegan un papel importante en procesos biológicos y medioambientales, por ello el diseño de sensores específicos para estas también es un campo de gran interés. Es difícil lograr el reconocimiento selectivo de especies neutras mediante la formación de complejos supramoleculares, o sea sin que se produzca un enlace covalente. Los sensores desarrollados hasta el momento se basan en una reacción química con alguno de los grupos funcionales presentes en la molécula receptora (dosímetros químicos), que en algunas ocasiones transcurren de manera reversible, aunque involucren la formación de un enlace covalente.

Uno de los primeros trabajos publicados usando el concepto de dosímetro químico es el de Katritzky y colaboradores en 1984,<sup>41</sup> que utilizan un derivado del perclorato de 2,4,6-trifenilpirilio soluble en agua que al reaccionar con la butilamina sufre un cambio en su banda de absorción que se desplaza de 330 a 314 nm y disminuye la intensidad de fluorescencia de la banda situada a 395 nm, lo cual permite la determinación de la cantidad de amina en disolución (ver figura 1.23).

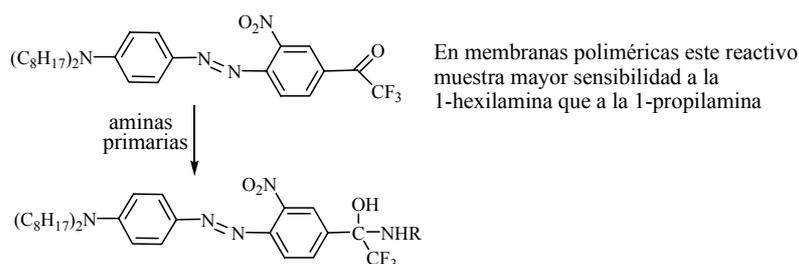
---

<sup>41</sup> A.R. Katritzky, O.A. Schwarz, A.E. Abdel-Rahman, D. E. Leahy, *J. Heterocycl. Chem.*, 21, **1984**, 1673.



**Figura 1.23.** Ejemplo de dosímetro químico cromo-/fluorogénico utilizado en la detección de aminas.

Diversos trabajos publicados por el grupo de G. Mohr<sup>42</sup> tienen como objetivo la detección de aminas y alcoholes. Para ello usan derivados de estilbeno y azobenceno funcionalizados el grupo trifluoracetilo el cual reacciona con las aminas y alcoholes para dar los correspondientes hemiaminales y hemiacetales que presentan características espectroscópicas distintas a las de los productos de partida. Variando las condiciones de medida y soportando los reactivos colorimétricos en diferentes membranas han logrado aumentar la selectividad frente a determinadas aminas, un ejemplo de estos reactivos se muestra en la figura 1.24.

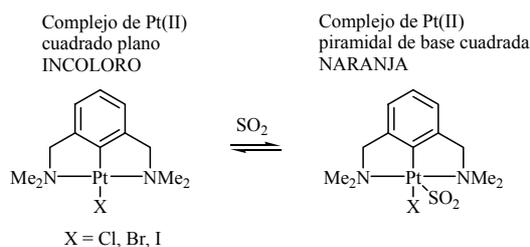


**Figura 1.24.** Uso de derivados coloreados del ácido trifluoracético en la detección de moléculas neutras.

<sup>42</sup> (a) G.J. Mohr, F. Lehmann, U.-W. Grummt, U.E. Spichiger-Keller, *Anal. Chim. Acta* 344, **1997**, 215. (b) G.J. Mohr, D. Citterio, U.E. Spichiger, *Sens. Actuators B* 49, **1998**, 226. (c) G.J. Mohr, *Anal. Chim. Acta* 508, **2004**, 233. (d) G.J. Mohr, M. Wenzel, F. Lehmann, P. Czerney, *Anal. Bioanal. Chem.* 374, **2002**, 399. (e) J. Sangster, *Octanol-Water Partition Coefficients: Fundamentals and Physical Chemistry*, Wiley-VCH, West Sussex, **1997**. (f) G.J. Mohr, U.E. Spichiger-Keller, *Anal. Chim. Acta* 351, **1997**, 189. (g) G.J. Mohr, U.E. Spichiger, *Mikrochim. Acta* 130, **1998**, 29. (h) G.J. Mohr, T. Nezel, U.E. Spichiger, *Anal. Chim. Acta* 414, **2000**, 181.

## Introducción.

A pesar de las características de los gases que hacen difícil su reconocimiento (moléculas neutras con interacciones electrostáticas poco efectivas, pequeño tamaño, dificultades técnicas en su manejo, polarizabilidad limitada) se han desarrollado sensores ópticos para algunos de ellos. Como ejemplo podríamos citar la detección de dióxido de azufre estudiada por Koten y colaboradores. El SO<sub>2</sub> reacciona con complejos incoloros de Pt(II) para dar lugar a aductos de color naranja.<sup>43</sup> La reacción es reversible y la transducción de la señal se realiza de forma instantánea. Como ventaja además se puede utilizar tanto en solventes apolares como en estado sólido, por lo que posibilitará el desarrollo de dispositivos optoelectrónicos para aplicaciones biomédicas y almacenamiento de SO<sub>2</sub>.

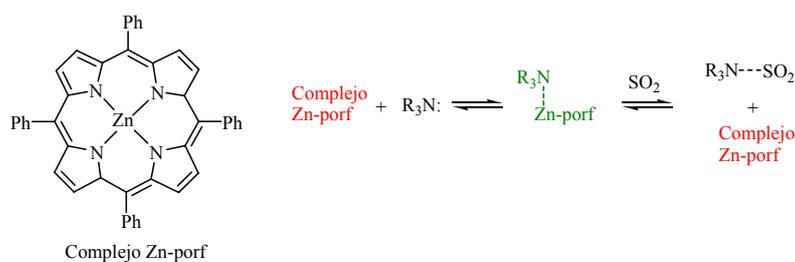


**Figura 1.25.** Detección óptica de dióxido de azufre.

El complejo de Zn-tetrafenilporfirina que se muestra en la figura 1.26 ha sido utilizado para ensayos de desplazamiento, aprovechando la capacidad de este de interaccionar con aminas cambiando de color de rojo a verde.<sup>44</sup> El complejo verde formado con aminas es capaz de detectar la presencia de dióxido de azufre debido a la formación del aducto amina-SO<sub>2</sub> que libera el complejo nuevamente, observándose ahora el cambio de color de verde a rojo, como se representa en la figura 1.26. Los autores realizaron este ensayo con varias aminas para estudiar la competencia del SO<sub>2</sub> con la porfirina y se logró la determinación selectiva de este gas en presencia de otros gases (CO<sub>x</sub>, NO<sub>x</sub> y mezclas de estos).

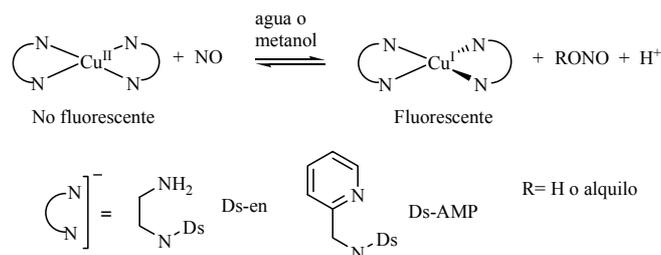
<sup>43</sup> (a) M. Albrecht, G. Rodríguez, J. Schoenmaker, G. van Koten, *Org. Lett.*, 22, **2000**, 2, 3461. (b) M. Albrecht, R. A. Gossage, M. Lutz, A. L. Spek, G. van Koten, *Chem. Eur. J.*, 6, **2000**, 1431. (c) M. Albrecht, G. van Koten, *Adv. Mat.*, 11, **1999**, 171.

<sup>44</sup> A. V. Leontiev, D. M. Rudkevich, *J. Am. Chem. Soc.*, 127, **2005**, 14126.



**Figura 1.26.** Sensor de SO<sub>2</sub> por desplazamiento.

Otro ejemplo que encontramos en la literatura es la utilización de complejos de Cu(II) para la detección de monóxido de nitrógeno.<sup>45</sup> El óxido nítrico (NO) es regulador de procesos biológicos de aquí que sea tan importante su determinación en medio acuoso. Estos complejos de Cu(II) tienen una alta sensibilidad y son capaces de detectar cantidades nanomolares de este gas. El ensayo se basa en la reacción de reducción del NO sobre el Cu(II), que hace que el ligando fluorescente inicialmente desactivado por la unión al Cu(II) paramagnético, emita nuevamente al formarse el Cu(I) diamagnético (figura 1.27). Los complejos de Cu(II) utilizados son [Cu(Ds-en)<sub>2</sub>] y [Cu(Ds-AMP)<sub>2</sub>], donde Ds-en y Ds-AMP son las bases conjugadas de la dansiletildiamina (Ds-Hen) y la dansilaminometilpiridina (Ds-HAMP).



**Figura 1.27.** Detección de NO por reducción del cobre (II).

Para la detección de las diferentes familias de compuestos se aprovechan los conocimientos acerca de las reacciones que sufren los grupos funcionales que forman parte de la estructura de estas. Recientemente se describió el desarrollo de un sensor fluorescente para la determinación de tioles que se basa en una reacción

<sup>45</sup> M. H. Lim, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.*, 127, **2005**, 12170.

de sustitución nucleofílica aromática.<sup>46</sup> A partir de una fluoresceína funcionalizada con agrupaciones 2,4-dinitrobenzenosulfonilo (prácticamente no fluorescente) que reacciona con tioles liberando la fluoresceína se pudo cuantificar la cantidad de tiol presente. Mediante este procedimiento es posible determinar la actividad inhibitoria de las colinesterasas presentes en sistemas biológicos.

La reacción del grupo tiol con las escuaridinas (figura 1.28) se ha utilizado para la determinación colorimétrica de compuestos con este residuo.<sup>47</sup> En este trabajo se desarrolla un dosímetro químico con el cual se puede cuantificar la presencia de compuestos que contienen el grupo tiol en medio acuoso, lo cual aplicado a biomoléculas es de gran importancia. Así es posible llevar a cabo la detección de la cisteína en presencia del resto de los aminoácidos naturales, tanto en muestras preparadas en el laboratorio, como en otras más complejas como es el plasma humano.

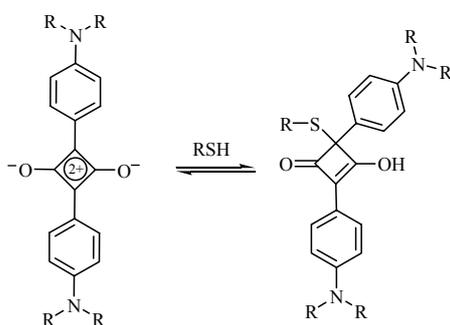


Figura 1.28. Reacción de escuaridinas con tioles.

Una de las familias de productos naturales más importantes son los sacáridos y sus derivados. Para la detección de estos se ha empleado principalmente ácidos borónicos que por su estructura son capaces de formar ésteres cíclicos con los sacáridos, principalmente con los que contienen grupos diol en posición cis.<sup>29</sup> A pesar de las similitudes estructurales de estas biomoléculas se ha logrado desarrollar sensores ópticos que muestran selectividad hacia algunas de ellas.<sup>48</sup> Tal es el caso del ácido diborónico que se muestra en la figura 1.29, el cual es capaz de

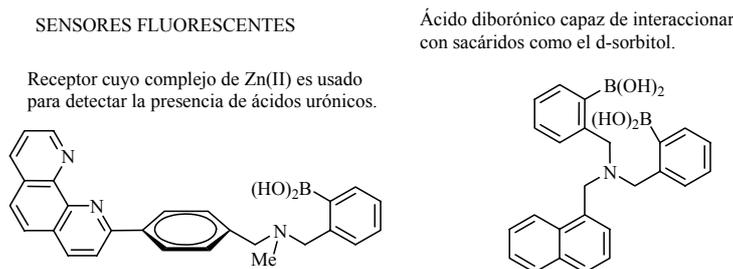
<sup>46</sup> H. Maeda, H. Matsuno, M. Ushida, K. Katayama, K. Saeki, N. Itoh, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 44, **2005**, 2922.

<sup>47</sup> J. V. Ros-Lis, B. García, D. Jiménez, R. Martínez-Mañez, F. Sancenón, J. Soto, F. Gonzalvo, M. C. Valldecabres, *J. Am. Chem. Soc.*, 126, **2004**, 4064.

<sup>48</sup> (a) T. D. James, S. Shinkai, "Artificial Receptors as Chemosensors for Carbohydrates", *Topics in Current Chemistry*, 218, **2002**, 159. (b) S. Striegler, *Curr. Org. Chem.*, 7, **2003**, 81.

reconocer sacáridos pequeños con dos o más grupos diol cercanos espacialmente.<sup>49</sup> Así el d-sorbitol al interactuar con este receptor provoca un aumento en la intensidad de su banda de emisión, mientras que otros sacáridos donde los grupos de unión se encuentran más separados no afectan sus propiedades ópticas.

Uno de los derivados de la oxidación de las aldosas es el ácido urónico, Shinkai y colaboradores han desarrollado un receptor fluorescente cuyo complejo de Zn(II) es selectivo al ácido D-glucurónico y al ácido D-galacturónico.<sup>50</sup> Los ácidos urónicos que prácticamente no interactúan con el ligando libre, sí lo hacen con su complejo con Zn mediante el complejo ácido urónico-diol y la coordinación Zn(II)-carboxilato, provocando un aumento de la fluorescencia.



**Figura 1.29.** Receptores para sacáridos y derivados basados en la interacción de estos con el ácido borónico.

### 1.7 Sensores ópticos soportados en matrices sólidas

Con el fin de aumentar la selectividad de ciertos sensores ópticos estos han sido soportados sobre diferentes matrices sólidas. Lo cual además posibilita la reutilización del sensor, pues si este es usado directamente sobre el sustrato en disolución no se suele recuperar y su uso sería similar al de los indicadores químicos.

Pueden existir varias estrategias para el anclaje de los sensores sobre una superficie. Por ejemplo mediante un enlace químico superficie-sensor, tanto para superficies inorgánicas como para orgánicas (polímero), o por interacciones de adsorción superficial. En otros casos el sensor queda ocluido o disuelto en una membrana polimérica o fase líquida muy viscosa.

Como matrices sólidas se han utilizado materiales orgánicos (diferentes tipos de polímeros) e inorgánicos (metales y materiales silíceos).

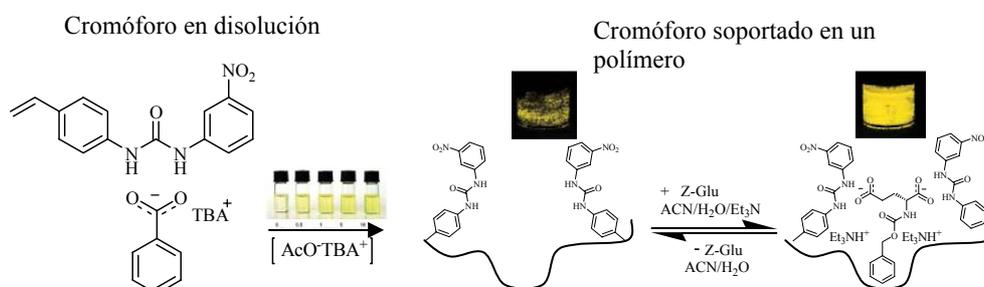
<sup>49</sup> T. D. James, H. Shinmori, S. Shinkai, *Chem Commun.*, **1997**, 71.

<sup>50</sup> M. Takeuchi, M. Yamamoto, S. Shinkai, *Chem. Commun.*, **1997**, 1731.

## Introducción.

El uso de polímeros como soportes de reactivos cromo/fluorogénicos es un amplio campo en estudio ya que pueden ser usados diferentes polímeros como son: lipofílicos, iónicos, hidrofílicos o con especificidad molecular (*imprinted polymers*), según la especie a detectar y el tipo de sensor utilizado. Algunos de los trabajos que aparecen en la literatura basados en estos conceptos se describen continuación.

Manesiotis y colaboradores reportaron el uso de polímeros con especificidad molecular con Z-(D o L)-glutamato que muestran una gran capacidad de reconocimiento enantioselectivo observable a simple vista.<sup>51</sup> Como monómero para la síntesis de estos polímeros usaron la 1-(4-estiril)-3-(3-nitrofenil)urea. Realizando ensayos en disoluciones de DMSO con este monómero se observa que es capaz de detectar el aumento de la concentración de benzoato. Sin embargo cuando se sintetiza el polímero impreso con dimetacrilato de etilenglicol (EDMA) como entrecruzante se observa un cambio de color más evidente en presencia de carboxilatos y se logra el reconocimiento enantioselectivo de moléculas biológicas como es el Z-glutamato en medios acuosos. (Figura 1.30)



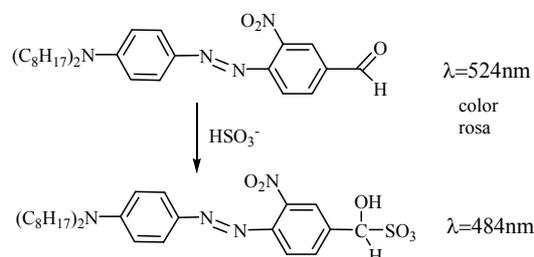
**Figura 1.30.** Uso de un polímero de EDMA como soporte para la detección cromogénica del Z-glutamato.

También encontramos ejemplos donde el polímero actúa como soporte sin que el reactivo cromogénico esté enlazado covalentemente. Este es el caso de un polímero de PVC que contiene 4-*N,N*-dioctilamino-4'-formil-2'-nitroazobenceno y es utilizado para la determinación de hidrógenosulfito en medio acuoso, (ver figura 1.31).<sup>52</sup> Si al material se le añade una amina lipofílica como es la dioctadecilmetilamina se logran detectar concentraciones de bisulfito entre 0.1 y 10 mM a pH 4.9. La

<sup>51</sup> P. Manesiotis, A. J. Hall, M. Emgenbroich, M. Quaglia, E. De Lorenzib, B. Sellergren, *Chem. Commun.*, **2004**, 2278.

<sup>52</sup> G. J. Mohr, *Chem. Commun.*, **2002**, 2646.

determinación es selectiva al hidrógenosulfito en presencia de otros aniones como sulfato, fosfato o cloruro, en cantidades de hasta 50 mM. En este caso además de servir como soporte para el reactivo, el polímero actúa de barrera para otras especies que reaccionan con este colorante, como las aminas y los alcoholes, que podrían actuar como interferentes de la determinación, pero son incapaces de difundir a través de él.

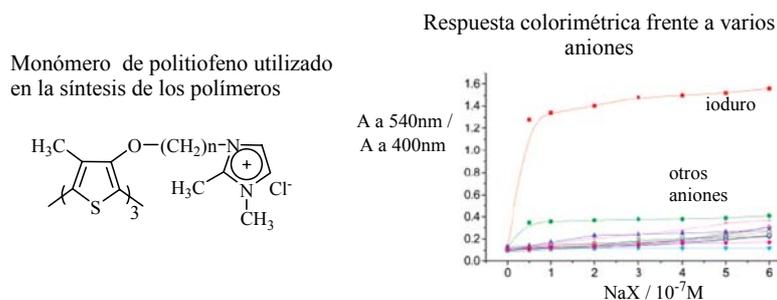


**Figura 1.31.** Colorante disuelto en una membrana de PVC para efectuar el reconocimiento del anión hidrógenosulfito por formación de un aducto de color naranja.

Los monómeros de derivados de politiofenos los encontramos formando parte de varios materiales con aplicaciones como sensores cromo-/fluorogénicos. Los cambios conformacionales inducidos en los politiofenos pueden ser determinados mediante métodos espectroscópicos de absorción, emisión y dicroísmo circular, por lo que se consideran una plataforma adecuada para el desarrollo de sensores ópticos.

En otro trabajo se describe un polímero sintetizado con derivados de politiofenos que es capaz de reconocer selectivamente el yoduro en presencia de otros aniones como son F<sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup>, CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>, HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>, EDTA<sup>4-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> y (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)<sub>4</sub>B<sup>-</sup>.<sup>53</sup> En este caso el polímero está construido mediante la tecnología de autoensamblaje, o sea aprovechando las interacciones electrostáticas de especies con cargas opuestas. La respuesta colorimétrica se mide en disoluciones acuosas del polímero catiónico. El poli(3-alcoxi-4-metiltiofeno) sufre un cambio conformacional cuando se añade NaI que provoca un desplazamiento del máximo de absorción de 406 a 543 nm, (Figura 1.32). Además este cambio de color viene acompañado de una desactivación de la fluorescencia del monómero, es pues un material cromo-/fluorogénico que permite una determinación rápida y versátil del anión yoduro en agua, teniendo como desventaja principal que el polímero se solubiliza en el medio impidiendo su posterior reutilización.

<sup>53</sup> H. A. Ho, M. Leclerc, *J. Am. Chem. Soc.*, 125, **2003**, 4412.



**Figura 1.32.** Detección selectiva de ioduro en medio acuoso usando polímeros derivados de politiofenos.

Basándose también en un monómero de poli(3-alcoxi-4-metilthiofeno) se lleva a cabo el desarrollo de un sensor colorimétrico y fluorescente para la detección de ATP, ver figura 1.33.<sup>54</sup> En este caso se utiliza la tecnología de síntesis de polímeros conjugados, que pueden estar formados por monómeros solubles en agua y que forman complejos supramoleculares con biomacromoléculas (polipéptidos, polisacáridos, bases nucleicas). Este trabajo es de gran relevancia ya que se aprovecha la capacidad del ATP de formar complejos con polímeros conjugados e inducir cambios en su conformación, describiéndose por primera vez la detección de esta base por medidas colorimétricas debidas a la formación del agregado supramolecular, en disoluciones acuosas a pH fisiológico. Según los autores, este material podría ser usado para trabajos de rutina en ensayos celulares, si se logran introducir sustituyentes como grupos zwitteriónicos o polietilenglicol en los politiofenos para aumentar la permeabilidad de la membrana.



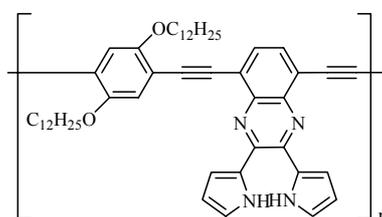
**Figura 1.33.** A la izquierda estructura del monómero de politiofeno utilizado en la síntesis del polímero capaz de detectar ATP selectivamente, a la derecha, color de la disolución en agua del monómero al adicionar 1 equivalente de los respectivos aniones.

En otro trabajo encontramos que se utiliza un material que contiene politiofenos para el reconocimiento de aniones como el fluoruro, pirofosfato y fosfato en medio

<sup>54</sup> C. Li, M. Numata, M. Takeuchi, S. Shinkai, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 44, **2005**, 6371.

acuoso.<sup>55</sup> Para ello se usa un polímero conductor de politiofenos modificado con unidades de dipirrolilquinoxalina que son capaces de interactuar con los aniones por formación de enlaces de hidrógeno, provocando cambios reversibles, más o menos pronunciados, en el color del material y además en su conductividad. Este material tiene como ventaja que la señal de reconocimiento es medible mediante dos vías independientes y que usando un bajo nivel de dopado p, e incluyendo grupos con capacidad de formación de enlaces de hidrógeno se logra aumentar la afinidad por los aniones.

El sistema cromogénico basado en la dipirrolilquinoxalina, figura 1.34, también es usado para la síntesis de un polímero conjugado del cual se estudia su capacidad para la detección óptica de aniones.<sup>56</sup> Mediante cálculos semiempíricos y evidencias experimentales se llega a la conclusión que la interacción del sistema con los aniones es por desprotonación, por lo que el orden de selectividad depende de la basicidad del anión y es un proceso reversible con la adición de ácido.



**Figura 1.34.** Monómero de dipirrolquinoxalina.

El uso de matrices inorgánicas posibilita un entorno más rígido, una mayor estabilidad migratoria y un incremento de la fotoestabilidad. Los materiales silíceos utilizados como soportes de sensores ópticos pueden ser porosos (mesoporosos y zeolitas), no porosos (humo de sílice) o arcillas. Son diversos los trabajos realizados en el campo de la síntesis de sólidos híbridos conteniendo sensores ópticos unidos covalentemente o por interacciones electrostáticas a una matriz inorgánica de óxido de sílice. Algunos de ellos han sido desarrollados en nuestro grupo de trabajo.

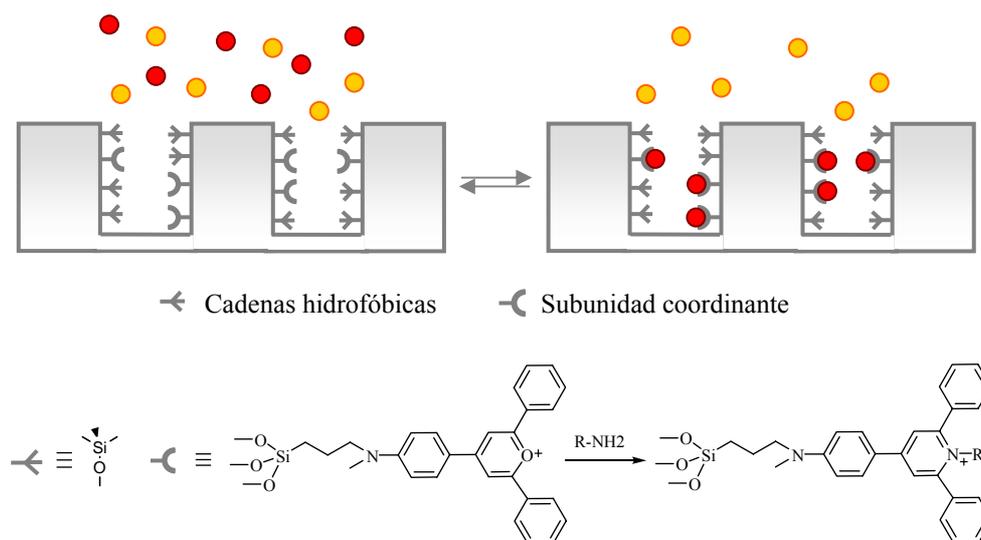
Cuando el ligando está enlazado a la matriz mediante un enlace covalente presenta impedimentos estéricos, además el microentorno del poro, así como el tamaño de este pueden influir en el proceso de reconocimiento molecular. Variando estos parámetros se pueden lograr sólidos con especificidad molecular. Tal es el caso del

<sup>55</sup> D. Aldakov, P. Anzenbacher, *J. Am. Chem. Soc.*, 126, **2004**, 4752.

<sup>56</sup> C. Y. Wu, M. S. Chen, C. A. Lin, S. C. Lin, S. S. Sun, *Chem. Eur. J.*, 12, **2006**, 2263.

## Introducción.

trabajo desarrollado por Comes y colaboradores<sup>57</sup> donde se sintetiza un sólido del tipo MCM-41 que contiene un derivado de trifenilpirilio unido covalentemente, el cual reacciona con aminas para formar la sal de piridinio con el correspondiente cambio de color y fluorescencia. En disolución esta reacción es totalmente inespecífica, mientras que si se coloca la sal de pirilio en los nanoporos se logra una selectividad; sólo reaccionan las aminas relativamente pequeñas pero suficientemente hidrofóbicas, como la octilamina. Las aminas más hidrofílicas (como la propilamina) o más grandes (como la dodecilamina) no provocan cambios de color en el material a tiempos de reacción cortos. Un esquema del sensor descrito se muestra en la figura 1.35.



**Figura 1.35.** Sólido mesoporoso funcionalizado con una sal de pirilio para el reconocimiento de aminas primarias.

Una de las ideas más novedosas y con visos de futuras aplicaciones reales es la utilización de materiales mesoporosos como sólidos sobre los que desarrollar puertas moleculares nanoscópicas.<sup>58</sup> Estos materiales inorgánicos se pueden funcionalizar en la superficie con determinadas especies químicas que pueden cambiar de forma o de tamaño mediante un impulso externo y, de esta forma, controlar el movimiento de masa del interior de los poros al exterior o viceversa.

<sup>57</sup> M. Comes, M. D. Marcos, R. Martínez-Máñez, F. Sancenón, J. Soto, L. A. Villaescusa, P. Amorós, D. Beltrán, *Adv. Mater.*, 16, **2004**, 1783.

<sup>58</sup> A. B. Descalzo, R. Martínez-Máñez, F. Sancenón, K. Hoffmann, K. Rurack, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 45, **2006**, 5924.

Fujiwara y colaboradores desarrollaron el primer material de este tipo en el año 2003.<sup>59</sup> Estos investigadores sintetizaron un material híbrido funcionalizando un sólido mesoporoso del tipo MCM-41 con una cumarina anclada en la entrada de los poros. Cuando este material se irradia con luz de  $\lambda > 350$  nm la cumarina fotodimeriza y los dímeros de ciclobutano obtenidos cierran los poros, siendo el proceso de ciclación reversible al irradiar a 250 nm. Recientemente este concepto de puerta molecular nanoscópica se ha aplicado en el diseño de un material híbrido con capacidad para el reconocimiento cromogénico de aniones. De esta forma R. Casasús y colaboradores han sintetizado un material en el que se han anclado poliaminas lineales en la superficie externa de un sólido UVM-7 (que también es un material tipo MCM-41 pero con dos tipos de poro distinto, los mesoporos de 2.6 nm de diámetro y textural de 45.2 nm de diámetro).<sup>60</sup> El interior de los poros se cargó con un colorante, el cloruro de tris(2,2'-bipiridil)rutenio(II).<sup>61</sup> Realizando estudios de liberación del colorante a la disolución acuosa se comprobó que la liberación es función del pH del medio. A pH ácido las poliaminas están totalmente protonadas y las repulsiones electrostáticas entre ellas hacen que adopten una disposición rígida que provoca el cierre de los poros y la inhibición de la liberación del colorante. Por el contrario a pH neutro las poliaminas están parcialmente protonadas y, como consecuencia, no son tan rígidas permitiendo la liberación del colorante atrapado en el interior de los poros. La cantidad de colorante liberado también se puede controlar mediante la presencia de ciertos aniones por que es bien sabido la capacidad que presentan las poliaminas protonadas de coordinar con aniones a través de interacciones electrostáticas y de enlaces de hidrógeno. De esta forma se observó que la adición de aniones pequeños (haluros, sulfato y fosfato) a suspensiones del material híbrido a pH 6 no varía significativamente la cantidad de colorante que se libera ya que estos aniones coordinan con la poliamina pero no son capaces de inducir un cierre de los poros. Sin embargo, la adición de aniones voluminosos con mucha capacidad coordinante con las poliaminas como el trifosfato de adenosina (ATP) sí que es capaz de taponar la entrada de los poros inhibiendo la liberación del colorante (ver figura 1.36). De esta forma estos

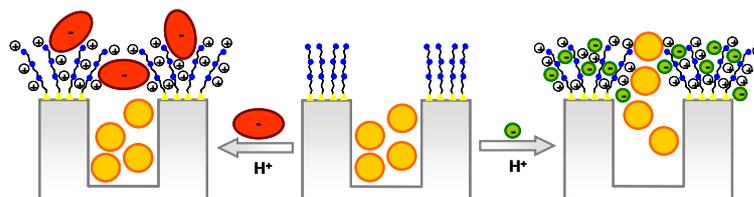
---

<sup>59</sup> (a) N. K. Mal, M. Fujiwara, Y. Tanaka, *Nature* 421, **2003**, 350; (b) N. K. Mal, M. Fujiwara, Y. Tanaka, T. Taguchi, M. Matsukata, *Chem. Mater.* 15, **2003**, 3385.

<sup>60</sup> R. Casasús, M. D. Marcos, R. Martínez-Máñez, J. V. Ros-Lis, J. Soto, L. A. Villaescusa, P. Amorós, D. Beltrán, C. Guillem, J. Latorre, *J. Am. Chem. Soc.* 126, **2004**, 8612.

<sup>61</sup> R. Casasús, E. Aznar, M. Dolores-Marcos, R. Martínez-Máñez, F. Sancenón, J. Soto, P. Amorós, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 45, **2006**, 6661.

materiales híbridos funcionalizados con puertas moleculares se pueden emplear en el desarrollo de nuevos receptores ópticos de iones y especies neutras.



**Figura 1.36.** Sistema de puertas diseñado para el reconocimiento de aniones.

Para el desarrollo de sensores ópticos soportados sobre metales se han utilizado superficies de metales nobles y de óxidos metálicos. Las nanopartículas de oro y plata como sensores químicos y biológicos han tenido gran auge en la última década.<sup>62</sup> Para su uso como sensores se funcionaliza la superficie de la nanopartícula con grupos receptores.

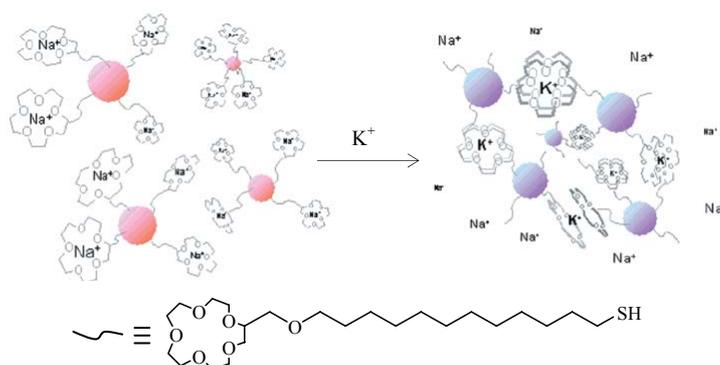
Las nanopartículas de oro en particular tienen gran potencial para ser usadas como sensores ópticos debido a su alto coeficiente de absorción molar (la absorptividad molar para partículas de diámetro 8 y 13 nm tiene valores de  $7.5 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  a 520 nm y  $4.7 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  a 524 nm, respectivamente).<sup>63</sup> Estas bandas que aparecen en la zona visible del espectro se denominan bandas de plasmon y son debidas a las oscilaciones colectivas de la nube electrónica en la superficie de la nanopartícula (para las nanopartículas de oro corresponden a 6 electrones de la banda de conducción) que se correlaciona con el campo electromagnético de la luz incidente, es decir la excitación de la oscilación coherente de la banda de conducción.

Para la detección de cationes se han realizado diferentes aproximaciones, entre ellas podemos mencionar el trabajo publicado por S. Y. Lin y colaboradores que logran el reconocimiento de potasio en agua con nanopartículas de oro funcionalizadas con un éter corona (15-corona-5), ver figura 1.37.<sup>64</sup>

<sup>62</sup> (a) I. Willner, E. Katz, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 43, **2004**, 6042; (b) M.-C. Daniel, D. Astruc, *Chem. Rev.* 104, **2004**, 293.

<sup>63</sup> R. C. Mucic, J. J. Storhoff, C. A. Mirkin, R.L. Letsinger, *J. Am. Chem. Soc.*, 120, **1998**, 12674.

<sup>64</sup> S.Y. Lin, S.W. Liu, C.M. Lin, C. Chen, *Anal. Chem.*, 74, **2002**, 330.



**Figura 1.37.** Nanopartículas de oro funcionalizadas para el reconocimiento del catión potasio.

Más recientemente se reporta el uso de nanopartículas de oro como sensor fluorescente para la detección de mercurio (II) en muestras medioambientales acuosas y en baterías alcalinas de manganeso.<sup>65</sup> En este caso se emplea la rodamina B, molécula altamente fluorescente en disolución, que adsorbida sobre la superficie de la nanopartícula presenta una fluorescencia débil como resultado de una transferencia de energía por resonancia y la colisión con las nanopartículas de oro. En presencia de Hg(II) la rodamina es liberada de la superficie de la nanopartícula recuperando su fluorescencia original. El aumento de la selectividad frente a mercurio en presencia de otros cationes metálicos se logra funcionalizando con ligandos que contienen el grupo tiol como el ácido mercaptopropiónico y adicionando un agente quelatante como el ácido 2,6-piridinodicarboxílico.

Para la detección de aniones se han funcionalizado nanopartículas de oro con grupos amidas que interaccionan con estos mediante la formación de enlaces de hidrógeno.<sup>66</sup> La banda de absorción de las nanopartículas cambia por la interacción de los aniones con este grupo funcional, (ver figura 1.38).<sup>67</sup> La ventaja del uso de este sensor sería su sensibilidad. Habría que realizar modificaciones en el grupo receptor para mejorar la selectividad hacia algún anión en específico. Sólo se observó una preferencia en la coordinación por el dihidrógenosulfato y el dihidrógenofosfato, frente a otros aniones como cloruro, bromuro, ioduro, nitrato y

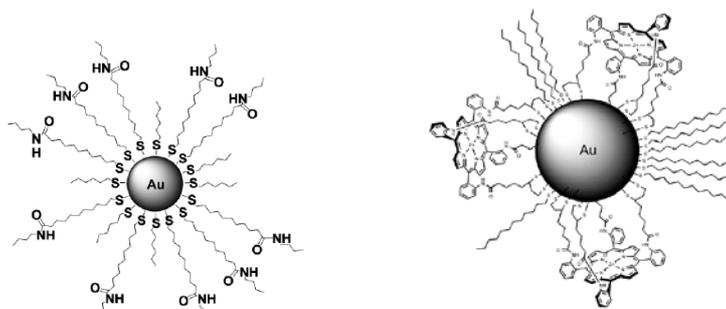
<sup>65</sup> C. C. Huang, H. T. Chang, *Anal. Chem.*, 78, **2006**, 8332.

<sup>66</sup> S. Watanabe, M. Sonobe, M. Arai, Y. Tazume, T. Matsuo, T. Nakamura, K. Yoshida, *Chem. Commun.*, **2002**, 2866.

<sup>67</sup> K. Choi, A. D. Hamilton, *Coord. Chem. Rev.*, 240, **2003**, 101.

acetato. Lo cual se atribuye a la posibilidad de formación de enlaces de hidrógeno  $\text{NHCO}\cdots\text{HOX}$ , donde X es S o P, respectivamente.

Una mayor selectividad se logra usando sensores de aniones con nanopartículas funcionalizadas con amidas unidas a metaloporfirinas de zinc, la estructura de estas nanopartículas se observa en la figura 1.38 a la derecha.<sup>68</sup> En este caso la coordinación ocurre preferentemente con el cloruro y el dihidrógenofosfato frente a otros aniones como bromuro, ioduro o nitrato.



**Figura 1.38.** Nanopartículas de oro funcionalizadas para el reconocimiento de aniones. Izquierda, con cadenas que contienen el grupo amida y a la derecha incluyendo porfirinas unidas a las amidas.

La idea es combinar lo mejor de los dos mundos: tomar la inspiración y el diseño de la química orgánica supramolecular y combinarlo con materiales que tienen virtudes como la cristalinidad, gran área superficial y en muchos casos se obtienen a través de métodos de síntesis sencillos, para lograr cada vez un reconocimiento más selectivo. Al unir los receptores con los sólidos inorgánicos se logra aislarlos del medio en el cual se encuentra el analito. Con ello se facilita su recuperación y se mejora la selectividad, ya que el sólido es capaz de impedir el acceso de ciertas especies interferentes al receptor.

### 1.8 Actualidad y perspectivas en el uso de sensores ópticos.

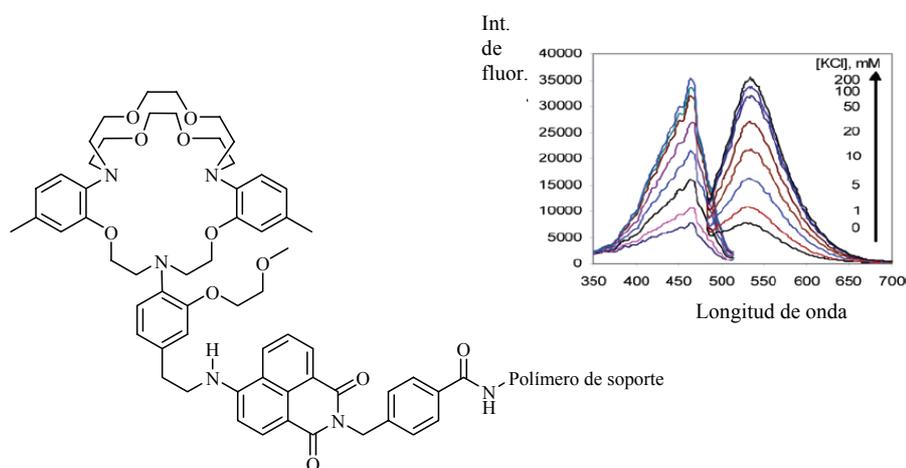
Lograr una aplicación práctica de los sensores ópticos estudiados a nivel de laboratorio no es una tarea fácil. Muchos de los sensores desarrollados en los últimos 40 años presentan gran selectividad hacia un analito en particular en un medio determinado, pero al intentar utilizarlos en muestras reales se obtienen

---

<sup>68</sup> P. D. Beer, D. P. Cormode, J. J. Davis, *Chem. Commun.*, **2004**, 414.

resultados desalentadores, ya sea por las interferencias que puedan estar presentes en matrices más complejas, o por pequeños cambios del medio en que se realiza el análisis (pH, disolvente, contenido de agua, etc.) que afectan el reconocimiento. No obstante se ha logrado el diseño de sensores que están siendo empleados en áreas importantes como la medicina. Algunos de ellos se describen a continuación.

En el trabajo titulado “A Fluorescent Sensor with High Selectivity and Sensitivity for Potassium in Water”, Huarui He y colaboradores describen la síntesis de un sensor fluorescente para el potasio, con gran selectividad frente a sodio y capaz de responder a este analito a pH fisiológico.<sup>69</sup> Este sensor está siendo usado en el analizador de sangre portátil Roche OPTI CCA, que determina la cantidad de potasio en muestras de sangre y suero. El fluoróforo utilizado se basa en un derivado de la 4-aminonaftalimida unido a un receptor aza-15-corona-5, (ver figura 1.39), que permite el reconocimiento de potasio extracelular.



**Figura 1.39.** Estructura del sensor de  $K^+$ . En la gráfica a la derecha, espectros de excitación y emisión del disco sensor expuesto a disoluciones de cloruro de potasio en una disolución tampón de TRIS-HEPES a pH 7.4.

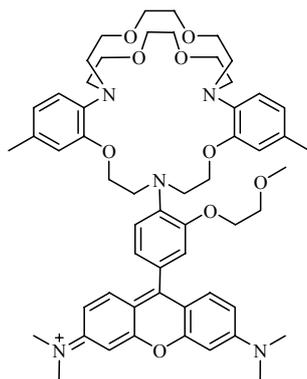
Al observar la estructura de la molécula sensora podemos comprobar que el criptando se encuentra unido en posición orto a una alcoxianilina que es un grupo donador y desactiva la fluorescencia vía una transferencia electrónica fotoinducida (PET), la unión del potasio al receptor interrumpe esta desactivación, por lo que la

<sup>69</sup> H. He, M. A. Mortellaro, M. J. P. Leiner, R. J. Fraatz, J. K. Tusa, *J. Am. Chem. Soc.*, 125, **2003**, 1468.

## Introducción.

intensidad de la banda de emisión crece con el aumento de la concentración de potasio. Este analizador desarrollado por la ROCHE es capaz de medir el potasio con una precisión de  $\pm 0.06$  mM y no se han observado interferencias del catión calcio en concentraciones clínicas o del pH de la muestra, en el caso del catión sodio sólo se observa un cambio del 5.8% de la señal por milimol de potasio.<sup>70</sup>

Con este mismo criptando se ha desarrollado otro sensor capaz de determinar el catión potasio en la corteza cerebral.<sup>71</sup> En este caso la molécula receptora consiste en la 3,6-bis(dimetilamino)xantilio unida al criptando, como se observa en la figura 1.40. La molécula aumenta la intensidad de la fluorescencia 14 veces en presencia de 50 mM de potasio con una selectividad  $K^+/Na^+$  mayor que 30.



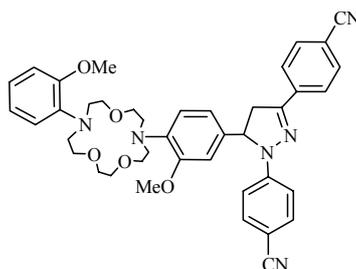
**Figura 1.40.** Estructura del sensor fluorogénico capaz de medir  $K^+$  en la corteza cerebral.

Otro sensor que actualmente está siendo utilizado en las unidades de urgencias de los hospitales y en las ambulancias es el estudiado por A. P. da Silva y colaboradores, para la determinación del catión sodio. Mediante la inmovilización de la molécula sensora (figura 1.41) en un sustrato de fibra de aminocelulosa se logra que el catión sodio presente en el suero humano interaccione con esta, obteniéndose una respuesta proporcional a la concentración de este electrolito. Este sensor se encuentra integrado en el mismo analizador portátil de sangre desarrollado por la ROCHE que hemos descrito con anterioridad para la detección de  $K^+$ .

<sup>70</sup> El catión sodio al ser más pequeño no llena la cavidad del criptando totalmente y es menos eficiente interrumpiendo la desactivación de la fluorescencia, por lo que se observa que el sensor presenta una respuesta muy similar a una concentración 5 mM de  $K^+$  en presencia de  $[Na^+] 160$  mM.

<sup>71</sup> P. Padmawar, X. Yao, O. Bloch, G. T. Manley, A. S. Verkman, *Nature Methods*, 2, **2005**, 825.

En este caso la presencia del catión sodio provoca la transferencia electrónica fotoinducida que es reflejada en el aumento de la fluorescencia.<sup>72</sup> Esto es producto de que con la complejación del sodio el receptor adopta una conformación de pseudocriptando y los grupos metoxilo en posición orto con respecto a la unidad coordinadora provocan una desconjugación de los pares de electrones libres de los nitrógenos del anillo del sistema  $\pi$ . Lo cual unido al efecto electrostático del catión sodio, provoca un gran aumento en el potencial de ionización del receptor y los procesos PET pasan a ser termodinámicamente desfavorables, restableciéndose la fluorescencia como ruta de desactivación dominante.



**Figura 1.41.** Molécula sensora utilizada en la determinación de  $\text{Na}^+$ .

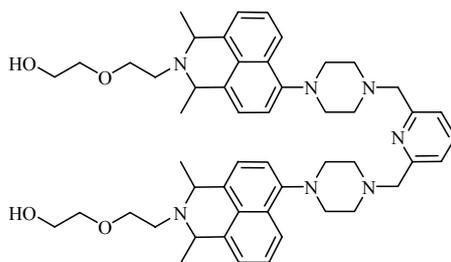
En la figura 1.42 se representa una molécula sensora capaz de reconocer el  $\text{Hg}^{2+}$  con alta sensibilidad y selectividad.<sup>73</sup> Los átomos de nitrógeno de la agrupación 2,6-bis(aminometil) piridina actúan como desactivadores de la transferencia electrónica fotoinducida (PET) y como centro receptor. La molécula en presencia de  $\text{Hg}^{2+}$  muestra un aumento en la intensidad de la fluorescencia de la banda centrada alrededor de 546 nm. Este sistema ha sido usado para conocer el contenido del catión mercurio en tejidos de mamíferos y de plantas.<sup>74</sup>

<sup>72</sup> A. P. de Silva, H. Q. N. Gunaratne, T. Gunnlaugsson, *Chem. Commun.*, **1996**, 1967.

<sup>73</sup> X. Guo, X. Quian, L. Jia, *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, **2004**, 2272.

<sup>74</sup> Z. Zhang, D. Wu, X. Guo, X. Quian, Z. Lu, Q. Xu, Y. Yang, L. Duan, Y. He, Z. Feng, *Chem. Res. Toxicol.*, **18**, **2005**, 1814.

*Introducción.*



**Figura 1.42.** Molécula sensora utilizada en la determinación de  $\text{Hg}^{2+}$ .

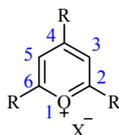
Es indudable que el paso de las moléculas, desarrolladas en el laboratorio para ser usadas como sensores ópticos, a ser utilizadas en una aplicación práctica concreta no es nada fácil. El mayor problema radica en lograr que ocurra el reconocimiento en el medio en que se encuentra el analito de forma natural.

El aumento del número de publicaciones en esta área del conocimiento indica que cada día mayor cantidad de grupos de investigación se dedican al desarrollo de sensores ópticos.

## **Capítulo 2. SALES DE PIRILIO EN EL RECONOCIMIENTO DE ANIONES Y ESPECIES NEUTRAS.**

### **2.1 Introducción.**

En este capítulo se expondrán algunos resultados obtenidos en la utilización de derivados de sales de pirilio como sensores ópticos. La sustitución de una unidad de CH del benceno por un O<sup>+</sup> (el grupo oxonio) da lugar a la formación de una sal de pirilio. Normalmente los derivados de estas sales se obtienen sustituyendo los protones de las posiciones 2, 4 y 6 del anillo por diversos grupos alifáticos y aromáticos, figura 2.1.



**Figura 2.1.** Estructura general de las sales de pirilio.

En la primera parte del presente capítulo “Sales de pirilios soportadas en polímeros orgánicos” utilizamos una serie de materiales obtenidos en el Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Burgos para el reconocimiento de especies aniónicas como son el hidrógenocarbonato y el cianuro. La obtención de estos materiales se describe en el Anexo III.

Posteriormente en el apartado titulado “Sales de pirilios usadas para la detección de aminas biógenas” se estudian diferentes derivados para la determinación de aminas biógenas en alimentos.

#### **2.1.1 Propiedades físico-químicas de las sales de pirilio.**

El anillo de las sales de pirilio contiene 6 electrones  $\pi$  conjugados que hacen que posea propiedades aromáticas. Al ser el oxígeno originalmente trivalente, el anillo de pirilio puede ser considerado como un ión oxonio cíclico. Además su mayor

estabilidad comparada con los iones oxonio alifáticos y alicíclicos es indudable debido a su naturaleza aromática.<sup>1</sup>

Desde el punto de vista de reactividad las sales de pirilio no son típicamente aromáticas, el O altamente electronegativo tiene un gran efecto perturbador en la distribución de la densidad de la nube de electrones  $\pi$ . Las posiciones 2, 4 y 6 son susceptibles al ataque nucleofílico, al tener menor densidad de carga electrónica.<sup>2</sup>

El ataque nucleofílico ocurre fácilmente y reacciones posteriores, que usualmente involucran la apertura del anillo, dan lugar a gran variedad de productos. A pesar de esto, la naturaleza aromática de las sales de pirilio se observa claramente en sus propiedades espectrales. Así, el espectro de RMN de protones del perclorato de pirilio muestra absorción a campos bajos en la región entre 8.02 y 9.22, indicando la presencia de una sustancial corriente diamagnética del anillo.

El carácter aromático del pirilio también se puede apreciar en su espectro UV. Si se compara por ejemplo con el catión piridinio, que es un sistema isoelectrónico  $\pi$  y perteneciente a su mismo grupo puntual de simetría ( $C_{2v}$ ), por lo que sus orbitales moleculares deben ser similares, se observa similitud en la posición de su máximo de UV.

### **2.1.2 Relación estructura-color.**

Las sales de pirilio son una familia de colorantes cuyos derivados absorben en un amplio rango del espectro electromagnético, dependiendo de los sustituyentes que contenga en cada posición, y en la mayoría de los casos son altamente fluorescentes. Por esta razón se pueden considerar compuestos muy atractivos para el desarrollo de sensores cromo-/fluorogénicos. Muchos de los derivados obtenidos producto del ataque nucleofílico al anillo también pueden ser detectados mediante técnicas colorimétricas.

En la tabla 2.1 se muestran los máximos de absorción de algunas sales de pirilio. Como se puede apreciar la introducción de grupos fenilos hace que la banda de absorción se desplace hacia la zona del visible, así los percloratos de pirilio que contiene 2 ó 3 de estos grupos son amarillos. La naturaleza del contraión influye en el color de las sales de pirilio, los yoduros tiene colores mucho más intensos, lo cual se atribuye a la presencia de una banda de transferencia de carga. Los

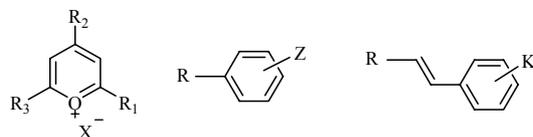
---

<sup>1</sup> A. R. Katritzky, C. W. Rees, *Comprehensive Heterocyclic Chemistry*, Vol 3, Parte 2B, **1984**, Pergamon Press Ltd.

<sup>2</sup> (a) A. T. Balaban, W. Silhau, *Tetrahedron*, 26, **1970**, 743-749. (b) C. Uncuta, A. T. Balaban, *J. Chem. Res.*, **2001**, (S)170, (M)523.

sustituyentes en posición 3, por ejemplo el metilo, provocan un corrimiento hipsocrómico de la banda, mientras que los sustituyentes en las posiciones 2, 4 y 6 del anillo hacen que la banda se desplace batocrómicamente, en relación directa a su carácter electrodador.<sup>3</sup>

**Tabla 2.1.** Máximo de absorción de sales pirilios con diferentes sustituyentes.



Derivado de pirilio			Disolvente (referencia)	$\lambda_{\text{máx1}}$	$\lambda_{\text{máx2}}$
R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>			
- CH <sub>3</sub>	- CH <sub>3</sub>	- CH <sub>3</sub>	EtOH <sup>(3)</sup>	285	230
- Ph	- Ph	- Ph	EtOH <sup>(3)</sup>	408	-
Z = <i>p</i> -CH <sub>3</sub>	Z = <i>p</i> -CH <sub>3</sub>	Z = <i>p</i> -CH <sub>3</sub>	ACN <sup>(4)</sup>	424	376
Z = <i>p</i> -CH <sub>3</sub>	- Ph	Z = <i>p</i> -CH <sub>3</sub>	ACN <sup>(4)</sup>	428	360
Z = <i>m</i> -Cl	- Ph	Z = <i>m</i> -Cl	ACN <sup>(4)</sup>	390	364
Z = <i>p</i> -CF <sub>3</sub>	- Ph	Z = <i>p</i> -CF <sub>3</sub>	ACN <sup>(4)</sup>	-	368
- Ph	Z = <i>p</i> -CF <sub>3</sub>	Z = <i>m,m'</i> -(CF <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	ACN <sup>(4)</sup>	402	388
Z = <i>p</i> -OC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	Z = <i>p</i> -OC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	- CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> <sup>(5)</sup>	452	385
Z = <i>p</i> -OC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	Z = <i>p</i> -OC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	K = <i>p</i> -OCH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> <sup>(5)</sup>	530	448
Z = <i>p</i> -OC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	Z = <i>p</i> -OC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	K = <i>o,p</i> -(OCH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> <sup>(5)</sup>	560	445
- Ph	Z = <i>p</i> -N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	- Ph	ACN <sup>(6)</sup>	540	385
- Ph	K = <i>p</i> -N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	- Ph	ACN <sup>(6)</sup>	615	395
- tienilo	K = <i>p</i> -N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	- tienilo	ACN <sup>(6)</sup>	610	470

<sup>3</sup> A. Mc. Killop, "Comprehensive Heterocyclic Chemistry II, a review of the literature 1982-1985", **1996**, Pergamon, Elsevier Science Ltd.

<sup>4</sup> D. Heyes, R. S. Menon, C. I. F. Watt, J. Wiseman, P. Kubinski, *J. Phys. Org. Chem.*, **15**, **2002**, 689.

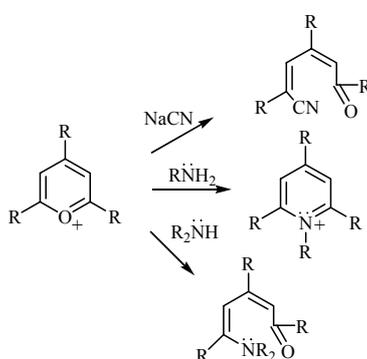
<sup>5</sup> A. M. Bonch-Bruevich, E. N. Kaliteevskaya, T. K. Razumova, A. D. Roshal, A. N. Tarnovskir, *Optics and Spectroscopy*, **89**, **2000**, 216.

<sup>6</sup> Medidas realizadas en el laboratorio.

La respuesta frente a la *p*-sustitución es variable, esta causa un pequeño desplazamiento de la transición  $\pi$ - $\pi^*$  hacia el rojo. Los grupos electroceptores en los anillos cuando se encuentran en las posiciones 4 o 6, provocan el desplazamiento de la banda hacia el azul, mientras que los dadores inducen un corrimiento batocrómico. La restricción en la rotación de los anillos de fenilo en posición 2 o 6 causan un corrimiento más significativo hacia el rojo (de alrededor de 30 a 45 nm).

### 2.1.3 Reactividad.

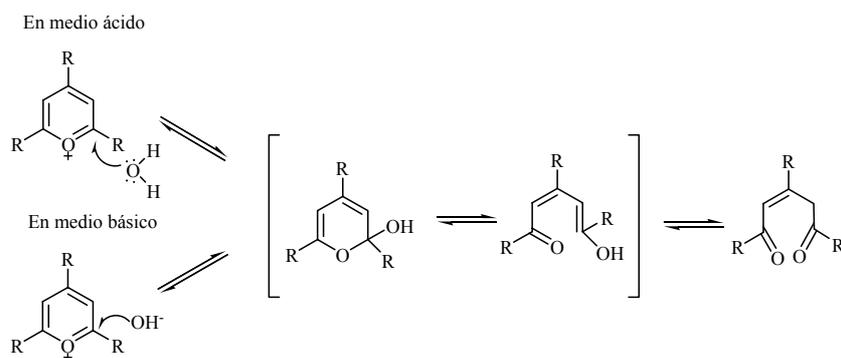
Los cationes pirilio reaccionan con especies nucleofílicas para dar una gran variedad de compuestos acíclicos o cíclicos. La estructura de algunos de estos aductos se representa en la figura 2.2. Debido a la presencia del oxígeno, el anillo aromático no experimenta reacciones de sustitución electrofílica.



**Figura 2.2.** Reacciones de las sales de pirilio con nucleófilos.

Las sales de pirilio también reaccionan con el agua, en medio ácido o básico, donde sufren el ataque nucleofílico del anión hidroxilo (figura 2.3).<sup>7</sup> Cuando las reacciones con otras especies transcurren en este medio, esta podría ser una reacción competitiva a tener en cuenta.

<sup>7</sup> A. R. Katritzky, C. W. Rees, "Comprehensive Heterocyclic Chemistry", Vol. 3, Parte 2B, 1984, Pergamon, Elsevier Science Ltd.



**Figura 2.3.** Productos obtenidos al reaccionar pirilios 2,4,6-trisustituídos con agua en medio ácido y básico.

## 2.2 Sales de pirilio soportadas en polímeros orgánicos. Uso en el reconocimiento de aniones.

El desarrollo de sensores colorimétricos para la detección de aniones continúa siendo un campo de amplio interés, puesto que estas especies participan en diversos procesos químicos y biológicos. Para la aplicación de estos sensores es necesaria la unión de las moléculas, que permiten el reconocimiento selectivo de aniones, a diferentes soportes. Las películas poliméricas que aquí se presentan se preparan fácilmente y son un medio ideal para la detección a simple vista de los analitos de interés. Recientemente encontramos en la literatura varios ejemplos del uso de matrices poliméricas como soporte para sensores cromogénicos.<sup>8</sup> Los polímeros además de actuar como soporte pueden participar de una forma activa en el proceso de reconocimiento. Como veremos en el desarrollo de este trabajo variando su carácter hidrofóbico/hidrofílico se puede modificar la capacidad de detección de las especies de interés.

<sup>8</sup> (a) C. -Y. Wu, M. -S. Chen, C. -A. Lin, S. -C. Lin, S. -S. Sun, *Chem. Eur. J.*, 12, **2006**, 2263-2269. (b) H. A. Ho, M. Leclerc, *J. Am. Chem. Soc.*, 125, **2003**, 4412-4413. (c) P. Manesiotis, A. J. Hall, M. Emgenbroich, M. Quaglia, E. De Lorenzi, B. Sellergren, *Chem. Commun.*, **2004**, 2278-2279. (d) D. Aldakov, P. Anzenbacher Jr., *J. Am. Chem. Soc.*, 126, **2004**, 4752-4753. (e) G. Kwak, M. Fujiki, T. Masuda, *Macromolecules*, 37, **2004**, 2422-2426. (f) C. Li, M. Numata, M. Takeuchi, S. Shinkai, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 44, **2005**, 6371-6374. (g) I. H. A. Badr, M. E. Meyerhoff, *J. Am. Chem. Soc.*, 127, **2005**, 5318-5319.

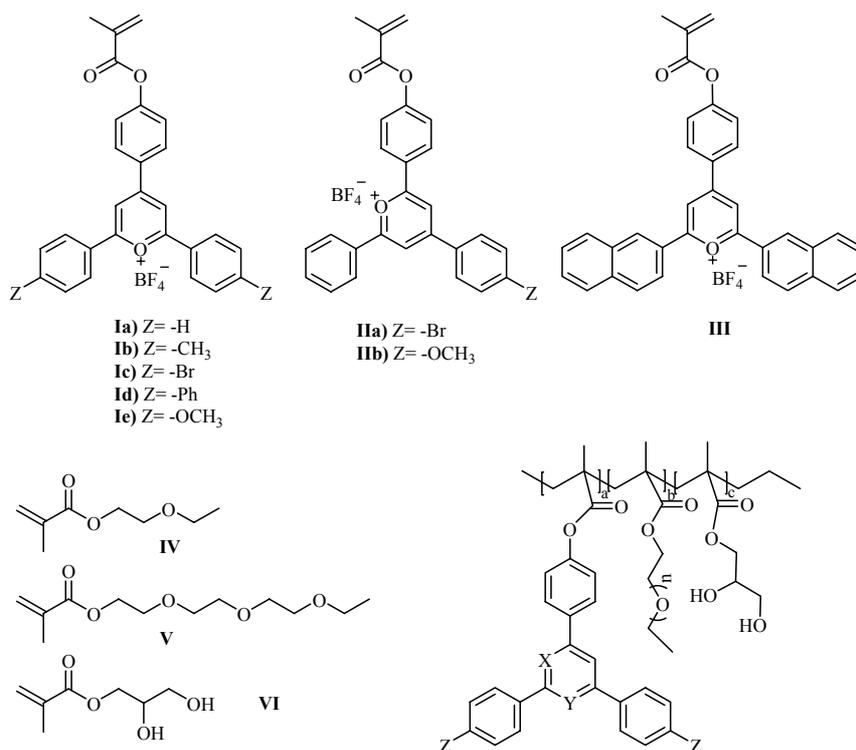
Nuestro grupo de trabajo ha desarrollado diferentes sistemas de detección basados en derivados de sales de pirilio.<sup>9</sup> Los cationes pirilio orgánicos por lo general son coloreados y altamente fluorescentes. También se ha trabajado con compuestos obtenidos al ser atacado el anillo de pirilio por especies nucleofílicas. En todos los casos se ha llevado a cabo el reconocimiento molecular mediante métodos ópticos. Las reacciones de los derivados de pirilio, que transcurren con apertura del anillo, en gran número de casos son reversibles. La reversibilidad de las reacciones permite la reutilización de la molécula sensora.

Las posiciones 2, 4 y 6 del anillo de pirilio pueden sustituirse con anillos aromáticos que contengan grupos electroaceptores/electrodadores. Estos grupos permiten su anclaje a matrices sólidas y la manipulación de sus propiedades espectroscópicas según sea conveniente.

Para incorporar los derivados de pirilio en las membranas poliméricas, primeramente fueron sintetizados los ésteres metacrílicos de algunas de estas sales (**I-III**, figura 2.4). Los polímeros se obtienen por copolimerización de los ésteres con los monómeros 2-etoxietilmetacrilato (**IV**), 2-(2-(2-etoxietoxi)etoxi)etil metacrilato (**V**) y 2,3-dihidroxiopropil metacrilato (**VI**). Además se añaden pequeñas cantidades de etilenglicol metacrilato como agente entrecruzante y 2,2'-azobis(isobutironitrilo) (AIBN) como iniciador térmico radicalario.

---

<sup>9</sup> (a) F. Sancenón, A. B. Descalzo, R. Martínez-Máñez, M. A. Miranda, J. Soto, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **40**, **2001**, 2640-2643. (b) F. Sancenón, R. Martínez-Máñez, M. A. Miranda, M. -J. Seguí, J. Soto, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **42**, **2003**, 647-650. (c) M. Comes, M. D. Marcos, R. Martínez-Máñez, F. Sancenón, J. Soto, L. A. Villaescusa, P. Amorós, D. Beltrán, *Adv. Mater.*, **16**, **2004**, 1783-1786. (d) D. Jiménez, R. Martínez-Máñez, F. Sancenón, J. V. Ros-Lis, A. Benito, J. Soto, *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, **2003**, 9000-9001. (e) F. Sancenón, R. Martínez-Máñez, J. Soto, *Chem. Commun.*, **2001**, 2262-2263.



**Figura 2.4.** Estructura general de las membranas poliméricas y de los monómeros **I-VI** usados en la síntesis de estas.

Los parámetros que se variaron en la síntesis de esta serie de membranas fueron:

- La concentración de los derivados de pirilio **I-III** (Figura 2.4 y Tabla 2.2), desde 0.5% hasta 2%.
- Uso de dos monómeros hidrofóbicos (**IV** o **V**) de diferente longitud de cadena oxoalquílica.
- La proporción de los monómeros hidrofílicos (**VI**) e hidrofóbicos (**IV** y **V**).

Partiendo de estos monómeros se obtienen 23 polímeros con diferentes características, ver Tabla 2.2. En Anexos III se describe detalladamente la síntesis de la membrana **2i** como ejemplo de la obtención de estos materiales.

**Tabla 2.2.** Composición de las membranas poliméricas sintetizadas.

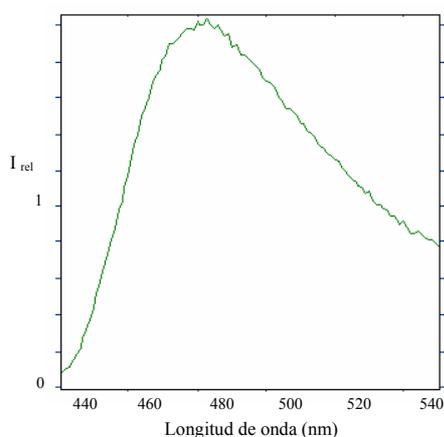
Polímero	Monómero			IV	V	VI
	(0.5%)	(1%)	(2%)			
2a	Ia			100		
2b		Ia		100		
2c			Ia	100		
2d	Ia			75		25
2e		Ia		75		25
2f			Ia	75		25
2g	Ia			50		50
2h		Ia		50		50
2i			Ia	50	-	50
2j			Ib	50	-	50
2k			Ia			100
2l			Ib			100
2m			Ie			100
2n			Ib	-	50	50
2ñ			Ic	-	50	50
2o			Ia	-	50	50
2p			IIa	-	50	50
2q			IIb	-	50	50
2r			Id	-	50	50
2s			Ie	50	-	50
2t			Ie	-	50	50
2u			III	-	50	50

Las películas que contienen un 2% del correspondiente monómero de pirilio mostraron mejores resultados en los ensayos de reconocimiento. Las sintetizadas con una menor cantidad de estos monómeros (0.5 o 1%), son incoloras o de color amarillo pálido, lo cual dificulta observar a simple vista los cambios de color producidos por la interacción con el analito.

La proporción de los monómeros hidrofílicos (VI) e hidrofóbicos (IV y V) utilizada para la obtención de cada membrana determina sus propiedades físicas. Los polímeros 2k, 2l y 2m, con un alto contenido del monómero 2,3-dihidroxipropil metacrilato (VI), resultaron altamente hidrofílicos pero muy

rígidos, quebradizos y difíciles de manipular. Mientras que los polímeros **2a-f**, con un alto contenido de 2-etoxietilmetacrilato (**IV**), son muy hidrofóbicos y la velocidad de difusión del analito en su interior se reduce. Así, las membranas con mejores propiedades, desde el punto de vista de su uso para el reconocimiento molecular, resultaron ser las que tienen una proporción de 50:50 de los monómeros hidrofílicos e hidrofóbicos.

La mayoría de los polímeros obtenidos (**2a-q**) son de color amarillo, con una banda de absorción en la zona visible centrada a 425 nm aproximadamente. Además son fluorescentes, con emisión alrededor de 480 nm, en la figura 2.5 se muestra como ejemplo el espectro de fluorescencia de polímero **2h**. El resto (**2m**, **2r-u**) son de color naranja-rojizo,  $\lambda_{\text{máx}}$  entre 528 y 545 nm, estos contienen grupos metoxilo electrodonadores y unidades de naftaleno en los monómeros de pirilio utilizados en su síntesis.



**Figura 2.5.** Espectro de emisión del polímero **2h** al ser excitado a 395 nm.

En la figura 2.6 se muestran porciones de algunos de los polímeros. Como se observa, **2m** y **2s**, que contienen el monómero de pirilio sustituido con grupos *p*-metoxifenilos, son de color naranja-rojizo. Algunos de los polímeros no son transparentes, como es el caso de **2l**, que es totalmente opaco.



**Figura 2.6.** Muestras de algunos de los polímeros utilizados.

### 2.2.1 Reconocimiento de cianuro.

Conociendo la reactividad de las sales de pirilio frente a diferentes nucleófilos, se considera que los materiales poliméricos preparados podrían servir para la detección de alguna especie rica en electrones. Se comienza a realizar los ensayos preliminares con los siguientes nucleófilos: metanol, fenol, cianuro, butanotiol, propilamina, dietilamina y trietilamina, en todos los casos a una concentración 0.02 M en agua.

Como era de esperar, en los ensayos se observa que los cambios en el color y la fluorescencia de los polímeros varían en función del pH de las disoluciones de nucleófilos utilizadas. Primeramente realizamos las pruebas con disoluciones de los diferentes nucleófilos en HEPES 0,01 M a pH=7 y observamos que en estas condiciones sólo dan respuesta los polímeros que tienen 50% de 2-etoxietilmetaacrilato (IV), o sea **2g-i**, pero sin ser selectiva a ningún nucleófilo y además la respuesta es muy lenta, ya que los cambios se observan a las 24 horas de estar en contacto los polímeros con las disoluciones.

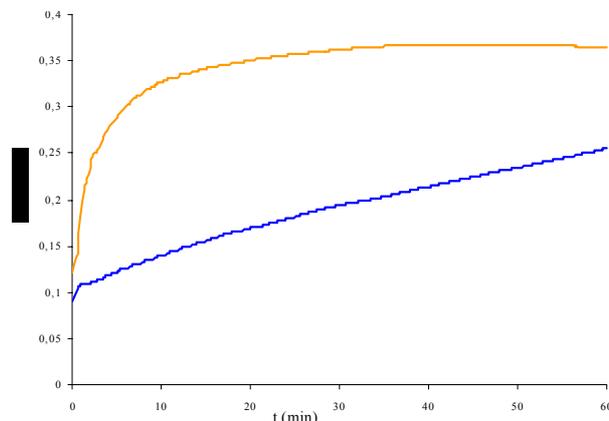
Se varió el pH de las disoluciones y se realizaron los ensayos en las siguientes condiciones:

- pH=8 tamponando con TRIS 0.01M
- pH=9 tamponando con CHES 0.01M
- pH=11 sin tampón

En todos los casos se mide la aparición de la banda entre 520 y 540 nm que es la responsable del color naranja-rosa que adquieren los polímeros al abrirse el anillo producto del ataque nucleofílico. Antes de sumergir el polímero en la disolución de analito se hidrata en una disolución al pH de trabajo durante 30 minutos.

Se observó que a pH 11 el aumento de la absorbancia es mayor, en presencia de cianuro, que del resto de las especies nucleofílicas. En la figura 2.7 se muestra el aumento de la intensidad de la banda centrada a 537 nm. Como se aprecia en la

gráfica, a tiempos cortos, el aumento de la absorbancia frente a cianuro es mayor que en presencia de aniones hidroxilo (agua a pH 11) por lo que indica que se puede utilizar este material como sensor cromo-/fluorogénico de cianuro.



**Figura 2.7.** Polímero **2i** sumergido en agua a pH 11 (línea azul) y en una disolución de cianuro a este mismo pH (línea naranja).

Basándonos en estos estudios preliminares se continuó investigando el comportamiento de estas membranas en disoluciones que contienen cianuro.

El cianuro es un ión extremadamente tóxico que se absorbe en los organismos vivos por inhalación oral o por la piel. Su detección es de suma importancia debido a que esta especie inhibe la acción de la citocromo-oxidasa mitocondrial y además bloquea el transporte de electrones, por lo que provoca una ralentización en el mecanismo oxidativo y en la utilización de oxígeno.<sup>10</sup>

El cianuro que puede actuar como agente contaminante proviene de actividades industriales, del humo del cigarro o de incendios de materiales poliméricos que contienen nitrógeno.<sup>11</sup> Además se conocen casos de intoxicación en humanos debido a una administración indebida de medicamentos o por la propia dieta. Niveles de 0.2 y 2.6 mg/L en sangre son considerados fatales para algunas especies de peces y humanos respectivamente. La determinación de cianuro es de gran interés en campos como el tratamiento de aguas residuales, el control de la contaminación, la toxicología y la medicina.

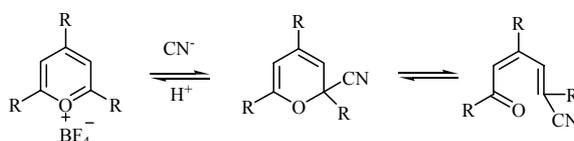
<sup>10</sup> P. W. Camerino, T. E. King, *J. Biol. Chem.*, 241, **1966**, 1429.

<sup>11</sup> J. M. González, E. Fernández, J. A. Vicente, S. Fernández, A. J. Miranda, J. E. Sánchez, M. L. Fernández, A. Sanz-Medel, *Anal. Chim. Acta*, 410, **2000**, 135.

En la literatura podemos encontrar varios métodos analíticos para la detección de cianuro, aunque pocos de ellos basan su funcionamiento en el uso de un sensor cromo-/fluorogénico. Como ejemplos aparecidos recientemente podemos mencionar el uso de pirrolilquinoxalinas que contienen Ru(II) como centro metálico,<sup>12</sup> derivados de complejos de Zn(II) con porfirinas,<sup>13</sup> ácidos borónicos<sup>14</sup> y complejos polipiridílicos de Re(I).<sup>15</sup>

Muchos de estos sistemas funcionan en disolventes orgánicos, por lo que una de las ventajas del uso de los polímeros que proponemos es que la determinación se pueda llevar a cabo en medio acuoso. Además es la primera vez que se usa un sensor basado en cationes pirilios para el reconocimiento de cianuro.

La reacción de los derivados de pirilio con el cianuro ha sido estudiada desde hace varias décadas.<sup>16</sup> En presencia de cianuro el anillo de pirilio se abre para dar lugar a la 6-ciano-3,5-dien-1-ona, ver figura 2.8. Este proceso es reversible, ya que en medio ácido la sal de pirilio se regenera.



**Figura 2.8.** Esquema de reacción de las sales de pirilio con el cianuro.

Como modelo se estudia la reactividad del monómero **Ia** en presencia de cianuro. El monómero **Ia** disuelto en acetonitrilo reacciona con el cianuro de sodio para dar la correspondiente cianodienona instantáneamente, observándose el cambio de color de amarillo a rojo. La reacción ocurre de manera similar si se realiza con el cianuro de tetrabutilamonio, el producto de esta reacción se empleó para hacer la caracterización espectroscópica. En el espectro de RMN-<sup>1</sup>H del monómero aparece a 8.6 ppm un singlete que integra 2 protones. Esta señal es característica de los protones del anillo de pirilio 2,4,6-trisustituido, Ha y Hb en la figura 2.9. Al adicionar cianuro la señal de 8.6 ppm desaparece y en su lugar se observan 2

<sup>12</sup> P. Anzenbacher, Jr., D. S. Tyson, K. Jursíková, F. N. Castellano, J. *Am. Chem. Soc.*, 124, **2002**, 6232.

<sup>13</sup> Y.-H. Kim J.-I. Hong, *Chem. Commun.*, **2002**, 512.

<sup>14</sup> (a) R. Badugu, J. R. Lakowicz, C. D. Geddes, *Anal. Biochem.*, 327, **2004**, 82. (b) R. Badugu, J. R. Lakowicz, C. D. Geddes, *Anal. Chim. Acta*, 522, **2004**, 9. (c) R. Badugu, J.R. Lakowicz, C.D. Geddes, *Dyes and Pigm.*, 64, **2005**, 49.

<sup>15</sup> S.-S. Sun, A. J. Lees, *Chem. Commun.*, **2000**, 1687.

<sup>16</sup> A. T. Balaban, W. Silhau, *Tetrahedrom*, 26, **1970**, 743.

singletes a 6.9 y 7.6 ppm. Estos singletes integran 1 protón y corresponden a Ha y Hb, que han dejado de ser equivalentes, muy probablemente debido al ataque del cianuro sobre la posición 2 del anillo de pirilio.

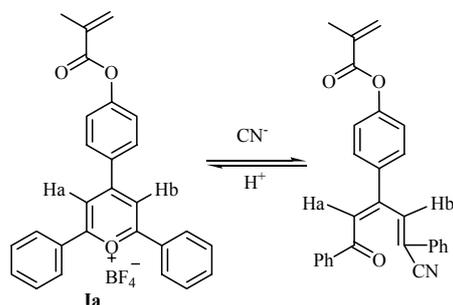


Figura 2.9. Reacción del monómero **1a** con el cianuro.

De todos los polímeros sintetizados el más adecuado para estudiar el comportamiento frente al cianuro resulto el **2i**. Los polímeros **2a-f** presentan el problema de su alta hidrofobia que hace que el cambio de color asociado con la adición del cianuro sobre el anillo de pirilio sea muy lento. Por otra parte de los polímeros **2g-i** se ha seleccionado el que presenta un mayor contenido en el monómero que contiene el anillo de pirilio ya que de esta forma se podrán observar a simple vista los cambios de color asociados a la reacción del cianuro con el anillo de pirilio.

En la matriz polimérica la sal de pirilio actúa como en disolución, al estar en contacto el polímero con una disolución acuosa de cianuro a pH 11 se observa un cambio de color de amarillo a rojo, por la formación de la cianodienona, ver figura 2.10.

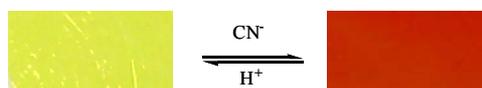
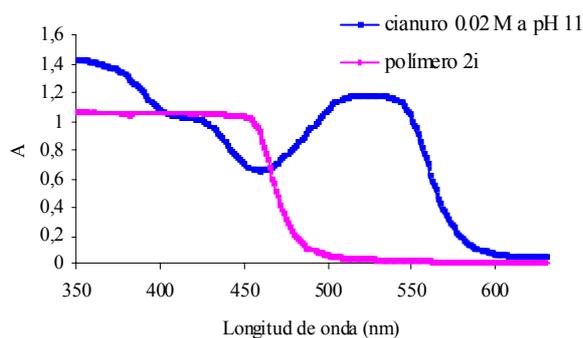


Figura 2.10. Cambio de color experimentado por el polímero **2i**, colores a partir de fotos de los polímeros.

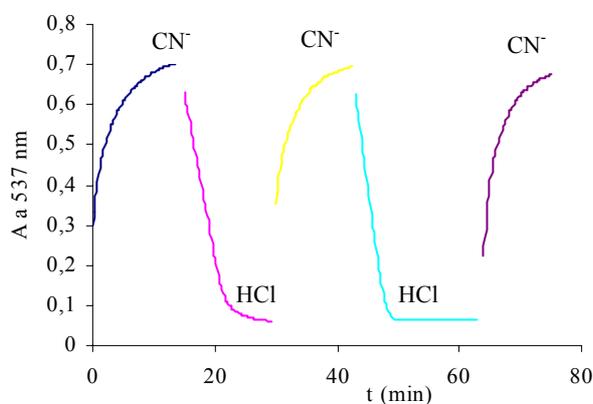
El cambio de color en el polímero ocurre durante los 15 minutos después de haberse puesto en contacto con la disolución acuosa de cianuro a pH 11. En la figura 2.11 se muestra el espectro de absorción del polímero **2i** después de sintetizado, que es de color amarillo, comparándolo con el obtenido al ser sumergido en una disolución de cianuro de sodio en agua a pH 11.



**Figura 2.11.** Espectros de absorción del polímero **2i** al inicio y después de estar sumergido 15 minutos en una disolución acuosa de cianuro a pH 11.

Si se realizan medidas de fluorescencia en este material se observa que la intensidad de la emisión disminuye a medida que avanza la reacción. El polímero **2i** es capaz de reconocer cianuro en agua con un límite de detección de  $4 \times 10^{-3}$  M.

En todos los casos en que se ha observado cambios de color y fluorescencia de las membranas, en presencia de cianuro, se ha comprobado que estos cambios son reversibles. Si el polímero, una vez rojo, se introduce en ácido clorhídrico 0.01 M recupera el color y la fluorescencia original, ver figura 2.12. Este proceso puede ser repetido más de 10 veces y continúa siendo reversible el cambio.



**Figura 2.12.** Cambios en la banda a 527 nm del polímero **2i** al pasar de una disolución acuosa de cianuro 0.01 M a pH 11 a una de HCl 0.01 M.

La reversibilidad de la reacción sólo se ha observado en presencia de ácido. Dejando el polímero en agua o al aire no revierte el proceso, sólo ocurre cuando se sumerge en la disolución ácida.

### **2.2.2 Reconocimiento de carbonato.**

Después de realizados los estudios de cambios de color de los polímeros en presencia de nucleófilos, se determina el comportamiento frente a especies aniónicas inorgánicas. Los aniones utilizados para los ensayos de reconocimiento fueron  $F^-$ ,  $Cl^-$ ,  $Br^-$ ,  $I^-$ ,  $CN^-$ ,  $SCN^-$ ,  $HCO_3^-$ ,  $SO_4^{2-}$ ,  $H_2PO_4^-$  y  $NO_3^-$  en disoluciones acuosas tamponadas a pH 7.5 con HEPES  $0.1 \text{ mol dm}^{-3}$ . En general se observa una respuesta no selectiva de estos polímeros ya que la mayoría cambia de color de amarillo a rojo en presencia de aniones básicos ( $F^-$ ,  $H_2PO_4^-$ ,  $HCO_3^-$ ). Pese a ello algunos polímeros (**2i** y **2j**) responden selectivamente a carbonato.

Como ya hemos mencionado anteriormente el reconocimiento molecular de aniones es de gran interés científico. Uno de los aniones para el cual no han aparecido muchos sistemas de reconocimiento por su poca habilidad para la coordinación es el hidrógenocarbonato. Este anión es fisiológicamente muy importante, ya que contribuye a mantener el pH de los fluidos biológicos y participa en la transducción de las señales a nivel intracelular.<sup>17</sup>

Uno de los pocos trabajos publicados referentes al reconocimiento del hidrógenocarbonato es el desarrollado por Fabrizzi y colaboradores recientemente,<sup>18</sup> en este utilizan un complejo no fluorescente formado por la cumarina 343 y el  $Cu^{2+}$ . La concentración de hidrógenocarbonato en este caso se determina mediante un ensayo de desplazamiento, pues la adición de este anión a las disoluciones del complejo tamponadas en agua a pH 7 provoca la liberación del colorante, por lo que se puede medir su fluorescencia.

Otros trabajos en este tema son los descritos por el grupo de Parker y colaboradores. En primer lugar sintetizaron complejos de europio heptadentados basados en ciclen que cambian la intensidad de la emisión en agua con la coordinación del hidrógenocarbonato al europio central.<sup>19</sup> Luego describieron la

---

<sup>17</sup> (a) Y. Chen, M. J. Cann, T. N. Litvin, V. Iourgenko, M. L. Sinclair, L. R. Levin, J. Buck, *Science*, 289, **2000**, 625-628. (b) J. H. Zippin, L. R. Levin, J. Buck, *Trends Endocrinol. Metab.*, 12, **2001**, 366-370.

<sup>18</sup> L. Fabrizzi, A. Leone, A. Taglietti, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 40, **2001**, 3066-3069.

<sup>19</sup> R. S. Dickins, T. Gunnlaugsson, D. Parker, R. D. Peacock, *Chem. Commun.*, **1998**, 1643-1644.

síntesis de complejos macrocíclicos de europio que incorporan acridona como cromóforo, lo cual permite la determinación cuantitativa de hidrógenocarbonato a pH fisiológico.<sup>20</sup>

Además encontramos el trabajo del grupo de Resch-Genger y colaboradores que sintetizan sensores fluorescentes basados en unidades de iminoiltiurea/1,2,4-tiadiazol que muestran un aumento en la intensidad de la emisión provocada por la coordinación del hidrógenocarbonato en metanol, debido a la formación de enlaces de hidrógeno.<sup>21</sup> Recientemente Suzuki y colaboradores describieron la determinación de hidrógenocarbonato mediante la coordinación de este con un dímero formado por dos unidades de pireno unidas a través de una triamina a la  $\gamma$ -ciclodextrina. Este dímero sufre un cambio conformacional en disoluciones acuosas por la interacción con el anión, reflejado en el desplazamiento de la banda de fluorescencia de 475 a 425 nm.<sup>22</sup>

Exceptuando los ejemplos descritos no conocemos otros trabajos donde se utilicen receptores cromogénicos para la detección de hidrógenocarbonato en medio acuoso. Es por esto que decidimos usar los polímeros descritos en este capítulo para este fin.

Los cambios de color observados al añadirles las disoluciones de aniones a todos los polímeros se resumen en la Tabla 2.3. Como puede observarse en esta tabla muchos de los materiales no tienen un comportamiento selectivo, pero su respuesta podría ser útil si se analizan los datos en conjunto para una especie determinada. Los polímeros **2r**, **2s**, **2t** y **2u** muestran un cambio de color de naranja a rojo oscuro ( $\lambda \sim 550$  nm) en presencia de  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{F}^-$  y  $\text{HPO}_4^{2-}$ . Cuando estos mismos polímeros se sumergen en disoluciones del resto de los aniones ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{I}^-$ ,  $\text{CN}^-$ ,  $\text{SCN}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  y  $\text{NO}_3^-$ ) no muestran cambios de color significativos. Los polímeros **2n-2q** también muestran una cierta respuesta frente a estos aniones de forma no selectiva.

---

<sup>20</sup> J. I. Bruce, R. S. Dickins, L. J. Govenlock, T. Gunnlaugsson, S. Lopinski, M. P. Lowe, D. Parker, R. D. Peacock, J. J. B. Perry, S. Aime, M. Botta, *J. Am. Chem. Soc.*, 122, **2000**, 9674-9684.

<sup>21</sup> G. Hennrich, H. Sonnenschein, U. Resch-Genger, *Tetrahedron Lett.*, 42, **2001**, 2805-2808.

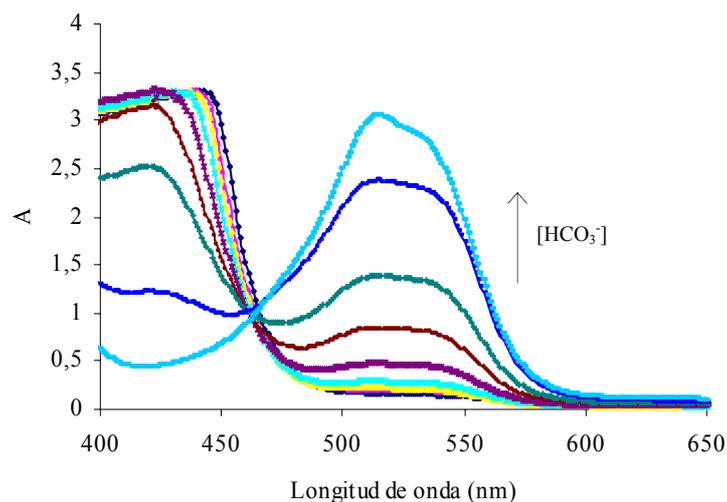
<sup>22</sup> I. Suzuki, M. Ui, A. Yamauchi, *J. Am. Chem. Soc.*, 128, **2006**, 4498-4499.

**Table 2.3.** Cambio de color de los polímeros al sumergirlos en disoluciones acuosas tamponadas a pH 7.5 (HEPES 0.01 mol·dm<sup>-3</sup>) de los diferentes aniones. El color se ha obtenido a partir de fotos de los polímeros.

Polímero	-	F <sup>-</sup>	Cl <sup>-</sup>	Br <sup>-</sup>	I <sup>-</sup>	CN <sup>-</sup>	SCN <sup>-</sup>	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup>	H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
2i	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
2j	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
2n	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
2ñ	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
2o	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
2p	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
2q	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
2r	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
2s	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
2t	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
2u	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

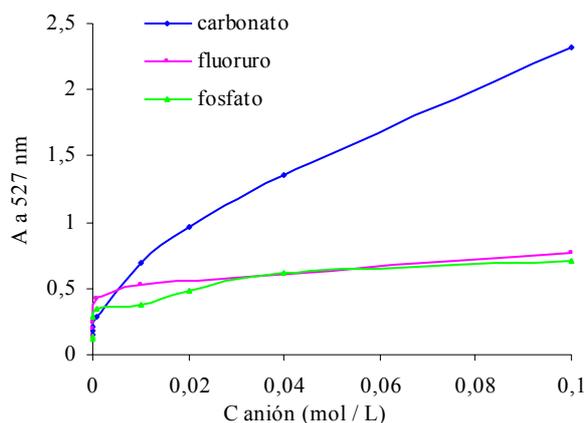
La interacción de **2n**, **2ñ** y **2o** con HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, F<sup>-</sup> y HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup> provoca la aparición de una nueva banda de absorción centrada a 527 nm, responsable del cambio de color de amarillo a rojo observable a simple vista, mientras que para **2p** y **2q** esta nueva banda se observa desplazada batocrómicamente,  $\lambda = 561$  nm, mostrando un cambio de color de amarillo a marrón (a simple vista se observaba un cambio de color a una tonalidad verdosa, que pasaba a marrón y luego a morado, pero en realidad la tonalidad de estos colores es tan oscura que son difíciles de describir).

Los mejores resultados en términos de selectividad, sensibilidad y resistencia química y física se obtuvieron con los polímeros **2i** y **2j**. Estas dos membranas de color amarillo cuando se introducen en una disolución acuosa (pH 7.5, HEPES 0.1 mol dm<sup>-3</sup>) que contiene HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> cambian a rojo. En la figura 2.13 se muestran los cambios en el espectro UV-visible del polímero **2i** al adicionarle cantidades crecientes de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>. La banda del derivado de pirilio centrada en 425 nm va disminuyendo su intensidad con la adición gradual del HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, apareciendo una nueva banda centrada en 527 nm.



**Figura 2.13.** Espectros UV-visible obtenidos al sumergir el polímero **2i** en disoluciones de  $\text{HCO}_3^-$  de concentraciones crecientes (de  $1.0 \cdot 10^{-5}$  a  $1.0 \cdot 10^{-1}$  M) tamponadas con HEPES 0.01 M a pH 7.5.

La figura 2.14 muestra la absorbancia de la banda centrada en 527 nm del polímero **2i** con la adición de varias especies aniónicas. Como se puede observar sólo la adición del anión  $\text{HCO}_3^-$  provocan un aumento significativo de la intensidad de esta banda, mientras que la adición de otros aniones básicos como son el  $\text{F}^-$  y el  $\text{HPO}_4^{2-}$  sólo inducen la aparición de esta sin que alcance gran intensidad. En presencia de los restantes aniones ensayados no se observan cambios de color. De las curvas de valoración de los polímeros **2i** y **2j** con  $\text{HCO}_3^-$  se obtienen los límites de detección para este anión que son  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$  M respectivamente.



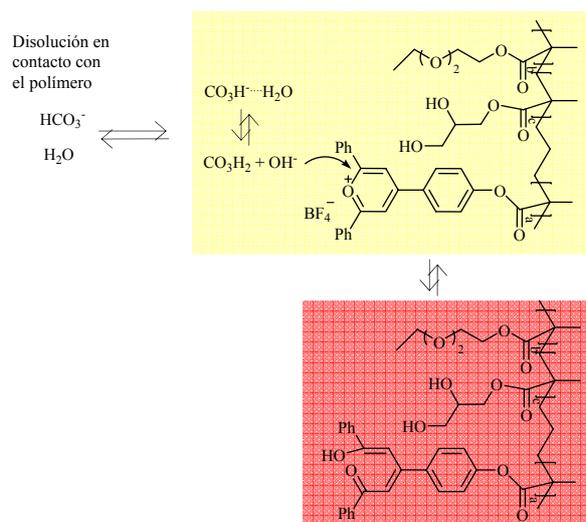
**Figure 2.14.** Cambios en la banda de 527 nm (color rojo) obtenidos al adicionar disoluciones acuosas de  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{F}^-$  y  $\text{HPO}_4^{2-}$  a pH 7.5 al polímero **2i**.

Analizando la respuesta de los polímeros ensayados y su composición (relación molar entre los monómeros **IV**, **V** y **VI**), observamos que la mejor selectividad frente a hidrógeno carbonato (en el caso de **2i** y **2j**) se obtiene cuando los polímeros se preparan usando el monómero **IV**. El resto de los materiales fueron preparados usando el monómero **V** que sólo difiere del **IV** en que tiene dos átomos de oxígeno más, que hacen que tenga menor carácter hidrofóbico.

Cuando se realizan ensayos en disolución con los monómeros utilizados **I**, **II** o **III**, observamos que al añadirles disoluciones de fluoruro, fosfato e hidrógeno carbonato en relación molar 1:1 no se detectan cambios de color, ni en agua ni en acetonitrilo. Sin embargo cuando el monómero se encuentra formando parte de la membrana polimérica si se aprecia el cambio de color.

Si la reacción del monómero **I** se lleva a cabo con un exceso de hidrógenocarbonato de sodio se observa el cambio de color de la disolución de amarillo a rojo. Es de destacar que la banda que aparece al adicionar el hidrógenocarbonato es la misma que la desarrollada con la adición de hidróxidos, lo cual es muy importante a la hora de elucidar el mecanismo de la reacción. El carácter electrofílico del anillo de pirilio hace que este reaccione con el anión hidroxilo nucleófilo para dar lugar al derivado hidroxil-enona de color rojo, que

sería el responsable del color rojo observado.<sup>23</sup> En la figura 2.15 se representa este mecanismo.



**Figura 2.15.** Mecanismo propuesto para el cambio de color observado en los polímeros con la adición de carbonato.

La copolimerización radicalica de los monómeros **IV** y **VI** o **V** y **VI** ocurre con formación de pequeños bloques, constituidos por secuencias de cadenas hidrofóbicas e hidrofílicas. Esto se debe a la cinética de polimerización que tiene lugar y a la diferencia que existe entre los valores de los parámetros de velocidad de los monómeros **IV**, **V** y **VI** [ $(2f)^{1/2}K_p / <K_t>^{1/2} = 0.18, 0.26$  y  $0.72 \text{ L}^{1/2}\text{mol}^{-1/2}\text{s}^{-1/2}$ , respectivamente]<sup>24</sup>. Además, las diferentes conformaciones aleatorias que forma el polímero pueden favorecer la interacción de las unidades lipofílicas e incluso la de las hidrofílicas, para dar microdominios interpenetrados lipofílicos e hidrofílicos.

Los polímeros antes de ser usados en el reconocimiento son introducidos en agua por lo que se hinchan. Los aniones pueden penetrar en el núcleo del polímero hinchado por difusión a través de los microdominios hidrofílicos que contienen gran cantidad de agua.

<sup>23</sup> (a) G. Schwarzenbach, K. Lutz, *Helv. Chim. Acta*, **23**, **1940**, 1147-1162. (b) E. N. Marvell, G. Caple, T. A. Gosink, G. Zimmer, *J. Am. Chem. Soc.*, **88**, **1966**, 619-620.

<sup>24</sup> (a) García, F.; García, J.M.; Rubio, F.; de la Peña, J.L.; Guzmán, J.; Riande, E. *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.*, **2002**, *40*, 3987-4001. (b) García, F.; García, J.M.; Rubio, F.; de la Peña, J.L.; Guzmán, J.; Riande, E. *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.*, **2003**, *41*, 1567-1579. (c) García, F. Ph.D. Dissertation, University of Burgos, Burgos, 2002.

La reacción de los derivados de pirilio con los aniones ocurre en la zona lipofílica de la cavidad del polímero. Una vez que los aniones han penetrado estos por los microdominios hidrofílicos, pueden difundir a las microbases más hidrófobas.

Teniendo en cuenta estas consideraciones podemos proponer el siguiente mecanismo para el reconocimiento de aniones:

- (i) Como primer paso ocurre la difusión del anión del agua al polímero hinchado a través de los microdominios hidrofílicos.
- (ii) Algunos aniones migran de los microdominios hidrofílicos del polímero a los lipofílicos.
- (iii) Aumento del carácter básico del anión en el nuevo entorno (es bien conocido que algunos aniones aumentan su carácter básico cuando se encuentran en disolventes no acuosos lipofílicos).
- (iv) Dentro de la membrana polimérica ocurre una reacción ácido-base entre los aniones ( $A^-$ ) y las moléculas de agua, protonándose el anión ( $HA$ ) y liberándose el  $OH^-$ .
- (v) Finalmente el anión hidróxido nucleofílico ataca el carbono (C-2) adyacente al oxígeno del anillo de pirilio dando lugar a la formación del derivado hidroxí-enona de color rojo.

Estas zonas hidrofílicas y lipofílicas están más definidas en los polímeros que contienen el monómero **IV (2i, 2j)**, al ser este más hidrofóbico. Mientras que el resto de los polímeros estarán menos definidas, siendo en general más hidrofílicos y por lo tanto menos selectivos.

La reversibilidad de la reacción, entre los aniones hidroxilos y el anillo de pirilio, permite la posterior reutilización del polímero con fines de reconocimiento. Después de ocurrir la reacción con el  $HCO_3^-$ , el polímero **2i** de color rojo al ser introducido en una disolución acuosa de ácido clorhídrico  $0.01 \text{ mol dm}^{-3}$  recupera su color amarillo inicial. Este ciclo puede ser repetido más de 5 veces sin que se altere de manera significativa la respuesta colorimétrica del material.

En resumen podemos decir que materiales que contienen el catión pirilio como receptor pueden ser usados para el reconocimiento molecular de especies aniónicas. Controlando la proporción de monómero lipofílico (**IV y V**) e hidrofílico (**VI**) y la electrofilicidad de los diferentes derivados de pirilio es posible diseñar materiales para la obtención de una respuesta general frente a aniones básicos. En particular se puede obtener una respuesta cromogénica selectiva a hidrógenocarbonato en agua pura. Podemos decir entonces que si se continúa el estudio de estos materiales se puede llegar a la detección a simple vista y en

*Sales de pirilio en el reconocimiento de aniones y especies neutras.*

diferentes medios de especies aniónicas como pueden ser el hidrógenocarbonato y el cianuro.

## **2.3 Sales de pirilio usadas para la detección de aminos biógenas.**

### **2.3.1 Aminos biógenas en alimentos y su toxicidad.**

Nuestra dieta contiene cantidades significativas de aminoácidos, aminos biógenas y otros compuestos nitrogenados, presentes de forma natural o producidos como resultado de los procesos tecnológicos a los que se someten muchos alimentos. Las aminos biógenas, principalmente la histamina, son las responsables de la intoxicación que producen algunos alimentos como el pescado, el queso y los embutidos.<sup>25</sup>

Las aminos biógenas son bases nitrogenadas que contienen al menos un grupo amino y tienen origen biológico, pues se sintetizan mediante reacciones enzimáticas. Se obtienen por descarboxilación de los aminoácidos, o bien por reacciones de aminación o trasaminación de aldehídos y cetonas.<sup>26</sup>

Algunas aminos biógenas se forman por biosíntesis, sin participación de ningún microorganismo. Su producción forma parte de diversas rutas metabólicas de animales y plantas. Este es el caso de la putrescina, espermina y espermidina. También se forman por la acción de las enzimas descarboxilasas de los microorganismos, que actúan sobre los aminoácidos.

Además, las aminos biógenas pueden estar presentes en los alimentos originadas por procesos de putrefacción, por lo que en muchos casos se utilizan como índice de calidad.

Las aminos biógenas se clasifican, de acuerdo con su estructura química, en aminos aromáticas y aminos alifáticas. Las aminos aromáticas pueden contener un anillo bencénico o heterocíclico y las alifáticas a su vez pueden dividirse en monoaminas, diaminas y poliaminas, según el número de grupos aminos que contengan.<sup>27</sup> En la figura 2.16 se representa la estructura química de algunas de las aminos biógenas más frecuentes en los alimentos.

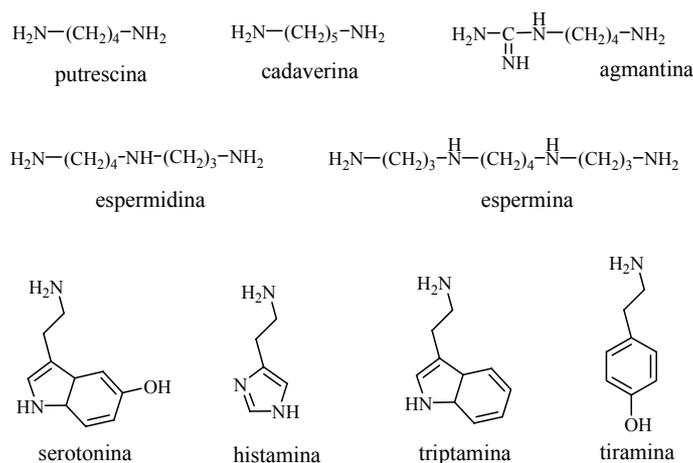
---

<sup>25</sup> S. L. Taylor, "*Histamine Poisoning Associated with Fish, Cheese and Other Foods*", FAO/WHO Monografía VPH/F05/85.1, **1985**.

<sup>26</sup> J. P. Pérez, "*Resultados de aminos biógenas en vinos de variedades canarias*", III Jornadas Enológicas de Canarias, **2006**.

<sup>27</sup> C. Ruiz-Capillas, F. Jimenez-Colmenero, *Critical reviews in food science and nutrition*, **44**, **2004**, 489.

**Aminas biógenas**



**Figura 2.16:** Estructura química de poliaminas naturales y aminas biógenas.

Las aminas biógenas, si se consumen en elevadas cantidades, pueden producir náuseas, calor súbito, sudoración, dolor de cabeza e hiper o hipotensión. El contenido de aminas biógenas de los alimentos debe mantenerse siempre en los niveles adecuados para cada uno de ellos.

Entre las monoaminas que contienen los alimentos encontramos la metilamina, etilamina, isopropilamina, isobutilamina, isoamilamina, hexilamina y etanolamina. Este grupo de aminas por su volatilidad son muy importantes sensorialmente, pero tienen poca actividad biológica.

Las aminas biógenas pueden estar presentes en alimentos en mayor o menor proporción, particularmente en pescados y productos derivados de éstos, queso, carne y productos fermentados<sup>28</sup>. Los valores de algunas de las aminas biógenas publicados para estos alimentos se muestran en la tabla 2.4.

<sup>28</sup> S. Eerola, R. Hinkkanen, E. Lindfors, T. Hirvi, *Journal of AOAC International*, 76, 1993, 575.

**Tabla 2.4.** Rango de contenido de aminas biógenas ( $\text{mg L}^{-1}$  o  $\text{mg kg}^{-1}$ ) en diversos alimentos.<sup>29</sup>

Alimentos	Histamina	Tiramina	Putrescina	Cadaverina
Quesos	nd-5630	nd-4200	nd-634	nd-405
Embutidos crudos fermentados	tr-357	nd-1500	nd-395	nd-409
Pescado fresco	nd-19.75	nd-2.25	nd-4.9	nd-12.6
Pescado congelado	nd-894	nd	nd-5	15-146
Conservas de pescado	nd-2400	nd-600	nd-115	nd-270
Vino Blanco	nd-13	nd-7.5	0.7-21.4	0.3-108
Vino Tinto	nd-21.1	nd-15.9	0.6-11.1	nd-47

nd - no determinada

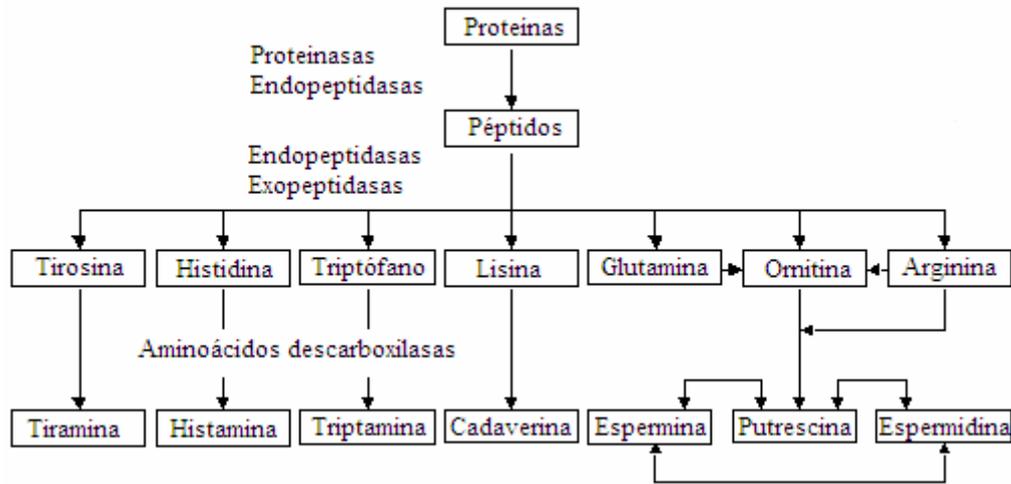
tr - trazas

La cantidad de aminas biógenas formadas está influenciada por factores como el desarrollo microbiano, la disponibilidad de aminoácidos libres, la presencia de enzima descarboxilasa y condiciones de elevada temperatura.<sup>30</sup> Por ejemplo, la enzima involucrada en la producción de histamina, encargada de la descarboxilación de la histidina, requiere temperaturas mayores de 15 °C, con una temperatura óptima de 30 °C.

Si el alimento se contamina con bacterias que producen las enzimas descarboxilasas, los aminoácidos libres sufren la descarboxilación para producir aminas biógenas. Por ejemplo: la lisina es descarboxilada para producir cadaverina y la putrescina puede producirse de varios aminoácidos libres, pero directamente se produce de ornitina. En la figura 2.17 se muestra la cadena de producción de algunas de las aminas que aparecen en los organismos vivos.

<sup>29</sup> A. Mariné, “*Les amines biògens en els aliments: història i recerca en el marc de les ciències de l’alimentació*”, Institut d’Estudis Catalans, **2005**.

<sup>30</sup> A. Halász, A. Baráth, L. Simon-Sarkadi, W. H. Holzapfel, *J. of Food Science and Technology*, **5**, **1994**, 42.



**Figura 2.17.** Esquema de obtención de las aminas biógenas en los organismos vivos.

Además de las incorporadas a través de la dieta, en el organismo se sintetizan gran variedad de aminas biógenas que tienen una gran importancia como receptores y transmisores moleculares.

Las aminas tienen efectos positivos y negativos en el organismo. Así pueden favorecer la formación de otros compuestos con actividad tóxica, como son las *N*-nitrosaminas; pero también son esenciales para el óptimo desarrollo de las células de los mamíferos.

Por su origen microbiano, algunas aminas también pueden utilizarse como indicadores del grado de frescor o alteración de algunos alimentos, como el pescado o la carne, de ahí que el estudio de su presencia en los alimentos tenga un doble valor.

Algunas de estas aminas, como la histamina o la tiramina, que poseen propiedades psicoactivas y vasoactivas, pueden ser causa de intoxicaciones si se ingieren en elevadas cantidades, por encima de 10 mg/L. Los síntomas de la intoxicación por aminas biógenas son hipertensión, dolores de cabeza, trastornos digestivos, circulatorios o cardíacos.

Por ello las últimas directrices en seguridad alimentaria están orientadas hacia la búsqueda de métodos de análisis rápidos, baratos y precisos que sean capaces de detectar compuestos que influyen en la salud humana. Esto permitiría realizar un mejor control durante todas las etapas implicadas en los procesos alimentarios, con lo que se conseguiría una mayor calidad y seguridad del alimento elaborado.

Los métodos más utilizados para el análisis de aminas biógenas son la cromatografía líquida de alta resolución y la cromatografía gaseosa. Estos métodos son costosos, requieren equipos y personal especializado y tiempos de análisis prolongados. Recientemente también se han desarrollado métodos enzimáticos para la detección de histamina en algunos alimentos.<sup>31</sup>

Teniendo en cuenta la reactividad de los anillos de pirilio con nucleófilos nitrogenados se pensó en la posibilidad de emplear ciertos derivados de pirilio como sensores ópticos para la determinación de aminas biógenas. La incorporación de un anillo de pirilio en la estructura de un colorante adecuado puede dar lugar a un receptor que presente una alta deslocalización y que absorba en la zona alta del espectro visible (500-700 nm). Al reaccionar este colorante con una amina se producirá la transformación del anillo de pirilio en sal de piridino, asociada a un cambio de color que permitirá la detección y/o cuantificación de dicha amina. En un futuro, estos receptores pueden constituir la base de una familia de reactivos para la cuantificación de aminas biógenas en alimentos mediante cambios de color. Hay que tener en cuenta pues, que los resultados que se presentan a continuación son preliminares y que quedaría mucha labor de investigación para poder disponer de reactivos que sean ciertamente selectivos en matrices tan complejas como pueden ser las derivadas de alimentos.

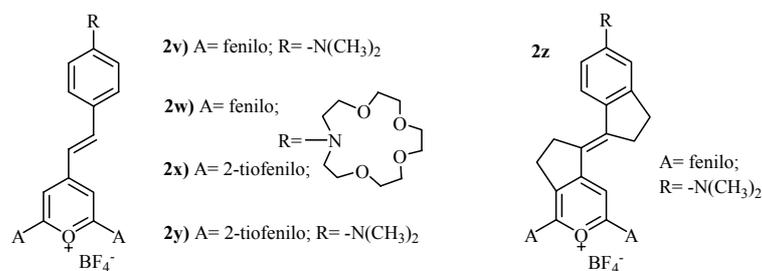
### **2.3.2 Estructura química de los ligandos utilizados para el reconocimiento selectivo de aminas.**

Los ligandos sintetizados por J. L. Bricks y colaboradores<sup>32</sup> que se presentan en la figura 2.18 son cromóforos con un sistema donador-aceptor unido por un puente estirílico. La sal de pirilio, que actúa como unidad aceptora, se encuentra sustituida por anillos aromáticos en las posiciones 2 y 6. Como unidades aceptoras contienen el anillo bencénico para-sustituido por un grupo dimetilamino o el ciclo aza-tetraoxa-pentadecano.

---

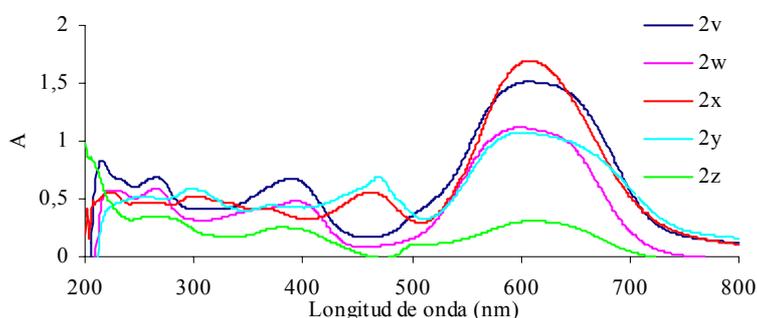
<sup>31</sup> (a) J. J. Rodríguez-Jerez, M. A. Gras, T. Civera, T., *Journal of Food Protection*, 57, **1994**, 1019; (b) J. M. Landete, S. Ferrer, I. Pardo, *Food Additives and Contaminants*, 21, **2004**, 1149.

<sup>32</sup> (a) J. L. Bricks, J. L. Slominskii, M. A. Kudinova, A. I. Tolmachev, K. Rurack, U. Resch-Genger, W. Retting, *J. Photochem. Photobiol. A. Chem.*, 132, **2000**, 193; (b) M. Szczepan, W. Rettig, A. I. Tolmachev, V. V. Kurdyukov, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 3, **2001**, 3555; (c) R. Wizinger, P. Ulrich, *Helv. Chim. Acta*, 39, **1956**, 207.



**Figura 2.18.** Estructura de los cromóforos.

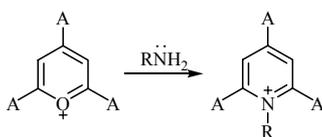
Las características espectroscópicas de estas bases estílicas normalmente están determinadas por el proceso de transferencia de carga intramolecular producido por la absorción de luz. Estos ligandos son de color azul-verdoso, sus espectros UV-Visible se muestran en la figura 2.19.



**Figura 2.19.** Espectros UV-Visible de los ligandos en acetonitrilo.

Las aminas y otras familias de compuestos, que contienen el grupo funcional amino, reaccionan con las sales de pirilio mediante el ataque nucleofílico al carbono adyacente al oxígeno del anillo. Si el amino es primario se obtienen, como productos de la reacción, sales de piridinio (ver figura 2.20).<sup>33</sup> En el caso de los aminoácidos naturales y de las aminas biógenas tendremos al menos, un grupo amino primario formando parte de la estructura molecular. Es de esperar que la reacción de aminoácidos y aminas con los ligandos **2v-z** transcurra con formación de la sal de piridinio correspondiente en cada caso.

<sup>33</sup> (a) C. Toma, A. T. Balaban, *Tetrahedron*, Supp. 7, **1966**, 9; (b) O. M. Kostenko, S. Y. Dmitrieva, O. I. Tolmachev, S. M. Yarmoluk, *J. Fluoresc.*, 12, **2002**, 173.



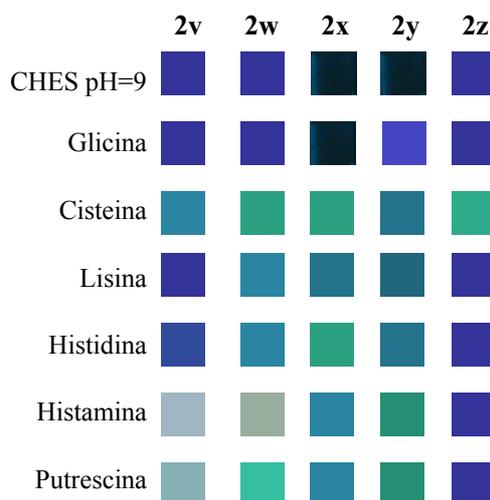
**Figura 2.20.** Formación de las sales de piridinio por reacción de las sales de pirilio con compuestos que contienen grupos amino primarios.

La mayoría de las sales de piridinio presentan un color diferente a la sal de pirilio a partir de la que se obtienen. Por esta razón se han escogido los ligandos representados en la figura 2.18 para estudiar su reacción en disolución con aminoácidos y aminas. Los estudios que se presentan a continuación tienen como objetivo realizar la detección colorimétrica de aminas biógenas en presencia de aminoácidos.

### **2.3.3 Pruebas preliminares. Selectividad frente a aminas en presencia de aminoácidos.**

Primeramente se estudian los cambios de color que tienen lugar cuando los diferentes ligandos se ponen en contacto con disoluciones de aminoácidos y aminas disueltas en agua a diferentes pH. Se observa que a pH entre 9 y 9.5 es donde mejor se diferencian los aminoácidos de las aminas. En este rango de pH las aminas provocan la decoloración de las disoluciones de los ligandos. La mayoría de los aminoácidos no provocan cambios de color en las disoluciones.

Con vistas a determinar entre los reactandos, cuál responde con mayor selectividad, se realizan ensayos con los aminoácidos que en su estructura contienen otros grupos nucleófilos: cisteína (contienen un grupo tiol -SH), lisina (contiene otro grupo amino en la cadena carbonada). Además se prueba la histidina como precursora de la histamina. Estos aminoácidos eran los que provocaban algunos cambios de color a los pH estudiados. En la figura 2.21 se muestra un esquema de los cambios de color que experimentan los ligandos a los 3 minutos de haberles adicionado los aminoácidos y aminas.



**Figura 2.21.** Cambios de color al mezclar 2500  $\mu\text{L}$  de aminoácidos y aminas  $4 \cdot 10^{-4}$  M disueltos en CHES 0.01 M a pH 9 con 400  $\mu\text{L}$  de los ligandos disueltos en acetonitrilo  $2.5 \cdot 10^{-4}$  M.

Como se puede observar el cromóforo **2v** se decolora en presencia de aminas y casi no experimenta cambios de color con los aminoácidos ensayados. La selectividad de **2v** puede estar relacionada con la densidad de carga que presenta el átomo de oxígeno del anillo de pirilio, que por cálculos en el HyperChem<sup>34</sup> se ha observado que es menor que para los otros ligandos (-0.087 para **2v** y -0.1 para **2y**, por ejemplo). La mayor densidad de carga sobre el oxígeno dificulta el ataque nucleofílico mediante fuerzas repulsivas, por lo que el resto de los cromóforos serán menos selectivos. En el caso de **2x** y **2y** los átomos de azufre voluminosos, del anillo de tiofeno, unidos en las posiciones 2 y 6 del anillo de pirilio, también imponen ciertas restricciones estéricas al ataque nucleofílico.

Para comprobar que usando el ligando **2v** se puede obtener una respuesta selectiva a aminas se estudia su comportamiento con todos los aminoácidos naturales. En la figura 2.22 se muestra la foto tomada después de 6 minutos de reacción con las mismas condiciones anteriores. En este caso los aminoácidos cisteína y lisina son los únicos que decoloran parcialmente la disolución, en menor medida que las aminas, que pasado este tiempo han reaccionado completamente con el ligando.

<sup>34</sup> HyperChem™ Release 6.03 for Windows. Molecular Modeling System. Copyright 2000, Hypercube, Inc.

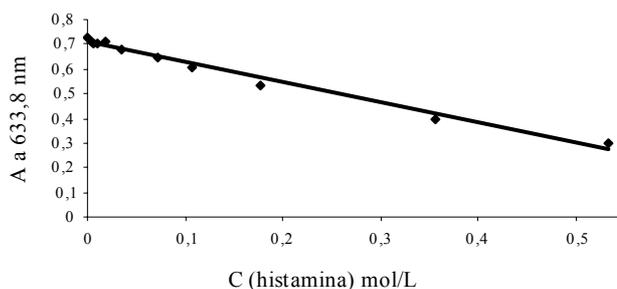


**Figura 2.21.** Cambios de color experimentados por **2v** al adicionarle de izquierda a derecha: CHES pH 9.5, triptófano, ácido D-glutámico, L-arginina, glicina, L-tirosina, L-alanina, L-asparagina, L-valina, L-fenilalanina, L-glutamina, L-prolina, L-serina, L-metionina, L-isoleucina, L-ácido aspártico, L-treonina, L-leucina, L-cisteína, lisina, L-histidina, histamina, putrescina.

Las medidas se realizan después de 2 minutos de adicionado el colorante. Pasado este tiempo la respuesta es más selectiva frente a los aminoácidos que contienen otros grupos nucleófilos (lisina y cisteína). Si se compara la figura 2.22, donde la foto está tomada a los 6 minutos después de adicionado el colorante a las disoluciones de analitos, se aprecia que es mayor la decoloración producida por la cisterna y la lisina que en la figura 2.21. La figura 2.21 representa el cambio de color a los 3 minutos de mezcladas las disoluciones.

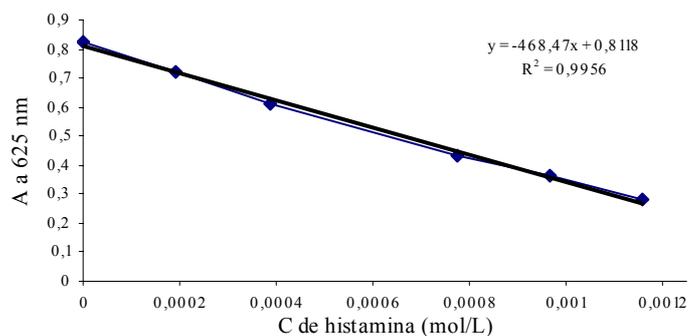
La selectividad observada con el producto puede ser explicada por la diferencia del carácter nucleofílico del grupo amino en los aminoácidos y en las aminas biógenas. El grupo amino en posición alfa que contienen los aminoácidos naturales es menos nucleófilo que el de las aminas, por lo que estas reaccionan más rápidamente con el pirilio. Además el carboxilato es un grupo voluminoso que dificulta la reacción del grupo amino por razones estéricas. También el carboxilato puede interactuar electrostáticamente con el pirilio y esta interacción compite con el ataque nucleofílico del grupo amino. Estas condiciones son favorables a la hora de diferenciar por ejemplo la histamina de su precursor histidina, que sólo se diferencian por la presencia del carboxilato en la histidina.

Para evaluar el posible uso de **2v** en el reconocimiento selectivo de aminas biógenas en alimentos, primero se estudia el comportamiento analítico de este receptor con aminas comerciales. Se determina el rango de concentración de aminas en que su respuesta colorimétrica es lineal, así como el límite de detección para algunas de ellas. En la figura 2.23 se observa la respuesta colorimétrica obtenida al adicionarle cantidades crecientes de histamina a una disolución de **2v**, como vemos esta es lineal en un rango amplio de concentraciones.



**Figura 2.23.** Disminución de la intensidad de la banda a 634 nm de **2v** [ $1.6 \cdot 10^{-5} \text{M}$ ] al adicionarle cantidades crecientes de histamina.

A bajas concentraciones de histamina, que serán las que contienen las muestras alimenticias, podemos decir que obtenemos un buen coeficiente de correlación lineal (0.9956). En la figura 2.24 se representa la respuesta colorimétrica de **2v** al ser adicionado a disoluciones de histamina con concentraciones entre  $2 \cdot 10^{-4}$  y  $1.2 \cdot 10^{-3}$  M. Estas medidas se realizan tamponando las disoluciones de las aminas en agua con CHES 0.01 M a pH 9.



**Figura 2.24.** Disminución de la intensidad de la banda a 634 nm de **2v** [ $1.6 \cdot 10^{-5} \text{M}$ ] al adicionarle cantidades crecientes de histamina en bajas concentraciones.

En colaboración con el Instituto de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo del Departamento de Tecnología de Alimentos de la Universidad Politécnica de Valencia se estudia la respuesta colorimétrica de **2v** al ser adicionado a matrices alimenticias. Se realizan los ensayos con pescados, vinos y jamón curado, que son alimentos propensos a contener niveles de aminas biógenas no aptos para el consumo humano.

#### **2.3.4 Ensayos en pescados.**

En el pescado, como en muchos alimentos, la calidad está condicionada por la apariencia estética y fresca del producto. El grado de deterioro que ha sufrido el pescado después de su captura, o durante el procesado industrial en el caso de los enlatados, es determinante a la hora de evaluar los parámetros de calidad. El establecimiento de niveles de tolerancia, a través de indicadores químicos de deterioro, elimina la necesidad de sustentar en opiniones personales las decisiones relacionadas con la calidad del producto.

El músculo del pescado es un medio muy propicio para la formación bacteriana de una amplia variedad de aminas biógenas, como resultado de la descarboxilación directa de los aminoácidos. La histamina, la putrescina, la cadaverina y la tiramina son producidas a partir de la descarboxilación de la histidina, ornitina, lisina y tirosina, respectivamente. Estas aminas junto con la espermidina y la espermina son encontradas frecuentemente en el pescado, tanto fresco como enlatado. La histamina ha recibido mayor atención desde que ha sido asociada con incidentes de envenenamiento por escómbridos relacionados con el consumo de atún, caballa, mahi-mahi (dorado del Hawaii). Es interesante notar que la mayoría de las aminas biógenas son estables al proceso térmico, por lo tanto, su presencia en productos enlatados terminados es una buena indicación de que la materia prima estaba deteriorada antes de la cocción.

Basándose en episodios de intoxicación, se han propuesto los rangos de concentración de histamina en pescados para el consumo en:<sup>35</sup>

- <5 mg/100 g (apto para el consumo)
- 5-20 mg/100 g (posiblemente tóxico)
- 20-100 mg/100 g (probablemente tóxico)
- >100 mg/100 g (tóxico, no aconsejable para consumo humano)

Desarrollar un método químico que nos de una respuesta inmediata acerca de un parámetro de calidad como es la presencia de aminas biógenas en el pescado sería de gran interés, tanto para la industria como para el consumidor.

Los resultados preliminares para el desarrollo de un método colorimétrico para la cuantificación de aminas biógenas en una matriz alimenticia, como es el extracto obtenido de anchoa enlatada, se muestran a continuación. Para ello se ha utilizado un cromóforo del tipo donador-aceptor basado en un anillo de pirilio **2v**

---

<sup>35</sup> H. H. Huss, “*Assessment and Management of Seafood Safety and Quality*”, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Roma, **2003**.

(tetrafluorborato de 2,6-difenil-4-[2-(4-N,N-dimetilaminofenil) vinyl]-pirilio)) como reactivo colorimétrico. El anillo de pirilio, al sufrir el ataque nucleofílico, se abre perdiendo la banda de transferencia de carga centrada alrededor de 625 nm. La disminución de esta banda es proporcional a la cantidad de aminas biógenas presentes en el alimento estudiado.

Para la preparación del extracto metanólico de anchoa se usan 5g de anchoa triturados en ultraturrax y posteriormente disueltos 50 mL de metanol. La mezcla se calienta durante 15 minutos a 60 °C, se deja enfriar y se diluye hasta un volumen total de 100 mL con metanol. Esta disolución se centrifuga para eliminar las partículas sólidas que quedan.

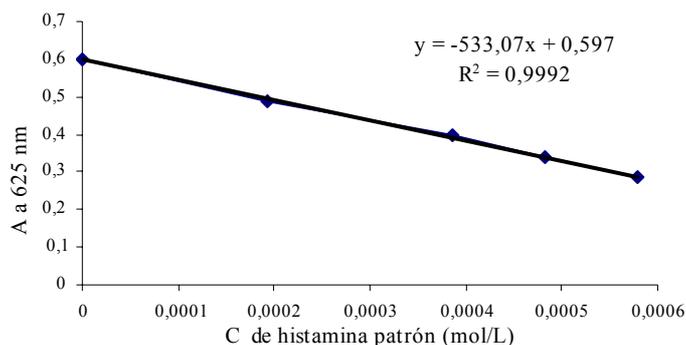
Mediante el análisis cromatográfico llevado a cabo por HPLC, se comprobó la presencia de histamina (aprox. 5 mg/kg) y de otras aminas biógenas en una muestra de anchoa enlatada.

Para el ensayo colorimétrico se preparan diferentes disoluciones metanólicas, de volumen total 130 mL, añadiendo cantidades crecientes de un patrón de histamina 0.02M a 20 mL de extracto metanólico de anchoa. Se tampona con 1600 mL de CHES 0.01 M a pH 9 y se le adicionan 320 mL de **2v** [ $1 \cdot 10^{-4}$  M] en acetonitrilo. Se homogeniza la mezcla y se mide en el espectrofotómetro la absorbancia a 625 nm pasados 2 minutos.<sup>36</sup>

La figura 2.25 muestra la disminución lineal de la absorbancia como consecuencia de la adición de concentraciones crecientes del patrón de histamina sobre el extracto metanólico de anchoa. Podemos concluir que se obtiene una respuesta lineal del colorante a esta amina, por lo que este método se podría utilizar para la evaluación de pescado en mal estado debido a un alto contenido de histamina.

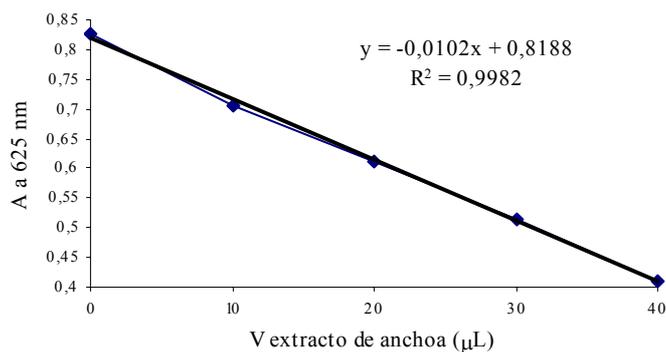
---

<sup>36</sup> Método de la AOAC, LAB/NT2/Abril 2003.



**Figura 2.25.** Efecto de la adición de histamina a un extracto metanólico de anchoa sobre la decoloración del cromóforo **2v**.

Si se añaden cantidades crecientes del extracto de anchoa a una cantidad de colorante fija también se observa un comportamiento lineal en la disminución de la intensidad de la banda situada a 625 nm. En la figura 2.26 se observan los resultados obtenidos si se realiza una experiencia similar a la comentada anteriormente, pero sustituyendo los volúmenes adicionados de patrones de histamina por volúmenes crecientes del extracto metanólico de anchoa.



**Figura 2.26.** Adición de extracto de anchoa a disoluciones del cromóforo **2v**.

De los dos gráficos anteriores se puede concluir que mediante esta técnica colorimétrica se obtiene una respuesta a la presencia de la histamina en una matriz de pescado, y además se comprueba que esa respuesta es lineal con el incremento de la concentración.

Existen otras aminas volátiles que están relacionadas con el deterioro del pescado: la trimetilamina (producida por deterioro bacteriano), la dimetilamina (producida por enzimas autolíticas durante el almacenamiento en congelación) y el amoníaco (producido por desaminación de aminoácidos y catabolitos de nucleótidos). Estas aminas u otros compuestos nitrogenados como aminoácidos, péptidos y proteínas, en caso de encontrarse en una alta concentración con respecto a las aminas biógenas, podrían actuar como interferentes en el método colorimétrico desarrollado.

Para eliminar posibles interferentes con características de hidrofiliidad diferentes a las aminas se incorpora el colorante **2v** en matrices sólidas hidrófobas. Se utilizan un polímero de PVC y un sólido mesoporoso para soportar el colorante. Este trabajo no es objeto de esta tesis, los resultados obtenidos aparecen reflejados en la publicación “Sensory hybrid host materials for the selective chromo-fluorogenic detection of biogenic amines”, ver Anexo IV.

### **2.3.5 Ensayos en vinos.**

El vino según la legislación vigente es el alimento natural obtenido exclusivamente por fermentación alcohólica, total o parcial, de uva fresca, estrujada o no, o de mosto de uva.<sup>37</sup> La elaboración del vino se inicia con la vendimia. Después de la recolección se procede al despalillado, separando los granos de uva de los raspones del racimo, seguido por el estrujado y un prensado para obtener el mosto que pasa directamente a los depósitos para llevar a cabo la fermentación, proceso en el que el azúcar del mosto se transforma en alcohol y anhídrido carbónico. Los vinos blancos se fermentan sin la presencia de los hollejos o piel de la uva, a temperaturas inferiores a 18 °C y se almacenan a temperaturas no menores a 5 °C para luego ser embotellado y comercializado.<sup>38</sup>

La diferencia en la elaboración de los vinos tintos de los blancos es una segunda fermentación, en la que el ácido málico se transforma en ácido láctico, así como la presencia de la piel de la uva que da el color y aroma al vino tinto. Además, se someten a crianza en barricas de roble y posteriormente maduran en botella.

En los vinos, como en otros alimentos fermentados, la presencia de aminas biógenas es habitual. La ingestión de vino con altos contenidos de aminas biógenas

---

<sup>37</sup> Orden del 11 de Julio de 2003. Núm. 165. Ley 24/2003, *Boletín Oficial del Estado*, **2003**.

<sup>38</sup> J. L. Aleixandre, “*Vinos y Bebidas Alcohólicas*”, Editorial Universidad Politécnica de Valencia, **1999**, 91-134.

causa malestar, principalmente dolor de cabeza en los consumidores y además altera las características organolépticas del vino.

Las aminas están presentes de manera natural en el vino provenientes de las uvas. En las uvas se han encontrado fundamentalmente putrescina y espermidina. Existen evidencias de la formación de aminas durante la fermentación maloláctica, donde se observa la disminución de la concentración de aminoácidos y el aumento de la de aminas biógenas.<sup>39</sup> Además, algunos autores han verificado la formación y la acumulación de aminas durante la fabricación del vino, por falta de higiene durante la vinificación. En cualquier caso, las aminas biógenas podrían ser un indicador de la calidad de la materia prima, así como de las buenas practicas de fabricación del vino.<sup>40</sup>

Actualmente el análisis de la composición de los vinos se realiza usando diferentes métodos analíticos, los cuales en muchos casos requieren un equipamiento costoso y tratamientos previos de la muestra muy engorrosos.

El desarrollo de un método óptico para la detección de aminas en el vino sería de gran interés, tanto para los enólogos como para los consumidores. Sobre la base de los resultados presentados anteriormente del uso cromóforos conteniendo anillos de pirilio en la detección de aminas biógenas, se intenta correlacionar la respuesta colorimétrica con el contenido de aminas biógenas en vinos.

En el presente estudio se utilizaron 20 muestras de vinos blancos y 20 de tintos de diferentes procedencias. Los ensayos con vinos tintos se realizan decolorándolos con carbón activo y sin decolorarlos, para estudiar la posible interferencia del color original del vino en las medidas.

Como reactivo colorimétrico se utiliza tetrafluorborato de 2,6-difenil-4-[2-(4-*N,N*-dimetilaminofenil)vinil]-pirilio (**2v**). El procedimiento más utilizado para la cuantificación de aminas biógenas en alimentos es la cromatografía iónica. Usamos este método como referencia para conocer el contenido de las aminas biógenas en las muestras de vino utilizadas.

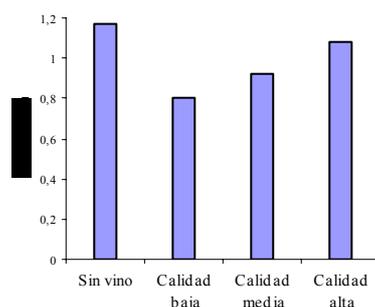
Para realizar las medidas de absorbancia se toman 600  $\mu\text{L}$  de vino, 1500  $\mu\text{L}$  de CHES 0.01M a pH 9.5 para tamponar la disolución y 400  $\mu\text{L}$  de **2v**, *tetrafluorborato de 2,6-difenil-4-[2-(4-*N,N*-dimetilaminofenil)vinil]-pirilio*,  $1 \cdot 10^{-4}$  M disuelto en acetonitrilo. Se homogeniza la mezcla y se mide a los 2 minutos en el espectrofotómetro.

---

<sup>39</sup> S. Souza, K. Theodoro, E. Souza, M. Abreu, *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 28, **2005**, 53.

<sup>40</sup> E. Soufleros, M. L. Barrios, A. Bertrand, *Am. J. Enol. Vitic.*, 49, **1998**, 266.

Para comenzar tomamos muestras de vino de diferentes calidades (vino de mesa, vino de precio intermedio y vino de alto precio) para realizar un ensayo. En la figura 2.27 se muestran los resultados obtenidos al medir la absorbancia a 625 nm. El vino de mayor calidad utilizado en este estudio se comercializa como un vino apto para pacientes sensibles a la histamina. La casa comercial asegura la ausencia de este tipo compuesto por las extremadas condiciones higiénicas utilizadas durante su fabricación. En el laboratorio, por HPLC, se demostró que el contenido de histamina para este vino era menor de 0.01 mg/kg. El vino de mayor calidad prácticamente no decolora la disolución del cromóforo, mientras que el de más baja calidad es el que mayor decoloración produce.

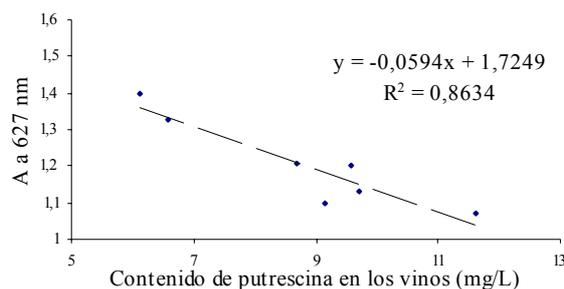


**Figura 2.27.** Efecto de la calidad del vino sobre la decoloración del cromóforo.

Este estudio preliminar pone en evidencia la posibilidad de utilización del colorante **2v** para la determinación rápida de la presencia de aminas biógenas en vinos.

La amina que esperamos encontrar en mayor proporción en los vinos es la putrescina, para comenzar los experimentos sólo tenemos en cuenta el contenido de esta amina. Se comparan los datos obtenidos mediante una curva de calibrado del contenido de putrescina en los vinos con el resultado de la cromatografía iónica. En la figura 2.28 se muestran los resultados obtenidos para los vinos blancos. Para los vinos blancos se obtiene una mejor respuesta que para los tintos, hay una buena correlación entre los resultados obtenidos por ambos métodos. Sin embargo para los vinos tintos no se obtiene correlación ninguna, este resultado puede deberse al contenido de otras aminas en el vino, que es diferente en los blancos y en los tintos. Cualquier otra amina primaria presente en el vino va a reaccionar con el reactivo

cromogénico, por lo que la comparación con el contenido de putrescina solamente vemos que no es útil para continuar el desarrollo del método.

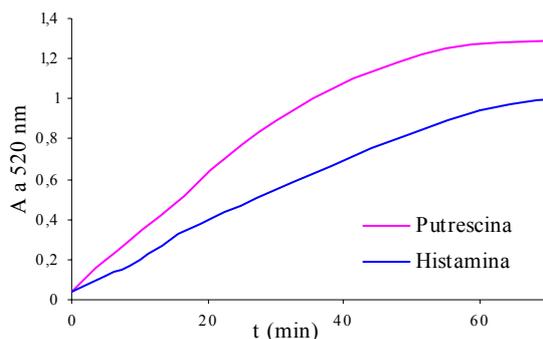


**Figura 2.28.** Relación entre las medidas de absorbancia y el contenido de putrescina en los vinos blancos.

Para intentar eliminar la posible interferencia debida a los aminoácidos u otros nucleófilos polares presentes en la matriz de los vinos se introdujo el colorante en una matriz hidrófoba de PVC. De esta forma solamente los nucleófilos menos polares serán capaces de difundir desde la disolución hasta el interior de la matriz de PVC y dar la reacción con el reactivo cromogénico inmovilizado en el interior.

Para la obtención de la membrana se disuelven en 100 mL de tetrahidrofurano (THF) 0.5 g de cloruro de polivinilo (PVC), 0.5 g de nitrofeniloctiléter (NPOE), y se adiciona un 2% del colorante *tetrafluorborato de 2,6-difenil-4-[2-(4-N,N-dimetilaminofenil)vinil]-pirilio (2v)*. Se agita hasta disolución total de todos los componentes de la mezcla, se vierten 15 mL en cápsulas Petri de 5.5 cm de diámetro interior y se deja evaporar el disolvente lentamente. Luego se procede a despegar la membrana del vidrio con precaución para evitar daños en las mismas.

Se obtienen membranas poliméricas hidrófobas que permiten una mayor selectividad frente a las aminas en presencia de aminoácidos. Esto se comprueba introduciendo estas membranas en disoluciones concentradas de aminoácidos y aminas. En presencia de aminas la membrana cambia rápidamente de color, pasando de verde a rojo, mientras que con los aminoácidos se mantiene el color inicial (figura 2.29). Se comprueba que el pH del medio no interferirá en las medidas poniendo en contacto el polímero con una disolución a pH 9.5, que será el pH de trabajo, y no se observan cambio de color.



**Figura 2.29.** Cambio de color de verde a rojo (banda a 520 nm) de la membrana polimérica en disoluciones de histamina y putrescina.

Esta membrana se divide en trozos iguales, cada trozo se introduce en 4 mL de vino tamponado a pH 9.5 y se calienta a temperatura de 60 °C durante 30 minutos para realizar las medidas colorimétricas. La diferencia de color se mide en un espectrocolorímetro por reflectancia. Como blanco para las medidas se toma un pedazo de polímero que ha estado en una disolución del CHES a pH 9.5.

Utilizando estas membranas nuevamente se observa correlaciones entre la cantidad de putrescina comercial añadida a una muestra de vino y la respuesta colorimétrica del material. Sin embargo, cuando se realizan los ensayos con vinos a los que previamente se les ha determinado la cantidad de putrescina que contienen por cromatografía iónica no podemos establecer una buena correlación.

Estos resultados nos conducen a pensar que los principales interferentes en la cuantificación de las aminas biógenas presentes en los vinos, no son los aminoácidos, ya que estos no penetran en la membrana y sin embargo no conseguimos obtener una relación lineal del cambio de color con la concentración de aminas. Usando estos polímeros si se puede cuantificar la cantidad de amina presente en una disolución en las condiciones de trabajo, como se ha observado en la obtención de la curva de calibrado con putrescina. Sería interesante continuar el estudio para detectar posibles interferentes e intentar eliminarlos. Además se podría probar soportar el sensor cromogénico en otro material que aumente la selectividad por tamaño y no sólo por hidrofilia/hidrofobia.

### **2.3.6 Ensayos en carnes.**

Entre los alimentos que pueden presentar un alto contenido de aminoácidos libres totales y aminos biógenas se encuentran los derivados cárnicos. Se ha escogido el jamón curado por ser un alimento en el que se han descrito casos de intoxicación debido a su ingestión.

El proceso de elaboración del jamón curado consta de varias etapas: el despiece, la salazón, el post-salado o el secado al natural y la maduración o envejecimiento en bodega.

Las cualidades bromatológicas del jamón curado: textura, aroma, y sabor, son el resultado de transformaciones experimentadas por las proteínas y las grasas en el transcurso de todo el proceso de fabricación, pero de modo especial durante el período de secado. Todo ello exige un tiempo y unas condiciones que deben ser cumplidas para obtener jamones de buena calidad y que no se suelen dar en los procesos actuales de curación rápida, aunque aparentemente la aplicación de un estufaje<sup>41</sup> parezca, equivocadamente, que el jamón adquiere unas cualidades organolépticas propias del producto acabado. En realidad los jamones de curación rápida ofrecen una peor calidad bromatológica y ello se debe a que el proceso de estufaje representa, en la práctica, una simple fusión de grasas en la que se distribuyen por la masa muscular, pero hasta ahora no representa una alternativa de las reacciones propias de las proteínas y grasas, conducentes a la formación del aroma específico. Por ello el estufaje tiene una repercusión sobre el aspecto del jamón, pero no sobre las cualidades organolépticas, porque apenas influye sobre la degradación de las proteínas y sus transformaciones.

Hay que tener en cuenta que las proteínas sufren una proteólisis mediante la acción de enzimas que se encuentran en el mismo tejido muscular tales como las catepsinas, aunque en algunas ocasiones también pueden proceder de microorganismos presentes, como las pseudomonas que son bacterias proteolíticas. Desde luego hay factores que regulan la velocidad e intensidad de estas reacciones proteolíticas: cantidad de enzima presente, contacto del enzima con la proteína, agua disponible, temperatura, inhibidores del enzima, etc. Y además se producen reordenaciones de aminoácidos dando nuevos tipos de péptidos que influyen de

---

<sup>41</sup> Estufaje: Etapa del secado-maduración de los jamones donde se alcanza la mayor temperatura (18-30 °C, aunque puede ser hasta de 35 °C). El proceso de secado-maduración tiene como objetivo provocar la deshidratación y la intensificación de la proteólisis y la lipólisis. F. Sánchez-Molinero, *“Modificaciones tecnológicas para mejorar la seguridad y calidad del jamón curado”*, Tesis Doctoral, Universitat de Girona, **2003**.

modo distinto en la textura. No debemos olvidar que en esta fase tecnológica, el jamón debe tener una flora microbiana reducida, por lo que el aporte de enzimas microbianos debe ser escaso. También la textura del producto y la baja actividad de agua no permiten el contacto eficaz enzima-proteína, ni el agua disponible posibilita las reacciones proteolíticas. Además, si hay presentes iones nitratos o nitritos, la velocidad de reacción enzimática queda también reducida. Todo ello hace que la contribución proteica al aroma del jamón curado sea muy lenta y el período secado-maduración, forzosamente, deba ser prolongado.<sup>42</sup>

Los aminoácidos libres han sido reconocidos como precursores de muchos compuestos del aroma. La concentración de aminoácidos libres en los jamones aumenta con el envejecimiento y han sido relacionados con la salazón de los jamones.

Sólo una pequeña fracción de este aumento de aminoácidos libres se debe a la actividad proteolítica de los microorganismos en los jamones a causa de su crecimiento limitado al descender el contenido en agua durante la curación. El aumento de esos aminoácidos se debe principalmente a los enzimas hidrolasas proteolíticas, tales como, catepsinas, carbohidrasas, nucleasas y peptidasas que están en el tejido muscular, siendo las más importantes, por su actuación, las catepsinas y las peptidasas.

Las aminas biógenas tienden a estar presentes en mayores cantidades entre los 9 y 10 meses de curación. Desde el punto de vista de la salud humana estos niveles suelen ser menores que los considerados tóxicos, >50-100 ppm de histamina<sup>43</sup> y > 80-100 ppm para la tiramina.<sup>44</sup> Es importante considerar que en condiciones normales el organismo es capaz de eliminar la tiramina y la histamina absorbida de los alimentos por acetilación y oxidación mediante las enzimas monoamina, diamina y poliamina oxidadas. Pero gran cantidad de la población (20% en la población europea) consume medicamentos inhibidores de la actividad de estas enzimas como antidepresivos, lo que contribuye a que aumente el potencial tóxico de estas aminas. La putrescina y la cadaverina, también presentes en el jamón, aunque no son tóxicas consideradas individualmente si que pueden aumentar el efecto de la histamina y la tiramina por interacción con las aminooxidasas. Otras

---

<sup>42</sup> F. Sánchez, “*Modificaciones Tecnológicas para Mejorar la Seguridad y calidad del Jamón Curado*”. Tesis Doctoral, ISBN: 84-689-2573-X, **2003**.

<sup>43</sup> FDA, “*Fish and Fisheries Products Hazard and Control Guide*”, *Food and Drug Administration*; 1ª, Ed.: Office of Seafood, Washington, DC, **1996**.

<sup>44</sup> C. M. Alfaia, M. F. Castro, V. A. Reis, J. M. Prates, I. T. de Almeida, A. D. Correia, M. A. Dias, *Food. Sci. Tech. Int.*, 10, **2004**, 297.

sustancias como el alcohol y el acetaldehído también aumentan el efecto tóxico de las aminas biógenas, ya que promueven el transporte de estas a través de la pared intestinal.

Conocer el contenido de aminas biógenas después del proceso de curación del jamón es de gran importancia debido a todas las implicaciones para la salud del consumidor observadas a niveles altos de estas, como se explicó en la introducción de este capítulo.

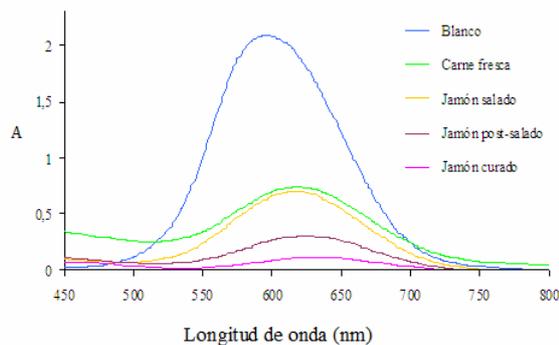
Para las medidas cromatográficas se toma una muestra directamente de la pieza en proceso de curación del jamón curado o de la carne fresca. La carne fresca la utilizamos como fase inicial del proceso de curación. Se tritura del músculo con una picadora. Se pesan 10 g y se le adicionan 140 mL de HCl 0,01 M. Para homogenizar esta mezcla se utiliza el ultraturrax. Posteriormente se centrifuga a 10000 rpm durante 20 minutos y se filtra la disolución para eliminar la parte sólida que no se ha disuelto. Se toman 15 mL del filtrado, se ajusta a pH 9.5 con NaOH y se lleva a un volumen total de 20 mL. Los extractos preparados de esta forma son los que se utilizan en los ensayos.

Para ajustar las condiciones de las medidas se toman muestras de las diferentes etapas de curación del jamón: carne fresca, jamón salado, jamón post-salado y jamón curado. Se realizan diferentes ensayos con los colorantes **2v-2z**, siendo el **2w** (*tetrafluorborato de 2,6-difenil-4-[2-(4-(13-aza-1,4,7,10-tetraoxaciclopentadecano)fenil)vinil]-pirilio*) el que mejor diferencia presenta entre las muestras escogidas, por lo que es con este colorante con el que se continúan las medidas.

Si a 50  $\mu\text{L}$  de **2w** [ $2.5 \cdot 10^{-4}$  M] disuelto en ACN se le añaden a 750  $\mu\text{L}$  de los extractos de jamón se observan los cambios de color que se muestran en la figura 2.30. Si se realizan las medidas en el espectrofotómetro se obtienen los espectros mostrados en la figura 2.31.



**Figura 2.30.** Cambio de color observado al añadir **2w** a los extractos de jamón, pasados 2 minutos.



**Figura 2.31.** Cambios en el espectro de absorción del colorante **2w** al adicionarle los extractos de jamón a pH 9.5.

Las curvas describen lo esperado; hay una disminución de absorbancia conforme nos desplazamos a lo largo de las etapas de elaboración de jamón curado, debido al aumento de la concentración de aminas biógenas que se produce en el proceso descrito.

### 2.3.7 Consideraciones finales.

La determinación colorimétrica de aminas biógenas en alimentos, usando sensores ópticos tiene gran importancia por la mejora que introduce en cuanto al método de análisis. Conocer el contenido de aminas biógenas en los alimentos es necesario por el riesgo para la salud humana que conlleva su ingestión, fundamentalmente la histamina.

En los alimentos estudiados se ha demostrado la posibilidad del uso de un método colorimétrico, basado en un derivado de pirilio, para la determinación rápida por espectrofotometría de la presencia de aminas biógenas. Se tiene que continuar el estudio de posibles interferentes en cada tipo de alimentos e intentar su eliminación.

Sería conveniente continuar el estudio de los diferentes materiales híbridos mesoporosos a los que se pueden anclar los receptores colorimétricos. Se ha comprobado que el análisis arroja mejores resultados cuando el colorante se encuentra soportado en un material sólido (polímero de PVC) o sólido mesoporoso, que cuando se utiliza disolución. Esto se debe a que los aminoácidos, que actúan como interferentes por encontrarse en mayor proporción que las aminas biógenas, no penetran en los materiales hidrófobos por su carácter zwitteriónico.

### **Capítulo 3. DERIVADOS DE PIRIDINAS EN EL RECONOCIMIENTO DE ESPECIES IÓNICAS.**

#### **3.1 Piridinas 2,4,6-trisustituidas en el reconocimiento de cationes y aniones de interés medioambiental.**

En la Tesis de F. Sancenón G.<sup>1</sup> se comenzó con el estudio de las sales de pirilio 2,4,6-trisustituidas con macrociclos anilínicos en el anillo de la posición 4, para el reconocimiento de cationes metálicos y especies aniónicas. Este tipo de compuestos presenta una banda de transferencia de carga intensa cuando se encuentra en su forma cerrada (sal de pirilio) a 550 nm, la cual desaparece con la apertura del anillo. El color de la forma abierta (pent-2-en-1,5-dicetona) se debe a una banda centrada en 380 nm. En función del pH del medio podemos tener la disolución morada (sal de pirilio) o amarilla (forma dicetónica), el intervalo del pH al cual se produce esta transformación varía en presencia de algunas especies iónicas, por lo que este tipo de receptores puede ser utilizado como sensor cromogénico. En este mismo trabajo se sintetizaron los derivados correspondientes con el anillo de piridina en lugar del de pirilio, observándose que en este caso la banda de transferencia de carga presente entre las unidades dadora (macrociclos anilínicos) y aceptora (anillo de piridina) es mucho más débil ya que el anillo de piridina comparado con el de pirilio tiene un características electroceptoras menos acentuadas, por lo que esta banda de transferencia de carga se encuentra centrada en el UV (380 nm), y sufre un desplazamiento batocrómico con la coordinación de determinados cationes. Como en estos sistemas la aparición del color ocurre asociada al proceso de coordinación de determinadas especies se pensó que sería interesante su uso como sistemas del tipo “on-off” (encendido-apagado) y es por esto que en esta tesis se continúa el trabajo comenzado por Sancenón.<sup>1</sup>

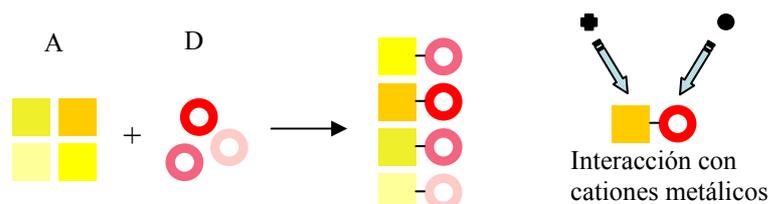
---

<sup>1</sup> F. Sancenón Galarza, “*Receptores funcionalizados con grupos fotoactivos para el reconocimiento molecular de aniones y cationes*”, Tesis Doctoral, Departamento de Química, Universidad Politécnica de Valencia, **2003**.

Estos cromoforos consisten en una unidad de difenilpiridina (unidad aceptora) unida a otra de anilina (dadora) que en algunos casos contiene un macrociclo.

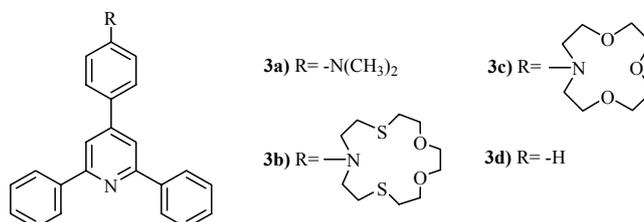
Eligiendo las unidadesceptoras y dadoras apropiadas se pueden obtener receptores selectivos frente a cationes, y además los complejos formados con los cationes se pueden utilizar para el reconocimiento diferencial de aniones.

En la figura 3.1 se muestra la estrategia básica seguida para el diseño de este tipo de sensores. D y A son las subunidades dadora y aceptora respectivamente, unidas mediante conjugación con el ligando auxóromo y fluorescente. Como grupo dador proponemos diferentes anilinas y como aceptor la 2,6-difenilpiridina.



**Figura 3.1.** Diseño de los receptores de tipo donador-aceptor.

Como se observa en la siguiente figura se sintetizaron tres piridinas, 2,6-difenilsustituidas que contienen en posición 4 una anilina, en dos de ellas el grupo anilina se encuentra formando parte de macrociclos de diferente tamaño, que contienen como heteroátomos secundarios O y S. En todos los casos tenemos ligandos ditópicos que contienen dos sitios de coordinación: una unidad monodentada de difenilpiridina y la unidad anilínica.

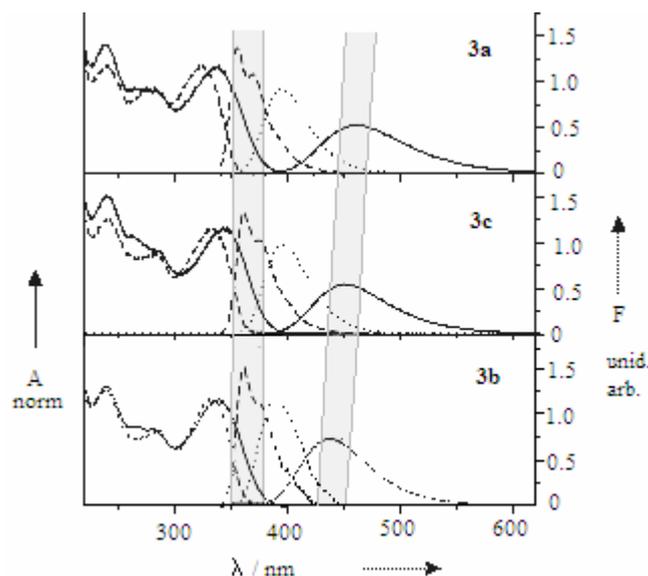


**Figura 3.2.** Estructura de las piridinas sintetizadas.

Los estudios de las propiedades ópticas y electroquímicas de estos compuestos revelan que la unidad dadora de tipo anilina y la aceptora de difenilpiridina están fuertemente conjugadas a través de un enlace interanular. La caracterización cristalográfica del receptor **3b** se describe en la parte experimental.

Se escogieron los compuestos **3a** y **3c** como modelos representativos de la subunidad dadora que contienen solamente un átomo de nitrógeno y conteniendo además átomos de oxígeno (**3c**). Para estudiar el efecto de la presencia de átomos de azufre en el macrociclo se estudia el ligando **3b**.

La figura 3.3 muestra espectros de absorción y emisión representativos de estos ligandos en solventes de diferente polaridad, *n*-hexano, éter dietílico y acetonitrilo. La posición del máximo de emisión en el solvente apolar casi no varía de un ligando a otro, la barra gris de la izquierda en la figura ilustra este comportamiento, mientras que en un solvente polar como el acetonitrilo el máximo de emisión se desplaza batocrómicamente de **3b** a **3a**, barra gris situada a la derecha en la figura.



**Figure 3.3.** Espectros de absorción y emisión relativa normalizados de los compuestos **3a**, **3b** y **3c** en *n*-hexano (líneas discontinuas), éter dietílico (líneas de puntos) y acetonitrilo (líneas continuas).

Los compuestos estudiados presentan las bandas de absorción de menor energía centradas alrededor de 330 nm en *n*-hexano y de 340 nm en acetonitrilo, estas son anchas y poco estructuradas en todos los disolventes en los que se obtuvieron los espectros. En contraste con el ligero solvatocromismo que presentan las bandas de absorción, encontramos que las de emisión si que sufren un elevado corrimiento cuando cambia la polaridad del disolvente, en *n*-hexano la banda está centrada en  $\lambda_{em} \sim 360$  nm y en acetonitrilo en el intervalo de 440 nm a 460 nm. Además, las

bandas de emisión de fluorescencia para todos los compuestos muestran estructura vibracional, y un considerable estrechamiento del ancho de la banda en solventes no polares, indicativo de una mayor uniformidad de la distribución conformacional. Los corrimientos de Stokes aumentan de un promedio de 2500 cm<sup>-1</sup> en un disolvente no polar (*n*-hexano), a 7200 cm<sup>-1</sup> para **3b** y **3c** o incluso 8500 cm<sup>-1</sup> para **3a** en un disolvente altamente polar como el acetonitrilo (Tabla 3.1). Los coeficientes de extinción molar son altos en todos los casos, como valores representativos tenemos 29700/ 26100 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> para **3a** y 26500/23700 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> para **3b** en *n*-hexano y acetonitrilo, respectivamente. Las correspondientes propiedades espectroscópicas están recogidas en la Tabla 3.1.

**Tabla 3.1.** Propiedades espectroscópicas de **3a**, **3b** y **3c** en tres solventes de diferente polaridad a 298 K.

	Disolvente <sup>a</sup>	$\lambda_{\text{abs}}/\text{nm}$	$\lambda_{\text{em}}/\text{nm}$	$\tilde{\nu}_{\text{abs-em}}/\text{cm}^{-1}$	$\Phi_f$	$\tau_f/\text{ns}$
<b>3a</b>	ACN	336	461	8490	0.52	3.73
	éter	329	395	5250	0.47	1.59
	<i>n</i> -hexano	324	359	2770	0.49	1.21
<b>3c</b>	ACN	343	451	7330	0.48	3.29
	éter	337	396	4550	0.50	1.61
	<i>n</i> -hexano	333	365	2370	0.49	1.12
<b>3b</b>	ACN	338	437	7030	0.58	2.86
	éter	335	390	4390	0.56	1.43
	<i>n</i> -hexano	333	364	2370	0.54	1.07

$\tilde{\nu}_{\text{abs-em}}$ . Desplazamientos de Stokes (diferencia entre los máximos de las bandas de absorción y de emisión).

$\Phi_f$  Rendimientos cuánticos de fluorescencia.

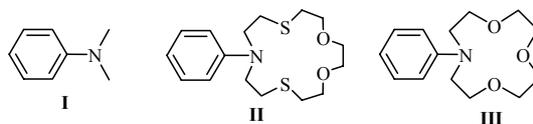
$\tau_f$ . Tiempo de vida de fluorescencia.

<sup>a</sup> Las abreviaturas utilizadas aparecen el apartado de Anexos.

### Medidas electroquímicas.

Se realizó la medida de los potenciales de oxidación y reducción de los ligandos **3a-d**, así como de la *N,N*-dimetilnilina (**I**), y las unidades macrocíclicas de los ligandos **3b** y **3c**, (**II** y **III**, figura 3.4). Todos los experimentos fueron llevados a cabo con electrodo de disco rotatorio en acetonitrilo, 1.0×10<sup>-3</sup> mol/dm<sup>3</sup>. Como

electrodo de trabajo se usó un electrodo de Pt, y de referencia un electrodo de Ag/AgCl separado de la disolución mediante un puente salino que contenía el disolvente y el electrolito soporte ( $0.25 \text{ mol/dm}^3 [\text{Bu}_4\text{N}][\text{ClO}_4]$ ).



**Figura 3.4.** Estructura de los derivados anilínicos utilizados en este capítulo.

La *N,N*-dimetilanilina **I** muestra una oxidación irreversible a 750 mV, con un electrón involucrado. Al sustituir los grupos metilos por los macrociclos el potencial de oxidación aumenta, siendo de 786 mV para el macrociclo que contiene los 3 átomos de O y de 820 mV para el que contiene O y S (**II**).

Un comportamiento similar se observa con los receptores **3a**, **3b** y **3c**, en este caso la onda correspondiente a la oxidación irreversible aparece entre 800 y 900 mV, tabla 3.2. Además las anilino-piridinas estudiadas pueden ser reducidas de forma cuasi-reversible en el rango entre -2200 y -2300 mV. Con el incremento de la sustitución en el nitrógeno anilínico los potenciales de oxidación se desplazan a valores más positivos, por ejemplo cuando pasamos de la dimetilanilina a los macrociclos, esto es indicativo de que el catión está menos estabilizado y que la densidad electrónica en la molécula es menor. Esto confirma la ligera disminución del carácter electrodonador, que se observa en la serie al pasar de **3a** a **3c**, ó de **I** a **III**. Los valores de los potenciales de reducción varían menos pues los sustituyentes en el anillo de piridina permanecen prácticamente constantes en los ligandos estudiados.

**Tabla 3.2.** Potenciales redox de **I**, **II**, **III** y **3a-d** en acetonitrilo.

	$E_{1/2(ox)} / mV$	$E_{1/2(red)} / mV$
<b>I</b>	750	–
<b>II</b>	826	–
<b>III</b>	786	–
<b>3a</b>	816	–2298
<b>3b</b>	876	–2182
<b>3c</b>	840	–2298
<b>3d</b>	-	–2179

En la figura 3.5 se muestran los picos de oxidación y reducción obtenidos para los ligandos **3a** y **3b**. A modo de comparación se incluyen las gráficas correspondientes a la 2,4,6-trifenilpiridina y la *N,N*-dimetilanilina.

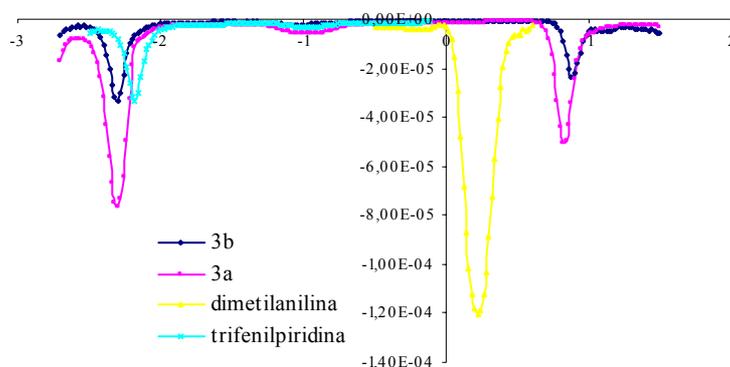


Figura 3.5. Medidas electroquímicas de los ligandos **3a** y **3b**.

### 3.2 Reconocimiento de cationes.

Como se ha visto anteriormente los ligandos estudiados contienen una subunidad anilina y una piridina, por lo que podrían actuar como di-bases, al protonarse cada uno de los nitrógenos presentes. Se conoce que la anilina posee un  $pK_a$  de 4.65 en agua<sup>2</sup> y la trifenilpiridina (**3d**) de 1.84 en etanol-agua 70:30<sup>3</sup>. En este trabajo estudiaremos como la conjugación  $\pi$  entre los dos sistemas y la elección de heteroátomos en el macrociclo puede afectar la protonación.

En la tabla 3.3 se muestran los resultados de la valoración con ácido para los ligandos **3a-c**, realizadas en mezclas de etanol-agua 50:50.

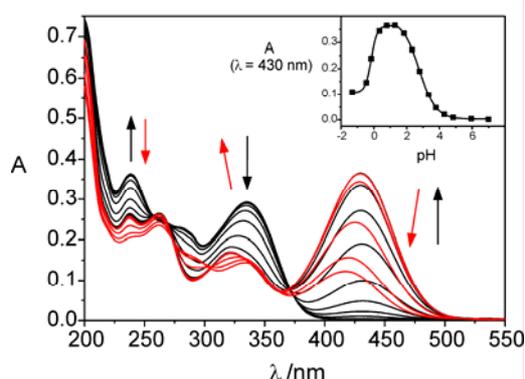
<sup>2</sup> *Critical Stability Constants Vol 2*, Smith, R. M.; Martell, A. E., Eds.; Plenum: New York, 1974.

<sup>3</sup> Katritzky, A. R.; Leahy, D. E.; Maquestiau, A.; Flammang, R. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1983**, 45–48.

**Tabla 3.3.** Medidas de  $pK_a$  y propiedades espectroscópicas de los ligandos **3a-c** en etanol-agua 50:50.

	$pK_a(1)$	$pK_a(2)$	$\Delta pK_a$	$\lambda_{abs}(C-H^+)$ /nm	$\lambda_{abs}(C-2H^+)$ /nm
<b>3a</b>	$3.26 \pm 0.02$	$0.83 \pm 0.02$	2.43	443	334
<b>3b</b>	$2.77 \pm 0.01$	$-0.16 \pm 0.01$	2.93	430	335
<b>3c</b>	$3.54 \pm 0.05$	$1.29 \pm 0.03$	2.25	441	334

Como se puede apreciar en la tabla hay suficiente diferencia entre los  $pK_a$  para poder estudiar los dos saltos por separado. En la figura 3.6 se muestra una curva de valoración típica obtenida para estos ligandos



**Figura 3.6.** Espectros de absorción de **3b** en función del pH,  $7.0 > \text{pH} > 1.3$  curvas en negro,  $1 > \text{pH} > -1.3$  curvas en rojo, medidos en mezclas de etanol-agua 70:30. En el recuadro de la derecha se observa los cambios en el máximo de absorción situado a 430 nm.

Para todos los ligandos se observa que la adición de protones provoca primero el desarrollo de nueva banda en la región de 430–440 nm con el correspondiente cambio del color de la disolución de incolora a amarillo, ver figura 3.6. Si se emplean concentraciones de ácido mayores, la banda sufre un desplazamiento hacia el rojo con pérdida de intensidad y emerge una débil banda en la región de 320–340 nm.

El corrimiento bato- e hipercrómico inicial de la banda de transferencia de carga inducida se puede explicar por la protonación de la unidad de piridina, lo cual incrementa su poder aceptor, lo que hace que disminuya el ángulo de torsión interanular.<sup>4</sup>

<sup>4</sup> Mediante cálculos químico cuánticos se determina que  $\theta$  se reduciría de  $38^\circ$  a  $25^\circ$ .

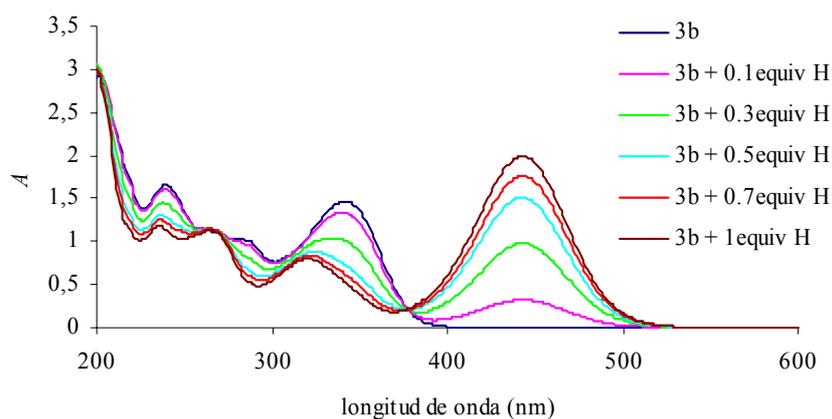
En medio fuertemente ácido ocurre la protonación del nitrógeno anilínico, provocando la pérdida de su carácter dador, por lo que la banda sufre un corrimiento hipsocrómico. El  $\Delta pK > 2$  y la presencia de puntos isobésticos bien definidos sugieren que en todos los ligandos la protonación ocurre sucesivamente y que el orden de basicidad es contrario al esperado en un cromóforo  $\pi$  conjugado.

No se ha encontrado ninguna correlación entre el valor de  $pK_a(1)$  o  $pK_a(2)$  y  $E_{1/2}(ox)$  de **3a** y **3c**. Sólo para **3b** el valor de  $pK_a$  bajo parece ser consecuencia de los procesos redox. Para **3c** el  $pK_a$  depende del tamaño y tipo de heteroátomos presentes en el macrociclo, ya que al tener tres átomos de oxígeno estos permiten la protonación en el nitrógeno anilínico mediante formación de puentes de hidrógeno, por lo que el  $pK_a(2)$  es mayor que en los otros casos. En el ligando **3b** observamos que la presencia de los átomos de azufre voluminosos cercanos al nitrógeno anilínico dificultan la protonación.

Los efectos descritos en disoluciones de etanol-agua son aún más pronunciados en acetonitrilo, donde por ejemplo **3b** si muestra un cambio de color a amarillo con la adición de protones, indicando protonación en la piridina, figura 3.7. El ligando **3c** permanece incoloro y sólo se observa un ligero desplazamiento hipsocrómico de la banda de absorción de 343 a 322 nm. Esto viene a confirmar la teoría de que la protonación de la anilina en **3c** está altamente estabilizada por la formación de puentes de hidrógeno con los oxígenos del monoazatrioxa macrociclo en un solvente aprótico como es el acetonitrilo. Las propiedades espectroscópicas del ligando no sustituido, **3d**, que muestra su máximo de absorción a 315 nm en tolueno y a 310 nm en etanol<sup>5</sup> confirman lo dicho.

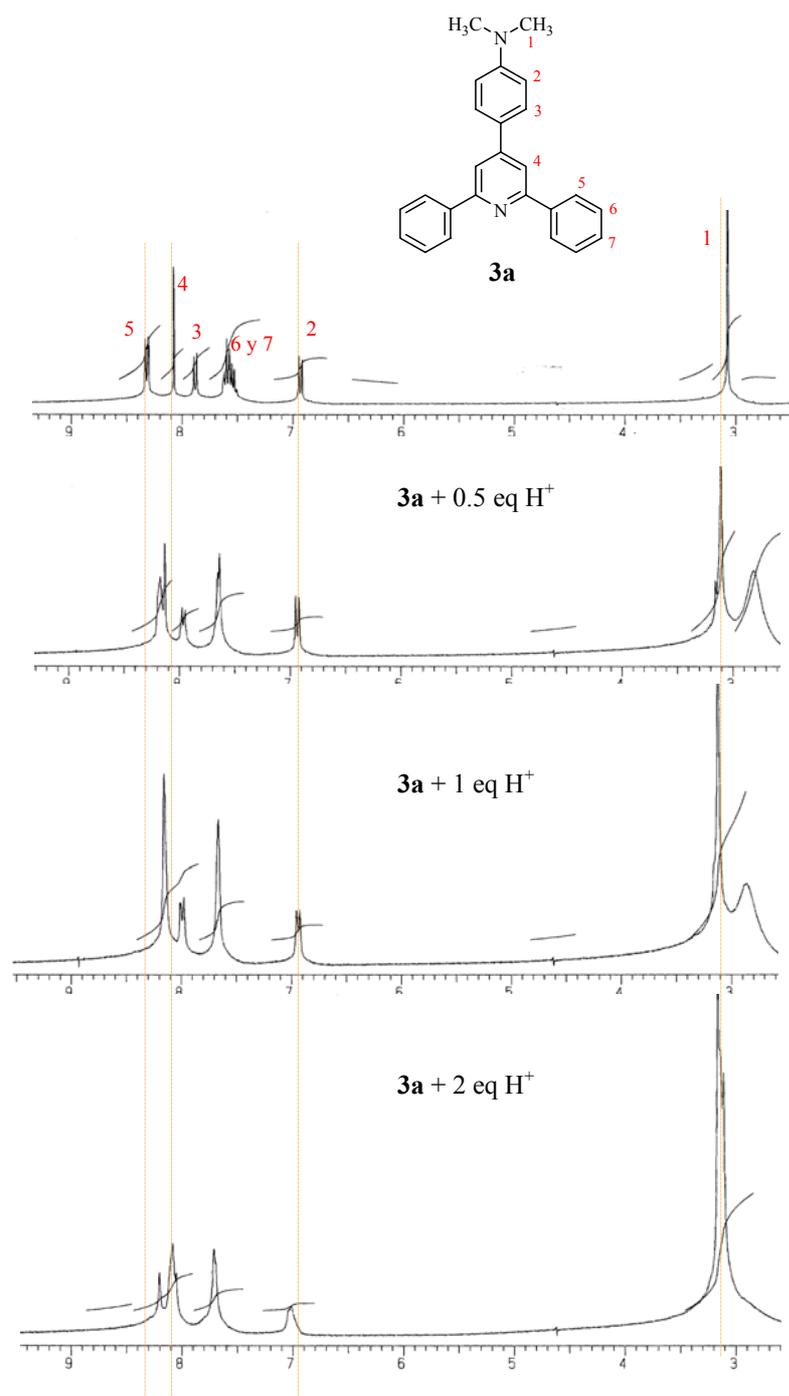
---

<sup>5</sup> Kurfürst, A.; Lhotak, P.; Petru, M.; Kuthan, J. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1989**, *54*, 462–472. Druzhinin, S. I.; Dmitruk, S. L.; Lyapustina, S. A.; Uzhinov, B. M.; Makarova, N. I.; Knyazhanskii, M. I. *J. Photochem. Photobiol., A Chem.* **1992**, *68*, 319–335.



**Figura 3.7.** Efecto de la protonación de **3b** en acetonitrilo.

En el caso de **3a** no se observa una protonación selectiva, al adicionar protones a una disolución de este ligando en acetonitrilo, aparece una banda a 440 nm, pero no se observan puntos isobésticos. Además esta banda tiene una intensidad muy baja ( $\epsilon = 23300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) si se compara con la de **3b-H<sup>+</sup>** ( $\epsilon = 39800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Estas características hacen pensar que la protonación está ocurriendo por ambos sitios, el nitrógeno piridínico y el anilínico. El espectro RMN-<sup>1</sup>H de **3a** realizado en acetonitrilo muestra cambios en las bandas de tanto del anillo anilínico como del piridínico con la adición de ácido sulfúrico, figura 3.8.

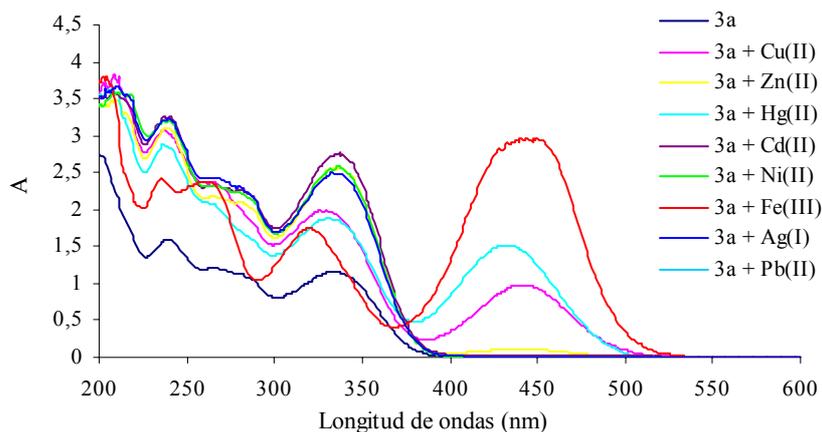


**Figura 3.8.** Desplazamiento de las bandas de RMN- $^1\text{H}$  de **3a** con la adición de protones.

Las medidas de fluorescencia refuerzan la hipótesis que se plantea al analizar los ultravioletas, sobre los sitios donde ocurre la protonación en los ligandos. La protonación de la piridina provoca un desplazamiento batocrómico de la banda de emisión (hasta 580 nm en acetonitrilo). En cambio la protonación del grupo anilino provoca un desplazamiento hipsocrómico de la banda de absorción (para **3c-H<sup>+</sup>** hasta 363 nm), que se corresponde con la disminución de las características dadoras de este grupo.

Los cambios producidos al adicionar cationes metálicos a las disoluciones de los ligandos en acetonitrilo se pueden explicar con el mismo análisis efectuado con la protonación. Así, si la banda de transferencia de carga situada alrededor de 340 nm se desplaza hacia el visible, aproximadamente a 440 nm puede decirse que el catión se ha coordinado con el N piridínico, provocando un aumento del carácter aceptor de este. Si por el contrario, no aparece ninguna banda en la región visible, es porque la coordinación ha ocurrido únicamente por el grupo anilínico. Cuando se produce la coordinación mixta se puede detectar por el pequeño desplazamiento de las bandas y por la ausencia de puntos isobéuticos. Se llevó a cabo el estudio de la coordinación de los ligandos **3a-c**, con diferentes cationes metálicos en acetonitrilo, encontrándose cuatro comportamientos diferentes. En algunos casos se produce coordinación selectiva por la piridina, en otros por la anilina, otros cationes se coordinan por los dos sitios a la vez (mixta) y con otros no ocurre la coordinación.

La adición de cationes metálicos como  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$  a disoluciones de **3a** en acetonitrilo provocan la aparición de una banda a 437 nm pasando la disolución de incolora a amarilla. Esto es indicativo de al menos una coordinación parcial por la subunidad electroceptora de piridina, aunque sólo el  $\text{Zn}^{2+}$  y el  $\text{Pb}^{2+}$  provocan la aparición de claros puntos isobéuticos. La ausencia de puntos isobéuticos en el caso de  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$  sugiere que al menos parcialmente estos se coordinan también por el nitrógeno anilínico.



**Figura 3.8.** Efecto de la adición de cationes metálicos al ligando **3a** en acetonitrilo.

Se realizó la valoración de **3a** con  $Zn^{2+}$  y el  $Pb^{2+}$  añadiendo cantidades crecientes de los cationes a disoluciones  $5.0 \times 10^{-5}$  M del ligando en acetonitrilo. Utilizando estos datos se calcularon las constantes de estabilidad de los complejos formados  $[Zn(3a)]^{2+}$  y  $[Pb(3a)]^{2+}$ . En estos dos casos se asume que se forman complejos de estequiometría 1:1 ligando-metal y utilizando el método de mínimos cuadrados no lineales se pueden ajustar las curvas de valoración para determinar los valores de  $\log K$ , los cuales resultaron  $4.60 \pm 0.20$  y  $4.39 \pm 0.03$  para los complejos de  $[Zn(3a)]^{2+}$  y  $[Pb(3a)]^{2+}$ , respectivamente. Los estudios de RMN- $^1H$  confirman lo descrito anteriormente. Observamos que la adición de cantidades crecientes de  $Zn^{2+}$  a una disolución de **3a** en  $CD_3CN$  provoca sólo pequeños desplazamientos en las señales correspondientes al metilo y a los protones del anillo de anilina (desplazamientos de 0.01, 0.03 y 0.15 ppm, respectivamente), mientras que en la señal del protón del anillo de piridina y de los fenilos unidos a este observamos desplazamientos mayores, del orden de 0.12, -0.26 y 0.10 ppm. Estos datos confirman que la coordinación en este caso se produce con preferencia por el anillo piridínico.<sup>6,7</sup>

<sup>6</sup> J. Herbich, Z. R. Grabowski, H. Wójtowicz, K. Golankiewicz, *J. Phys. Chem.* **1989**, 93, 3439–3444.

<sup>7</sup> En la referencia 6 podemos constatar que Herbich y col. encontraron una coordinación preferencial de los cationes  $Zn^{2+}$  por el nitrógeno pirimidínico de los colorantes dimetilamino-pirimidínicos.

En contraste con estos resultados, los estudios de RMN-<sup>1</sup>H realizados con el mismo ligando **3a** y cationes Hg<sup>2+</sup> sugieren una mayor coordinación por el nitrógeno anilínico, pues los desplazamientos de las señales de los protones vecinos (0.25 ppm para los del metilo y 0.8 y 0.25 ppm para los del anillo de benceno 1,4-disustituido) son mayores que los observados para los protones del anillo de piridina (0.12 ppm) y de los protones de bencenos monosustituidos unidos a esta (-0.20 y 0.15 ppm), aunque como podemos apreciar las diferencias de desplazamientos no son tan acentuadas como en el caso anterior, lo que indica una coordinación mixta, que ya suponíamos que era lo que ocurría por la ausencia de puntos isobésticos en la valoración espectrofotométrica de formación del complejo con Hg<sup>2+</sup>.

Otros cationes de metales de transición como Ni<sup>2+</sup> y Cd<sup>2+</sup> no son capaces de formar complejos, lo cual se evidencia porque la adición de ellos no produce cambios en los espectros UV-Vis de **3a**, ni en el de RMN-<sup>1</sup>H.

El ligando **3c** tiene un comportamiento similar a **3a**, forma complejos 1:1 bien definidos con Zn<sup>2+</sup> y Pb<sup>2+</sup> con logK = 4.29 ± 0.07 y 3.81 ± 0.09, manifestados por la aparición de una banda a 445 nm, mientras que con el Fe<sup>3+</sup>, el Cu<sup>2+</sup> y el Hg<sup>2+</sup> se obtienen unas curvas de valoración más complejas indicativas de la formación de complejos de coordinación metal-anilina y metal-piridina. Nuevamente los cationes Ni<sup>+</sup> y Cd<sup>2+</sup> no muestran interacción alguna con el ligando.

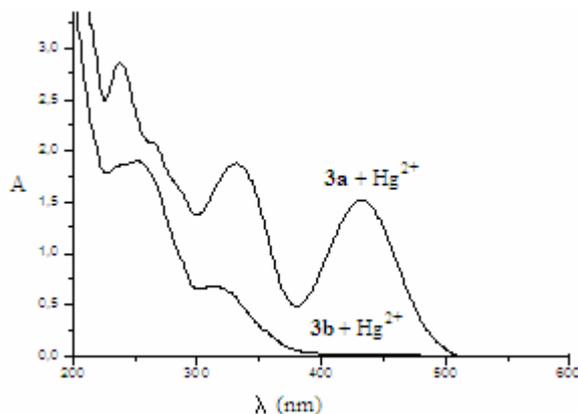
El ligando **3b** se comporta de una manera peculiar, al contener el aza-dioxa-ditia macrociclo este actúa como apantallante frente a la complejación frente a cationes no tiofilicos. Es conocido que este macrociclo tiende a complejar el Hg<sup>2+</sup>, y no muestra tendencia a la coordinación con otros cationes de metales de transición.<sup>8</sup> Debido a la presencia de este macrociclo el resto de los cationes se ven forzados a la coordinación por la piridina, por lo que cationes como el Cu<sup>2+</sup> y el Fe<sup>3+</sup>, que presentan una coordinación mixta con los otros ligandos, ahora al ser adicionados a las disoluciones de **3b** en acetonitrilo, presentan curvas de valoración similares a las obtenidas con la adición de Zn<sup>2+</sup> y Pb<sup>2+</sup>. Con todos estos cationes se obtienen puntos isobésticos bien definidos con el desarrollo de la banda en el visible alrededor de 440 nm. En los cuatro casos la valoración sugiere la formación de complejos ligando-metal 1:1. Los valores de LogK calculados a través del ajuste no lineal por mínimos cuadrados aparecen reflejados en la Tabla 3.4.

<sup>8</sup> a) K. Rurack, A. Koval'chuck, J. L. Bricks, J. L. Slominskii, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 6205–6206; b) A. B. Descalzo, R. Martínez-Máñez, R. Radeglia, K. Rurack, J. Soto, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 3418–3419; c) J. V. Ros-Lis, R. Martínez-Máñez, K. Rurack, F. Sancenón, J. Soto, M. Spieles, *Inorg. Chem.* **2004**, *43*, 5183–5185.

**Tabla 3.4.** Constantes de formación de los complejos de **3b** con cationes.

<i>Complejo</i>	<i>LogK</i>
[Cu( <b>3b</b> )] <sup>2+</sup>	4.60 ± 0.20
[Pb( <b>3b</b> )] <sup>2+</sup>	4.86 ± 0.08
[Zn( <b>3b</b> )] <sup>2+</sup>	4.50 ± 0.20
[Fe( <b>3b</b> )] <sup>3+</sup>	6.6 ± 0.4

Sin embargo cuando a la disolución de **3b** en acetonitrilo se le añade 1 equivalente de Hg<sup>2+</sup> la banda situada a 340 nm se desplaza hasta 310 nm, lo cual atribuimos a la coordinación del Hg<sup>2+</sup> por la subunidad macrocíclica. En este caso, el Hg<sup>2+</sup> induce una disminución en el carácter donador del nitrógeno anilínico puesto que el par electrónico se encuentra participando de la coordinación, con el subsecuente desplazamiento hipsocrómico de la banda de transferencia de carga. La diferencia observada cuando se coordina el Hg<sup>2+</sup> con los ligandos **3a** y **3b** se muestra en la figura 3.9.



**Figura 3.9.** Espectros de absorción obtenidos al adicionar 1 equivalente de Hg<sup>2+</sup> a disoluciones de **3a** y **3b** en acetonitrilo.

Además se realizaron estudios de fluorescencia con algunos de los ligandos en presencia de cationes seleccionados, los cuales reafirman las conclusiones a las que se había llegado al analizar los datos de UV-Vis y de RMN-<sup>1</sup>H. Al igual que los protones los cationes que coordinan con el nitrógeno piridínico inducen un desplazamiento hacia el rojo de la banda de emisión de estos ligandos,

dependiendo de la densidad de carga del catión y de la habilidad de coordinación de este la banda la podemos encontrar entre los 550 y los 580 nm. Por ejemplo para el caso de **3b**, los complejos formados con  $\text{Fe}^{3+}$  y  $\text{Pb}^{2+}$  presentan bandas de emisión situadas en 563 nm para el complejo  $[\text{Pb}(\mathbf{3b})]^{2+}$  y en 582 nm para el de  $[\text{Fe}(\mathbf{3b})]^{3+}$ . El complejo formado por  $[\text{Hg}(\mathbf{3b})]^{2+}$  también difiere en sus propiedades fluorescentes. En contraste con el acentuado desplazamiento hipsocrómico que sufre la banda de absorción del ligando al formar el complejo, la banda de emisión sólo es desplazada moderadamente a longitudes de onda menores (421 nm). Este comportamiento se puede explicar por la descoordinación del catión en el estado excitado. El enlace de coordinación entre el catión y el N anilínico se va rompiendo a medida que progresa el proceso de transferencia de carga, debido al incremento de la repulsión electrostática entre el catión cargado positivamente y la densidad de carga del dador que se ve reducida. Este fenómeno ha sido descrito para otros fluoroionóforos dador-aceptor sustituidos, donde los grupos dadores son receptores de cationes.<sup>9</sup>

En resumen podríamos decir que los estudios de coordinación con protones y cationes ( $\text{M} = \text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  y  $\text{Cd}^{2+}$ ) muestran un desplazamiento de la banda de 340 nm al visible (~ 440 nm) cuando la coordinación ocurre por el grupo piridina, fortaleciendo su carácter aceptor. Por el contrario no aparece ninguna banda en el visible cuando la coordinación ocurre solamente por el grupo anilina. Se encuentran diferentes comportamientos frente a la coordinación, según el grupo dador que contenga la molécula, esta puede ocurrir selectivamente por la anilina (D), selectivamente por la piridina (A), o puede ser mixta A/D. Además se presentan casos de coordinación selectiva como es el de **3b** con  $\text{Hg}^{2+}$ .

### **3.3 Reconocimiento de aniones.**

A causa de la multitud de efectos inducidos por la coordinación, diferentes sistemas cromofóricos ligando-catión metálico (C-M) fueron posteriormente empleados para el reconocimiento diferencial de aniones. Este concepto está basado en la idea de que la adición de un anión (X) a cierto complejo débilmente coordinado C-M, puede ocasionar la formación de un par iónico conjugado (C---M---X), además podría cambiar la preferencia de coordinación por el grupo aceptor

---

<sup>9</sup> (a) K. Rurack, J. L. Bricks, G. Reck, R. Radeaglia, U. Resch-Genger, *J. Phys. Chem. A*, 104, **2000**, 3087–3109; (b) M. M. Martin, P. Plaza, N. Dai Hung, Y. H. Meyer, J. Bourson, B. Valeur, *Chem. Phys. Lett.*, 202, **1993**, 425.

A o dador D, provocar la disociación del complejo, o puede no tener efecto. Debido a las diferentes respuestas de los C-M en presencia de diferentes aniones X, se pueden obtener, mediante el análisis de los cambios en la absorción, datos que conducen a patrones de reconocimiento selectivo de aniones como el acetato, el fluoruro o el cianuro.

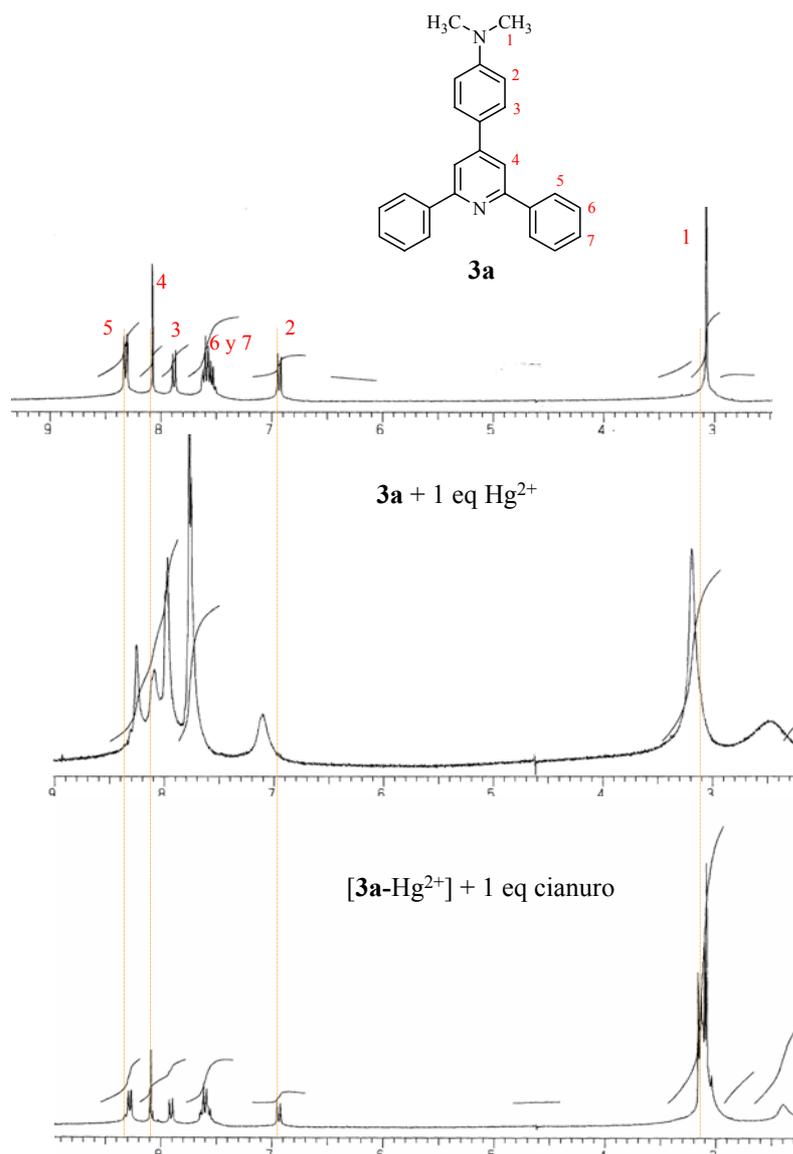
El comportamiento general observado al adicionar aniones a los complejos de los ligandos **3a-c** con  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  y  $\text{Pb}^{2+}$  se resume en la figura 3.10. Los aniones utilizados para este estudio fueron  $\text{F}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{I}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{AcO}^-$  o  $\text{CN}^-$ , en todos los casos se adiciona 1 equivalente de anión a las disoluciones en acetonitrilo de los complejos. Para todos los experimentos se usan sales de cationes metálicos cuyos contraniones tengan bajo poder coordinante y sean solubles en acetonitrilo, como son los percloratos. La misma precaución se toma para las sales de los aniones, en este caso como contracción usamos el tetrabutilamonio que al ser muy voluminoso es débilmente coordinante.

	Sin anión	$\text{F}^-$	$\text{Cl}^-$	$\text{Br}^-$	$\text{I}^-$	$\text{NO}_3^-$	$\text{CN}^-$	$\text{AcO}^-$
<b>3a</b> - $\text{Cu}^{2+}$	●	○	●	●	○	●	○	○
<b>3a</b> - $\text{Zn}^{2+}$	○	●	○	○	○	○	○	○
<b>3a</b> - $\text{Hg}^{2+}$	○	○	○	○	○	○	○	○
<b>3a</b> - $\text{Fe}^{2+}$	○	○	○	○	○	○	○	○
<b>3a</b> - $\text{Pb}^{2+}$	○	○	○	○	○	○	○	○
<b>3b</b> - $\text{Cu}^{2+}$	○	○	○	○	○	○	○	○
<b>3b</b> - $\text{Zn}^{2+}$	○	○	○	○	○	○	○	○
<b>3b</b> - $\text{Hg}^{2+}$	○	○	○	○	○	○	○	○
<b>3b</b> - $\text{Fe}^{2+}$	○	○	○	○	○	○	○	○
<b>3b</b> - $\text{Pb}^{2+}$	○	○	○	○	○	○	○	○
<b>3c</b> - $\text{Cu}^{2+}$	○	○	○	○	○	○	○	○
<b>3c</b> - $\text{Zn}^{2+}$	○	○	○	○	○	○	○	○
<b>3c</b> - $\text{Hg}^{2+}$	○	○	○	○	○	○	○	○
<b>3c</b> - $\text{Fe}^{2+}$	○	○	○	○	○	○	○	○
<b>3c</b> - $\text{Pb}^{2+}$	○	○	○	○	○	○	○	○

**Figure 3.10.** Efecto de la adición de aniones a los complejos formados ligando-catiión metálico C-M.

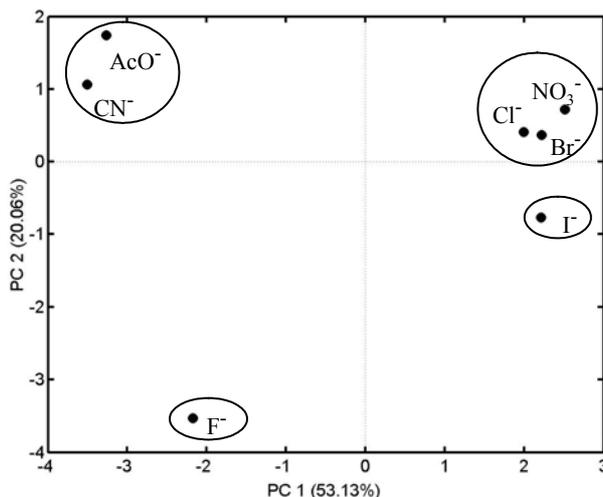
Para confeccionar esta figura de una manera representativa se ha designado el color amarillo oscuro a los complejos C---M---X cuyas disoluciones presentan una absorbancia  $1 \pm 0.2$  para la banda situada a 430 nm, el amarillo claro para los que tienen  $0.5 \pm 0.1$  e incoloro cuando no aparece la banda ( $A = 0 \pm 0.1$ ), los diferentes colores reflejan el grado de interacción de los aniones con los complejos ligando-cación metálico C-M.

Observando la figura 3.10 podemos notar que los aniones tienen un comportamiento diverso, dependiendo del ligando y el catión metálico que esté formando el complejo, exceptuando el  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Br}^-$  que se comportan de manera similar frente a todos los complejos C-M ensayados. Como ejemplo se muestran los espectros de RMN del ligando **3a**, el complejo que forma este ligando con mercurio (II)  $[\text{Hg}(\mathbf{3a})]^{2+}$  y el RMN obtenido al adicionar cianuro a este último (figura 3.11). Las señales de la zona aromática se recuperan, casi con el mismo desplazamiento que en el receptor libre **3a**. En este caso probablemente el cianuro desplaza al mercurio (II) del complejo que forma con el ligando, provocando la ruptura de este.



**Figura 3.11.** Desplazamiento de las bandas de RMN- $^1\text{H}$  del complejo  $[\text{Hg}(\mathbf{3a})]^{2+}$  con la adición de cianuro.

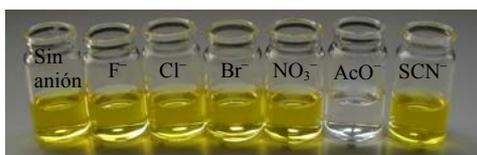
El Análisis de Componentes Principales (PCA) se usa en varias aplicaciones científicas como paso intermedio para análisis posteriores. Se utiliza para estudiar las relaciones que se presentan entre variables correlacionadas, transformando el conjunto original de variables en otro conjunto de nuevas variables. Las nuevas variables son combinaciones lineales de las anteriores y se van construyendo según el orden de importancia en cuanto a la variabilidad total que recogen de la muestra. El análisis de PCA de los datos de absorbancia en este caso lo utilizamos para ver de una manera gráfica diferentes tipos de comportamiento de los aniones, cuando interaccionan con todos los complejos ligando-cation metálico formados, ver figura 3.12.



**Figura 3.12.** Representación del Análisis de Componentes Principales (PCA) para el reconocimiento de aniones por parte de los complejos ligandos-cation C-M (C = **3a**, **3b** y **3c**; M = Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, Hg<sup>2+</sup> y Pb<sup>2+</sup>).

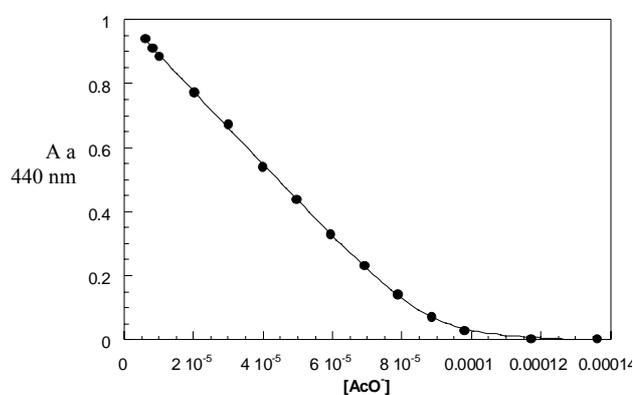
Al analizar las figuras anteriores es evidente que esta familia de ligandos no puede ser usada para el reconocimiento de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup> y Br<sup>-</sup> que provocan un cambio de color muy similar en todos ellos. Pero si se podría llegar a obtener patrones de reconocimiento para el AcO<sup>-</sup>, CN<sup>-</sup>, I<sup>-</sup> y F<sup>-</sup>. Hemos observado varios ejemplos de complejos que son decolorados selectivamente por estos aniones y son los que pasamos a describir a continuación.

El complejo [Pb(**3b**)]<sup>2+</sup> es decolorado selectivamente por acetato y cianuro. Si se añaden disoluciones de aniones monovalentes en acetonitrilo a una disolución de este complejo, el acetato provoca la decoloración de este (Figura 3.13.)



**Figura 3.13.** Adición de un equivalente de aniones a una disolución del complejo  $[\text{Pb}(\mathbf{3b})]^{2+}$  en acetonitrilo.

Este comportamiento permitiría por ejemplo determinar el contenido de acetato en muestras reales como es el vinagre. Se realizó una experiencia adicionando cantidades crecientes de acetato a una disolución de  $[\text{Pb}(\mathbf{3b})]^{2+}$  en acetonitrilo-agua 98:2 v/v obteniéndose una recta de calibrado. Luego una alícuota de vinagre se llevó a pH 7 mediante adición de un tampón, se añadió carbón activo a la disolución, se filtró y se adicionó a la disolución del sensor. La concentración obtenida de ácido acético en la muestra de vinagre fue 5.4 g/100 mL, mientras que la calculada por el método convencional fue 5.2 g/100 mL (figura 3.14).<sup>10</sup>

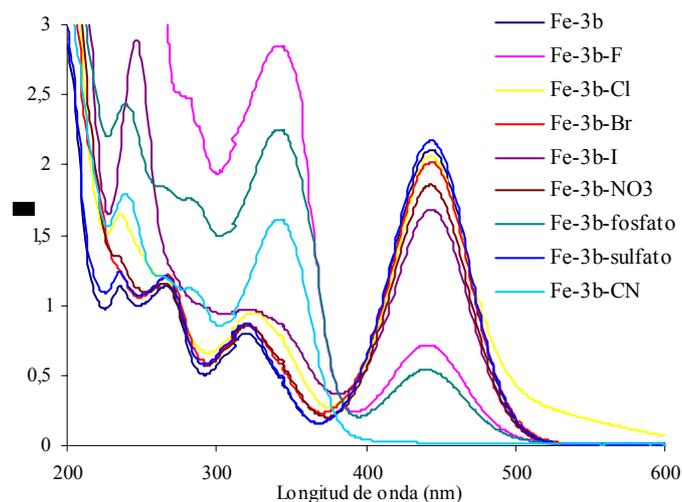


**Figure 3.13.** Variación de la banda de absorbancia a 440 nm para el complejo  $\mathbf{3b}$ -Pb con la adición de cantidades crecientes de acetato en acetonitrilo.

Se llevaron a cabo estudios de tiempo de vida media de fluorescencia para elucidar la razón por la que se decoloran los complejos después de la adición de ciertos aniones, puesto que podría deberse a la disociación del complejo o a la formación de especies ternarias con el anión. Al llevar a cabo estos estudios con el sistema formado por  $[\text{Pb}(\mathbf{3b})]^{2+}$ -X vemos que se forma un sistema ternario, con el Pb y X en forma de par iónico, mientras que el Pb permanece unido a 3b mediante un

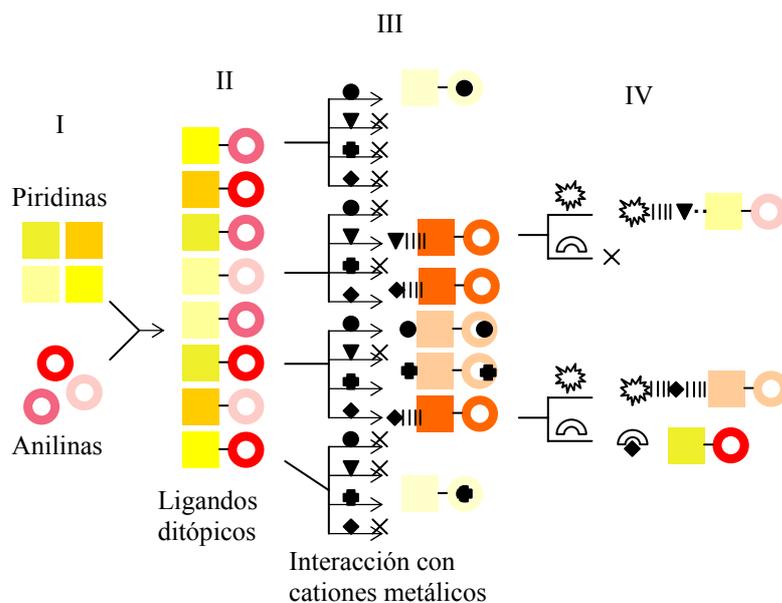
<sup>10</sup> Metrohm Appl. Bull. 084-E, "Titrimetric analysis of vinegar", 2002.

enlace coordinante débil. La valoración del complejo  $[\text{Pb}(\mathbf{3b})]^{2+}$  con acetato en acetonitrilo indica la formación de aductos 1:1 como se observa en la figura 3.14. Otro complejo que es decolorado selectivamente con aniones es el  $[\text{Fe}(\mathbf{3b})]^{3+}$ . El complejo formado por el ligando  $\mathbf{3b}$  con  $\text{Fe}^{3+}$  es de color amarillo intenso. Cuando se adicionan 3 equivalentes de  $\text{CN}^-$  se decolora totalmente. En la figura 3.15 se muestran los espectros de absorción obtenidos al añadir 3 equivalentes de aniones a una disolución de  $[\text{Fe}(\mathbf{3b})]^{3+}$  en acetonitrilo. Como se aprecia en la figura los aniones más básicos (fluoruro y fosfato) también provocan una decoloración parcial de la disolución del complejo. El resto de los aniones no produce alteraciones en el color del complejo.



**Figura 3.15.** Espectros de absorción del complejo  $[\text{Fe}(\mathbf{3b})]^{3+}$  en acetonitrilo con la adición de aniones.

Este trabajo podría servir de base para la confección de una biblioteca de este tipo de ligandos, pues se podrían probar combinaciones de anilinas y piridinas aún no ensayadas, lo cual se representa en la siguiente figura del paso I al II. Algunos de estos ligandos por sí solos podrían servir como ionóforos selectivos para un catión metálico en particular, parte III del esquema, o los complejos formados con los cationes metálicos usados para la detección de aniones, figura 3.16, panel IV.



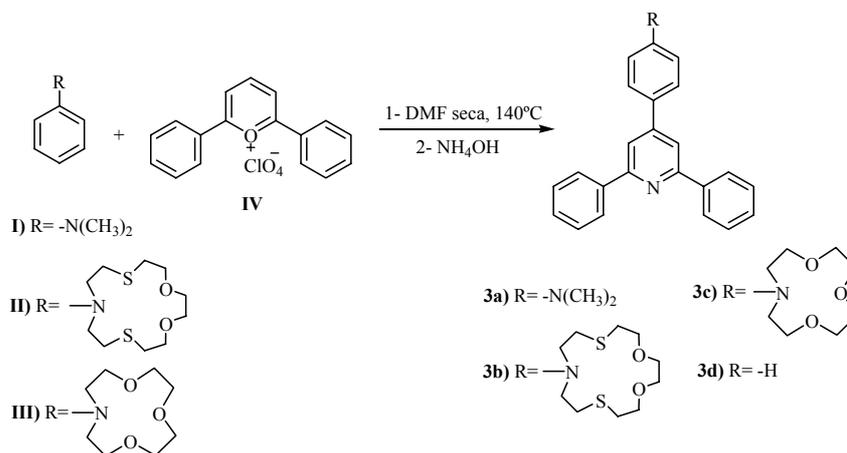
**Figura 3.16.** Representación de los ligandos ditópicos sintetizados y su posible interacción con iones.

En resumen, tal y como se observa en la figura, a través de la unión de anilinas con piridinas sustituidas se obtienen ligandos cromofóricos, caracterizados por una transferencia de carga intramolecular del grupo donador (nitrógeno anilínico) al aceptor (nitrógeno piridínico). Se pueden realizar estudios de selectividad frente a cationes metálicos, obteniéndose cuatro tipos de comportamientos, coordinación por el grupo aceptor, por el dador, mixta o no interacción.

En el caso de coordinación del catión metálico por el grupo aceptor del ligando, aunque no ocurre de forma específica, si provoca un aumento en el carácter electroceptor de este, favoreciendo la transferencia de carga intramolecular. Estos complejos formados ligando:catión metálico muestran una respuesta poco selectiva a aniones, pero podrían ser usados para un reconocimiento diferencial de los mismos.

### 3.4 Síntesis de las piridinas 2,4,6-trisustituidas.

La síntesis de los ligandos **3a-d** se representa en la figura 3.17, estos están formados por monoaza macrociclos unidos por el átomo de N al anillo de la posición 4 de la 2,4,6-trifenilpiridina. La diferencia entre ellos radica en los macrociclos, que presentan diferente tamaño y número y tipo de átomos secundarios (oxígeno y azufre). Se sintetizó el compuesto **3a**, que contiene el grupo dimetilamino en lugar de un macrociclo, como modelo.



**Figura 3.17.** Esquema de obtención de los derivados **3a-d**.

El procedimiento de Richman-Atkins fue seguido para la síntesis de los aza-oxa macrociclos<sup>11</sup>. Estos se obtienen mediante la desprotonación de la *N,N*-fenildietanolamina con hidruro de sodio, seguida de la reacción con metanosulfoniléster del correspondiente polietilenglicol en condiciones de alta dilución.

El macrociclo que contiene átomos de azufre usado para obtener **3b** fue sintetizado modificando el procedimiento anterior, el 3,6-dioxaoctano-1,8-ditiol fue desprotonado con carbonato de potasio, para luego hacerlo reaccionar con el metanosulfonil éster de la *N,N*-fenildietanolamina.

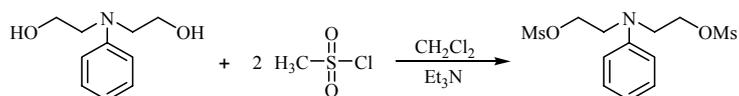
<sup>11</sup> J. E. Richman, T. J. Atkins, *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 2268–2270; T. J. Atkins, J. E. Richman, W. F. Oettle, *Org. Synth.* **1978**, *58*, 86–98; K. E. Krakowiak, J. S. Bradsahw, D. J. Zamecka-Krakowiak, *Chem. Rev.* **1989**, *89*, 929–972.

El paso final en todos los casos consiste en la reacción de la *N,N*-dimetilanilina o los macrociclos sintetizados con el perclorato de 2,6-difenilpirilio en DMF anhidra calentando a 150 °C, para dar las correspondientes sales de 2,4,6-trifenilpirilio. La adición de hidróxido de amonio en acetona conduce a la formación de las 2,4,6-trifenilpiridinas deseadas (**3a-3d**). En el caso de la 2,4,6-trifenilpiridina (**3d**) se utiliza el tetrafluorborato de 2,4,6-trifenilpirilio comercial para su obtención.

Las técnicas utilizadas para cada una de estas síntesis y la caracterización de los productos obtenidos se muestran a continuación, en todas se siguió lo descrito en la Tesis Doctoral de F. Sancenón.<sup>1</sup>

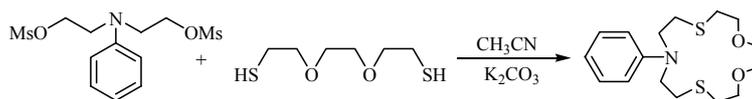
### Síntesis de 10-fenil-10-aza-1,4-dioxa-7,13-ditiaciclo-pentadecano (II).

Paso 1. Síntesis de *N,N'*-fenildietanolamina dimesilada.



En un matraz de 500 mL de tres bocas provisto de agitación, atmósfera de Ar, embudo de adición compensada y baño de hielo, se colocan 10 g de *N,N'*-fenildietanolamina (0.055 mol), 23 mL de trietilamina (0.165 mol) y se disuelven en 200 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco. Se agita la mezcla durante 10 minutos y luego se adicionan, gota a gota, durante 30 minutos y mediante el embudo de adición compensada 8.5 mL de cloruro de metanosulfonilo (0.11 mol) disueltos en 25 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco. Después de la adición se deja 30 minutos agitando en baño de hielo y 60 minutos mas a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, el crudo se filtra y la fase orgánica se vierte sobre una disolución de agua-hielo-HCl. Se separa la fase orgánica que se lava después con agua (2 x 50 mL) y posteriormente con agua saturada con NaCl (3 x 50 mL). La fase orgánica se seca con MgSO<sub>4</sub> anhidro, se filtra y se concentra al rotavapor obteniéndose 17.9 g (0.053 mol) del producto final en forma de un aceite morado. El rendimiento es del 96.4 %. Los datos de RMN y masas se corresponden con los de la bibliografía.

Paso 2. Obtención del 10-fenil-10-aza-1,4-dioxa-7,13-ditiaciclo-pentadecano.



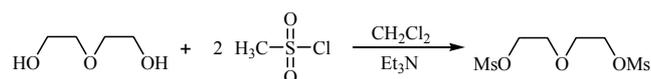
En un matraz de 1 litro de tres bocas provisto de atmósfera de Ar, montaje de reflujo, embudo de adición compensada y baño de aceite se colocan 3.57 g de 3,6-dioxaoctano-1,8-ditiol (0.022 mol), 12.2 g de carbonato potásico anhidro (0.088 mol) y se disuelven en 400 mL de acetonitrilo seco. Se calienta a reflujo durante una hora y, posteriormente, se adiciona, mediante el embudo de adición compensada y durante 4 horas 7.4 g de N,N'-fenildietanolamina dimesilada (0.022 mol) disueltos en 50 mL de acetonitrilo seco. A continuación se deja 16 horas a reflujo. Pasado este tiempo, se filtra el crudo y el acetonitrilo se elimina con un rotavapor. Se obtiene un aceite amarillo que se purifica mediante cromatografía en columna de sílice empleando como eluyente  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Se obtienen 2.88 g (0.0088 mol) de 10-fenil-10-aza-1,4-dioxa-7,13-ditiaciclo-pentadecano como un sólido céreo de color blanco. El rendimiento es del 40 %.

**RMN- $^1\text{H}$**  en  $\text{CDCl}_3$   $\delta(\text{ppm})$ : 2.73 (t,  $J = 7$  Hz, 4H, O-CH $_2$ -CH $_2$ -S), 2.88 (t,  $J = 7$  Hz, 4H, N-CH $_2$ -CH $_2$ -S), 3.62 (s, 4H, O-CH $_2$ -CH $_2$ -O), 3.64 (t,  $J = 7$  Hz, 4H, O-CH $_2$ -CH $_2$ -S), 3.79 (t,  $J = 7$  Hz, 4H, N-CH $_2$ -CH $_2$ -S), 6.63 (m, 3H, Ar), 7.20 (d,  $J = 6$  Hz, 2H, Ar).

**RMN- $^{13}\text{C}$**  { $^1\text{H}$ } en  $\text{CDCl}_3$   $\delta(\text{ppm})$ :  $\delta$  29.29 (CH $_2$ -S), 30.95 (CH $_2$ -S), 51.63 (CH $_2$ -N), 70.56 (CH $_2$ -O), 74.11 (CH $_2$ -O), 111.57 (C $_6\text{H}_5$ ), 115.98 (C $_6\text{H}_5$ ), 129.29 (C $_6\text{H}_5$ ), 146.46 (C $_6\text{H}_5$ ).

### Síntesis de 10-fenil-10-aza-1,4,7-trioxaciclododecano (III).

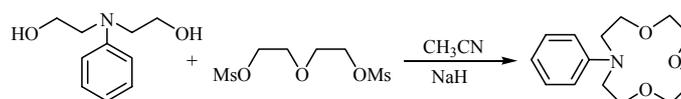
Paso 1. Mesilación del 3-oxapentano-1,5-diol.



En un matraz esférico de 500 mL provisto de agitación, embudo de adición compensada, atmósfera de Ar y baño de hielo se colocan 8.9 g de 3-oxapentano-1,5-diol (0.084 mol), 76 mL de trietilamina (0.546 mol) y se disuelven en 200 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  seco. Se agita la mezcla durante 10 minutos y luego se adicionan, gota a gota, durante 30 minutos y mediante el embudo de adición compensada 13 mL de

cloruro de metanosulfonilo (0.168 mol) disueltos en 25 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  seco. Después de la adición se deja 30 minutos agitando en baño de hielo y 60 minutos más a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, el crudo se filtra y la fase orgánica se vierte sobre una disolución de agua-hielo-HCl. Se separa la fase orgánica que se lava después con agua (2 x 50 mL) y posteriormente con agua saturada con NaCl (3 x 50 mL). La fase orgánica se seca con  $\text{MgSO}_4$  anhidro, se filtra y se concentra al rotavapor obteniéndose 20.92 g (0.080 mol) del 3-oxapentano-1,5-dimetano sulfonato en forma de un aceite amarillo. El rendimiento es del 95 %. Los datos de RMN y masas se corresponden con los reportados en la bibliografía.

Paso 2. Obtención del 10-fenil-10-aza-1,4,7-trioxaciclododecano.

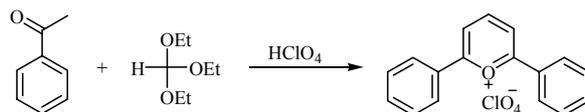


En un matraz de 1 litro de tres bocas provisto de atmósfera de Ar, montaje de reflujo, embudo de adición compensada y baño de aceite se colocan 10 g de N,N'-fenildietanolamina (0.055 mol) y se disuelven en 400 mL de acetonitrilo seco. A continuación y a temperatura ambiente, se añaden, en pequeñas porciones y por espacio de 60 minutos 3.3 g de hidruro sódico (0.137 mol). Una vez formada la sal disódica de la N,N'-fenildietanolamina se calienta a reflujo y se adiciona, mediante el embudo de adición compensada y durante 4 horas 14.4 g de 3-oxapentano-1,5-dimetano sulfonato (0.055 mol) disueltos en 75 mL de acetonitrilo seco. A continuación se deja 16 horas a reflujo. Pasado este tiempo, se filtra el crudo y el acetonitrilo se elimina con un rotavapor. Se obtiene un aceite anaranjado que se purifica mediante cromatografía en columna con alúmina empleando como eluyentes  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y mezclas  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -etanol. Con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  se eluyen 6.2 g de 10-fenil-10-aza-1,4,7-trioxaciclododecano (0.025 mol, 45 %) y con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -etanol 25:1 se eluyen 5.1 g de 2-(2-(2-(2-hidroxi-etoxi)-etoxi)-etil)-fenilamino)-etanol (0.019 mol, 34.5 %).

**RMN- $^1\text{H}$**  en  $\text{CDCl}_3$   $\delta(\text{ppm})$ : 3.55 (t, J = 7.5 Hz, 4H, O- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ -N), 3.64 (m, J = 7.5 Hz, 8H, O- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ -O- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ -O), 3.83 (t, J = 7.5 Hz, 4H, O- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ -N), 6.68 (t, J = 6 Hz, 2H, Ar), 6.70 (d, J = 6 Hz, 1H, Ar), 7.18 (t, J = 6 Hz, 2H, Ar).

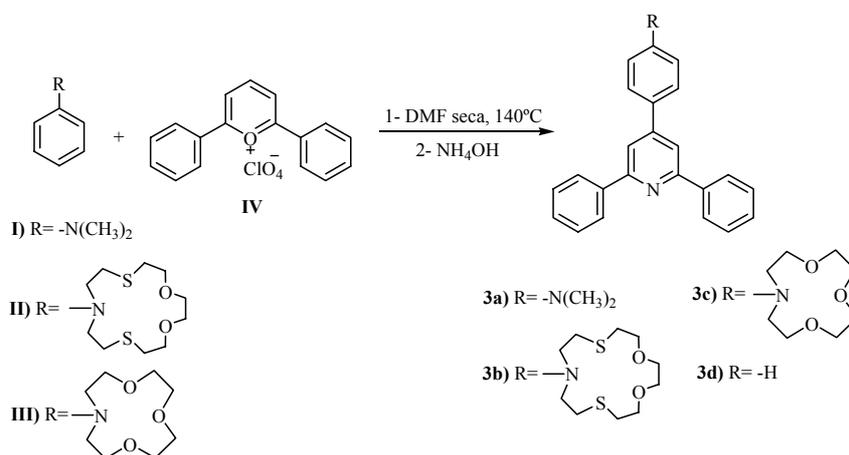
**RMN- $^{13}\text{C}$**  { $^1\text{H}$ } en  $\text{CDCl}_3$   $\delta(\text{ppm})$ : 52.35 ( $\text{CH}_2$ -N), 69.55 ( $\text{CH}_2$ -O), 69.77 ( $\text{CH}_2$ -O), 71.46 ( $\text{CH}_2$ -O), 112.24 ( $\text{C}_6\text{H}_5$ ), 116.03 ( $\text{C}_6\text{H}_5$ ), 128.98 ( $\text{C}_6\text{H}_5$ ), 148.44 ( $\text{C}_6\text{H}_5$ ).

### Síntesis de perclorato de 2,6-difenilpirilio.



En un matraz esférico de 250 mL provisto de agitación, atmósfera de Ar y baño de hielo se colocan 4 mL de acetofenona (34.29 mmol) y 10 mL de trietilortoformiato. Se deja 15 minutos en el baño de hielo y posteriormente se añaden, gota a gota y durante 30 minutos 7.4 mL de ácido perclórico (86.45 mmol). Después de la adición se deja agitando 30 minutos en baño de hielo y 60 minutos más a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se añade éter dietílico a la reacción precipitando el producto final. Este se filtra a vacío, se lava con éter dietílico, se seca y se pesa dando 10.1 g (30.38 mmol) del producto final en forma de un sólido amarillo. El rendimiento es del 88.6 %. Los datos de RMN y masas coinciden con los de la bibliografía.

### Síntesis de las piridinas 2,4,6-trisustituidas.



En un matraz esférico de 100 mL provisto de agitación, montaje de reflujo y atmósfera de Ar, se colocan 4 mmol de *N,N*-dimetilanilina (o 10-fenil-10-aza-1,4-dioxa-7,13-ditiaclopentadecano (**II**) o 10-fenil-10-aza-1,4,7-trioxaciclododecano (**III**) según corresponda), 8 mmol de perclorato de 2,6-difenilpirilio (**IV**) y se disuelven en 10 mL de dimetilformamida seca. Se calienta a 150° C por espacio de 3 horas. Pasado este tiempo se deja enfriar el matraz y, a temperatura ambiente, se

añaden 30 mL de éter dietílico dejando la reacción en agitación durante otras 16 horas. Se separa un sólido de color marrón oscuro que se filtra y se lava con éter dietílico. Este sólido se disuelve en acetona, (para la obtención de 3d se utiliza el tetrafluoborato de 2,4,6-trifenilpirilio comercial) y posteriormente se le añaden 2 mL de hidróxido amónico, se concentra a vacío en un rotavapor y se purifica mediante cromatografía en columna de sílice empleando como eluyente hexano-diclorometano en proporción 1:1.

#### **Síntesis de [4-(2,6-difenilpiridin-4-il)-fenil]-dimetilamina (3a).**

Se obtienen 550 mg (1.57 mmol) del producto final en forma de sólido amarillo. El rendimiento es del 40 %.

**RMN-<sup>1</sup>H** en CDCl<sub>3</sub> δ(ppm): 3.05 (s, 6H, CH<sub>3</sub>), 6.87 (d, 2H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 7.50-7.65 (t, 6H, *m*-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> y *p*-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 7.75 (d, 2H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 7.96 (s, 2H, C<sub>6</sub>H<sub>2</sub>N), 8.34 (d, 4H, *o*-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>).

**RMN-<sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H}** en CDCl<sub>3</sub> δ(ppm): 40.33 (CH<sub>3</sub>), 112.45, 115.96, 127.09, 127.78, 128.59, 128.77, 139.89, 149.74, 151.01, 157.23.

**Espectro de masas: m/z** 350 (M<sup>+</sup>), 306, 253, 228, 210, 202, 174, 166, 152, 134, 105, 91, 77.

#### **Síntesis de 10-[4-(2,6-difenilpiridin-4-il)-fenil]-10-aza-1,4-dioxa-7,13-ditia-ciclopentadecano (3b).**

Se obtienen 613 mg (1.10 mmol) del producto final en forma de un sólido amarillo. El rendimiento es del 45 %.

**RMN-<sup>1</sup>H** en CDCl<sub>3</sub> δ(ppm): 2.77 (t, 4H, CH<sub>2</sub>), 2.94 (t, 4H, CH<sub>2</sub>), 3.62 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.70 (t, 4H, CH<sub>2</sub>), 3.82 (t, 4H, CH<sub>2</sub>), 6.76 (d, 2H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 7.41 (t, 4H, *m*-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 7.50 (t, 2H, *p*-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 7.67 (d, 2H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 7.82 (s, 2H, C<sub>6</sub>H<sub>2</sub>N), 8.18 (d, 4H, *o*-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>).

**RMN-<sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H}** en CDCl<sub>3</sub> δ(ppm): 29.47 (CH<sub>2</sub>), 31.24 (CH<sub>2</sub>), 51.88 (CH<sub>2</sub>), 70.73 (CH<sub>2</sub>), 74.37 (CH<sub>2</sub>), 112.04, 115.92, 126.00, 127.10, 128.20, 128.61, 128.78, 139.95, 147.59, 149.66, 157.30.

**Espectro de masas (FAB): m/z** 556 (M<sup>+</sup>).

**Síntesis de 10-[4-(2,6-difenilpiridin-4-il)-fenil]-10-aza-1,4,7-trioxaciclododecano (3c).**

Se obtienen 247 mg (0.51 mmol) del producto final en forma de sólido amarillo. El rendimiento es del 37 %.

**RMN-<sup>1</sup>H** en CDCl<sub>3</sub> δ(ppm): 3.62 (m, 12H, CH<sub>2</sub>), 3.90 (t, 4H, CH<sub>2</sub>), 6.84 (d, 2H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 7.41 (t, 4H, *m*-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 7.47 (t, 2H, *p*-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 7.63 (d, 2H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 7.72 (s, 2H, C<sub>6</sub>H<sub>2</sub>N), 8.16 (d, 4H, *o*-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>).

**RMN-<sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H}** en CDCl<sub>3</sub> δ(ppm): 53.14 (CH<sub>2</sub>), 70.11 (CH<sub>2</sub>), 70.48 (CH<sub>2</sub>), 72.15 (CH<sub>2</sub>), 113.21, 116.46, 127.67, 128.39, 129.18, 129.35, 140.59, 149.94, 150.35, 157.86.

**Espectro de masas:** *m/z* 480 (M<sup>+</sup>), 464, 449, 423, 392, 379, 306, 227, 202, 174, 167, 153, 105, 91, 77.

Los espectros RMN-<sup>1</sup>H de **3b-c** muestran los protones de los macrociclos en el rango de 2.6 a 3.8 ppm, con dos zonas claramente definidas para los protones de los metilenos contiguos a los átomos de azufre (2.6–2.9 ppm) y los adyacentes a los átomos de nitrógeno y oxígeno (3.5–3.8 ppm). En la región aromática aparecen dobletes centrados a 6.80 y 7.67 ppm correspondientes al anillo de benceno 1,4-disustituido, un singlete a 7.80 ppm perteneciente a los protones de la piridina 2,4,6-trisustituida y dos tripletes y un doblete a 7.45, 7.50 y 8.20 ppm atribuidos a los protones de los anillos bencénicos monosustituidos. El RMN-<sup>13</sup>C, el análisis elemental y los espectros de masa confirman las estructuras propuestas para los compuestos sintetizados.

**Caracterización cristalográfica de 3b.**

Se obtuvieron cristales adecuados para la caracterización cristalográfica del receptor **3b**, por difusión lenta de hexano en disoluciones del receptor en diclorometano. Las medidas fueron realizadas en un Difractómetro Siemens P4 de cuatro círculos. Las dimensiones de la celda unidad fueron determinadas a partir de 35 reflexiones. La intensidad de las tres reflexiones estándar fue controlada cada 100 reflexiones, no mostrando variaciones sistemáticas. La estructura fue resuelta

por métodos directos con el programa SHELXTL,<sup>12</sup> y refinadas por análisis de mínimos cuadrados de matriz completa en F<sup>2</sup>.

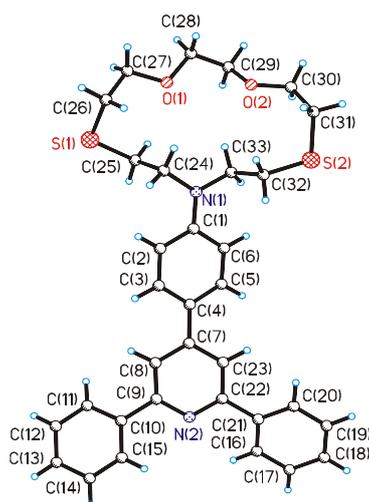
En la tabla 3.5 se presentan los parámetros cristalográficos y en la figura 3.18 se representa la estructura molecular del receptor **3b** mostrando la numeración de los átomos, mientras que en la tabla 3.6 se muestran algunas distancias y ángulos seleccionados. Se usaron parámetros térmicos anisotrópicos para todos los átomos distintos de hidrógeno. Los átomos de hidrógeno fueron refinados siguiendo un modelo rígido.

**Tabla 3.5.** Parámetros cristalográficos del compuesto **3b**.

Fórmula C <sub>33</sub> H <sub>36</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub>	Monoclínico
Peso fórmula = 556.76	Grupo espacial = P21/n
a = 8.548(2) Å	β = 90.10(2)°
b = 10.067(2) Å	Volumen = 2906.7(10) Å <sup>3</sup>
c = 33.777(8) Å	Z = 4
ρ <sub>calc</sub> = 1.272 g cm <sup>-3</sup>	λ (Mo-Kα) = 0.71073 Å
F(000) = 1184	T = 20 °C
Rango θ = 2.11-25.00°	Rango índices (hkl) = -1/10, -1/11, -40/40
Reflexiones recogidas = 6864	Reflexiones independientes = 5069
R1(F>4σF) = 0.0429	wR2 (todos los datos) = 0.2270

$$R1 = \frac{\sum(|F_o| - |F_c|)}{\sum|F_o|} ; wR2 = \left[ \frac{\sum w(F_o^2 - F_c^2)^2}{\sum wF_o^4} \right]^{1/2}$$

<sup>12</sup> SHELXTL, Versión 5.03, *Siemens Analytical X-ray Instruments*, Madison, WI, 1994.



**Figura 3.18.** Estructura molecular del receptor **3b** mostrando el esquema de numeración atómico.

**Tabla 3.6.** Longitudes de enlace (Å) y ángulos seleccionados (°) para el receptor **3b**.

<b>Distancias (Å)</b>			
S(1)-C(26)	1.796(3)	S(1)-C(25)	1.805(3)
S(2)-C(31)	1.786(3)	S(2)-C(32)	1.805(3)
N(1)-C(1)	1.459(3)	N(1)-C(33)	1.454(3)
N(1)-C(24)	1.459(3)	O(1)-C(27)	1.424(3)
O(2)-C(30)	1.415(3)	C(28)-C(29)	1.489(4)
C(26)-C(27)	1.494(4)	C(32)-C(33)	1.513(3)
C(4)-C(7)	1.475(3)	N(2)-C(9)	1.349(3)
N(2)-C(22)	1.341(3)	C(22)-C(23)	1.388(3)
C(11)-C(12)	1.380(4)	C(9)-C(10)	1.488(3)
<b>Ángulos (°)</b>			
C(26)-S(1)-C(25)	103.43(12)	C(31)-S(2)-C(32)	104.14(14)
C(1)-N(1)-C(33)	121.4(2)	C(1)-N(1)-C(24)	121.2(2)
C(33)-N(1)-C(24)	117.4(2)	C(22)-N(2)-C(9)	117.8(2)
C(28)-O(1)-C(27)	112.7(2)	N(1)-C(1)-C(2)	122.3(2)
N(1)-C(1)-C(6)	121.2(2)	C(2)-C(19)-C(6)	116.4(4)
C(5)-C(4)-C(7)	121.7(2)	C(8)-C(27)-C(23)	116.1(2)
N(2)-C(9)-C(8)	122.3(2)	C(8)-C(9)-C(10)	122.48(2)

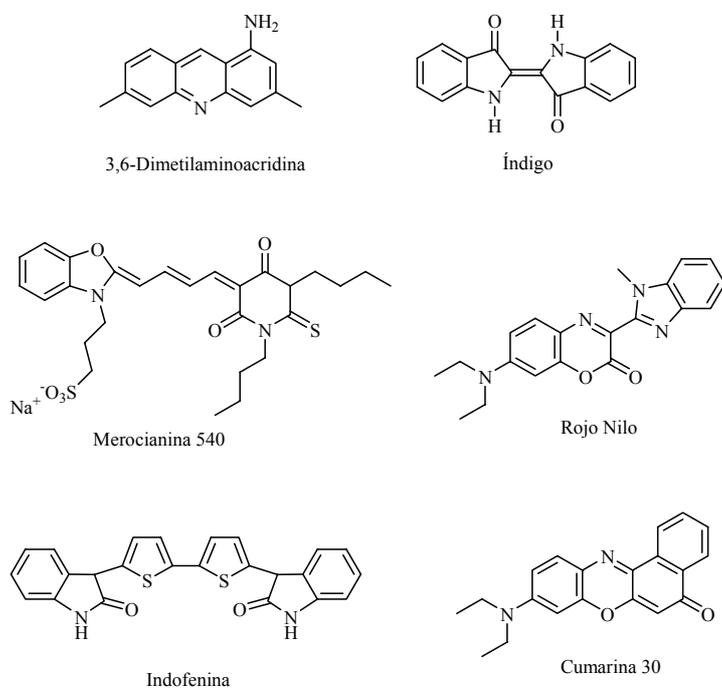
C(11)-C(10)-C(9)	122.0(2)	C(16)-C(21)-C(22)	120.3(2)
N(2)-C(22)-C(21)	116.5(2)	N(1)-C(33)-C(32)	111.8(2)
C(24)-C(25)-S(1)	113.8(2)	C(27)-C(26)-S(1)	117.1(2)
O(2)-C(29)-C(28)	111.0(3)	O(2)-C(30)-C(31)	110.3(3)
C(30)-C(31)-S(2)	117.2(2)	C(33)-C(32)-S(2)	114.6(2)

En la estructura del receptor **3b** puede observarse la presencia del anillo macrocíclico unido covalentemente a una agrupación 2,4,6-trifenilpiridina. El anillo de piridina central esta unido covalentemente a 3 anillos de benceno por las posiciones 2, 4 y 6. Los anillos aromáticos son planos dentro del error experimental. Los anillos aromáticos no están en un mismo plano y el ángulo que definen los planos constituidos por los anillos C(1)-C(2)-C(3)-C(4)-C(5)-C(6) y C(7)-C(8)-C(9)-N(2)-C(22)-C(23) es de 21.5°. El otro ángulo delimitado por los planos que contienen a los anillos C(16)-C(17)-C(18)-C(19)-C(20)-C(21) y al de piridina que es de 18.2°, mientras que el ángulo entre el anillo C(10)-C(11)-C(12)-C(13)-C(14)-C(15) y la piridina es de 23.4°. La unidad macrocíclica contiene dos átomos de oxígeno, un átomo de nitrógeno y dos átomos de azufre. Como es esperable por su mayor tamaño, frente al oxígeno y al nitrógeno, la distancia C-S es mayor y oscila entre 1.786 Å y 1.805 Å, siendo la distancia media de 1.795 Å. Esto hace que la cavidad macrocíclica sea un poco mayor que si sólo estuviera formada por átomos de oxígeno y de nitrógeno.

## Capítulo 4. SÍNTESIS DE SISTEMAS HETEROCÍCLICOS AROMÁTICOS CON PROPIEDADES CROMO-/FLUOROGÉNICAS.

### 4.1 Introducción.

La mayoría de los colorantes conocidos contienen en su estructura anillos heterocíclicos aromáticos, la figura 4.1 muestra 6 de estos colorantes a modo de ejemplo. Actualmente, se pueden sintetizar diversos compuestos coloreados, formados por sistemas heterocíclicos conjugados funcionalizados.



**Figura 4.1.** Estructura química de diversos colorantes.

La síntesis de colorantes data del año 1856, cuando William Henry Perkin sintetizó la mauveína. Desde entonces miles de moléculas coloreadas se han obtenido en los laboratorios, desplazando rápidamente a los colorantes naturales, en sus aplicaciones industriales. En este capítulo se describe la síntesis y caracterización de compuestos aromáticos heterocíclicos con azufre y nitrógeno, a través de varios métodos de síntesis. Los compuestos obtenidos exhiben propiedades cromo-fluorogénicas, por lo que son sintetizados para su posterior aplicación como sensores ópticos.

#### 4.1.1 Bitiofenos sustituidos: sistemas conjugados de tipo dador-aceptor de gran versatilidad.

Los politiofenos, entre ellos los bitiofenos, son compuestos que contienen varios anillos de tiofeno, que forman un sistema conjugado, figura 4.2. Gran parte de ellos tienen origen natural, y por su actividad biológica, han despertado el interés de los químicos sintéticos, que se han encargado de modificar los sustituyentes y el entorno molecular de esta familia de heterociclos.

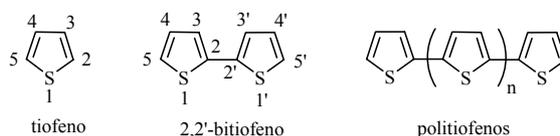
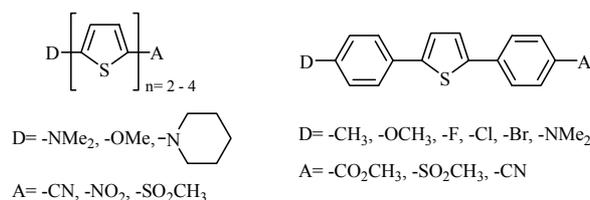


Figura 4.2. Heterociclos formados por anillos de tiofeno.

Estos heterociclos contienen en su estructura enlaces dobles y triples, lo que les confiere características espectroscópicas interesantes para su aplicación en diversos campos de la óptica. Los derivados tiofénicos (figura 4.3) aparecieron recientemente en la literatura, a finales de la década del 80, principios de los 90, como moléculas con potencial aplicación en óptica no lineal, NLO (Nonlinear Optics).<sup>1</sup>

<sup>1</sup> (a) A. Amer, A. B. Burkhardt, A. Nkansah, R. Shabana, A. Galal, H. B. Mark, H. Zimmer, *Phosphorous, Sulfur and Silicon*, 42, **1989**, 63; (b) G. Mignani, F. Leising, R. Meyrueix, H. Samson, *Tetrahedron Lett.*, 31, **1990**, 4743; (c) F. Effenberger, F. Wuerthner, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 32, **1993**, 719; (d) V. P. Rao, A. K.-Y. Jen, K. Y. Wong, K. J. Drost, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1993**, 1118; (e) V. P. Rao, A. K.-Y. Jen, K. Y. Wong, K. J. Drost, *Tetrahedron Lett.*, 34, **1993**, 1747; (f) V. P. Rao, Y. M. Cai, A. K.-Y. Jen, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1994**, 1689; (g) A. K.-Y. Jen, V. P. Rao, K. J. Drost, K. Y. Wong, M. P. Cava, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1994**, 2057; (h) V. P. Rao, K. Y. Wong, A. K.-

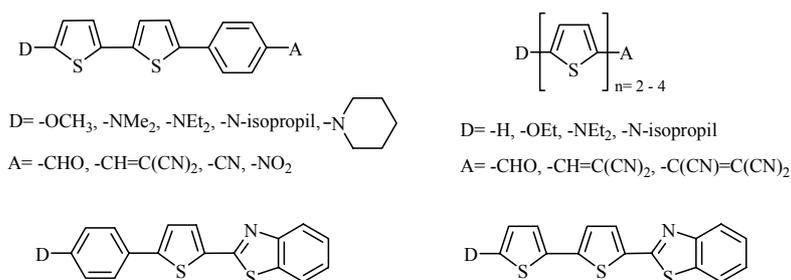


**Figura 4.3.** Estructuras de derivados tiofénicos y oligotiofénicos con propiedades de NLO.

Debido al creciente interés en los nuevos derivados oligotiofénicos para NLO, recientemente han sido publicados varios estudios relativos a la síntesis y caracterización de las propiedades ópticas de estas moléculas. El objetivo es la obtención de nuevos compuestos con mejores propiedades de NLO (figura 4.4).<sup>2</sup>

Y. Jen, K. J. Drost, *Chem. Mater.*, 6, **1994**, 2210; (i) D. Prim, G. Kirsch, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1994**, 2603; (j) D. Prim, G. Kirsch, F. Leising, G. Mignani, *J. Heterocycl. Chem.*, 31, **1994**, 1005; (h) D. Prim, D. Joseph, G. Kirsch, *Phosphorus, Sulfur and Silicon*, 91, **1994**, 137.

<sup>2</sup> (a) F. Effenberger, F. Wuerthner, F. Steybe; *J. Org. Chem.*, 60, **1995**, 2082; (b) M. G. Hutchins, I. Ferguson, D. J. McGeein, J. O. Morley, J. Zyss, I. Ledoux, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 171, **1995**, 176; (c) P. V. Bedworth, Y. Cai, A. Jen, S. R. Marder, *J. Org. Chem.*, 61, **1996**, 2242; (d) F. Steybe F.; F. Effenberger, S. Beckman, P. Kramer, C. Glania, R. Wortmann, *Chem. Phys.*, 219, **1997**, 317; (e) F. Steybe, F. Effenberger, U. Gubler, C. Bosshard, P. Gunter, *Tetrahedron*, 54, **1998**, 8469; (f) P. Bauerle, "The Synthesis of Oligothiophenes", D. Fichou Ed. Handbook of Oligo- and Polythiophenes, Wiley-VCH: Weinheim, **1999**, Cap. 3, p 89-173; (g) K. Eckert, A. Schroder, H. Hartmann, *Eur. J. Org. Chem.*, **2000**, 1327; (h) C. H. Wang, J. N. Woodford, A. K.-Y. Jen, *Chem. Phys.*, 262, **2000**, 475; (i) J.-M. Raimundo, P. Blanchard, N. Gallego-Planas, P. Frère, N. Mercier, I. Ledoux-Rak, R. Hierle, J. Roncali, *J. Org. Chem.*, 42, **2002**, 1507; (j) M. M. M. Raposo, G. Kirsch, *Heterocycles*, 55, **2001**, 1487; (k) M. M. M. Raposo, G. Kirsch, *Tetrahedron*, 59, **2003**, 4891; (l) M. M. M. Raposo, A. M. C. Fonseca, G. Kirsch, *Tetrahedron*, 45, **2004**, 2825; (m) R. M. F. Batista, S. P.G. Costa, M. M. M. Raposo, *Tetrahedron Lett.*, 45, **2004**, 2825; (n) S. P.G. Costa, R. M. F. Batista, P. Cardoso, M. Belsey, M. M. M. Raposo, *Eur. J. Org. Chem.*, 17, **2006**, 3938; (ñ) M. M. Oliva, J. Casado, M. M. M. Raposo, A. M. C. Fonseca, H. Hartmann, V. Hernández, J. T. López Navarrete, *J. Org. Chem.*, 71, **2006**, 7509.



**Figura 4.4.** Derivados oligotiofénicos sintetizados recientemente con mejores propiedades de NLO.

Los oligotiofenos también han sido utilizados para la síntesis de polímeros orgánicos con aplicaciones como sensores ópticos.<sup>3</sup> Los politiofenos son moléculas estables y que presentan propiedades fotofísicas interesantes. Algunos de ellos han sido utilizados en la preparación de polímeros con propiedades electro-, solvato- y termocrómicas.<sup>4</sup>

Las propiedades electrónicas y estructurales de los sistemas conjugados dador-aceptor sustituidos tienen un interés considerable debido a su potencial aplicación en la obtención de dispositivos ópticos variados (ej. Convertidores de frecuencias, moduladores de luz e interruptores ópticos). Algunos estudios han demostrado que al reemplazar el anillo de benceno, situado como puente en un cromóforo, por anillos heteroaromáticos de 5 miembros, fácilmente deslocalizables, se produce una transferencia electrónica entre los grupos dador y aceptor más eficiente. Como anillos de 5 miembros, sustituyentes del benceno, se pueden utilizar el tiofeno, el pirrol, el imidazol o el tiazol. La naturaleza de los anillos heteroaromáticos que poseen un exceso o deficiencia de electrones, juegan un papel determinante en las características electrodadoras y electroceptoras de los sustituyentes, pues afectan la transferencia electrónica entre estos. Estos compuestos se caracterizan por poseer importantes propiedades electroluminiscentes y son utilizados frecuentemente como sistemas para la transferencia de energía y captadores de luz

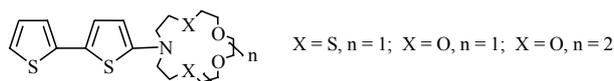
<sup>3</sup> (a) H. A. Ho, M. Leclerc, *J. Am. Chem. Soc.*, 125, **2003**, 4412; (b) C. Li, M. Numata, M. Takeuchi, S. Shinkai, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 44, **2005**, 6371; (c) D. Aldakov, P. Anzenbacher, *J. Am. Chem. Soc.*, 126, **2004**, 4752; (d) D. Demeter, P. Blanchard, M. Allain, I. Grosu, J. Roncali; *J. Org. Chem.*, 72, **2007**, 5285; (e) R. M. F. Batista, E. Oliveira, S. P. G. Costa, C. Lodeiro and M. M. M. Raposo, *Org. Lett.*, **2007**, doi:10.1021/ol071029b.

<sup>4</sup> (a) H. S. O. Chan, S. Choon-Ng, *Prog. Polim. Sci.*, 23, **1998**, 1167; (b) G. Zotti, S. Zecchin, B. Vercelli, A. Berlin, M. C. Pasini, S. Destri, W. Porzio, M. M. M. Raposo, *Chem. Mat.*, 17, **2005**, 6492.

(light-harvesting systems) y para dispositivos ópticos y electrónicos. Debido a su elevada fluorescencia, también han sido usados como marcadores fluorescentes, como dispositivos orgánicos emisores de luz y como sensores químicos.<sup>1-3</sup>

Los sensores químicos basados en sistemas heterocíclicos, son únicos y de gran utilidad en el reconocimiento de especies abióticas y biológicas, ya que además de ser sistemas altamente conjugados, fluorescentes y con gran capacidad para la transferencia electrónica, pueden actuar como sitio de coordinación del analito.

Se propone la utilización de bitiofenos sustituidos para el reconocimiento de especies iónicas. Para ello se sintetizarán 2,2'-bitiofenos-5-*N*-éter corona, ver figura 4.5.



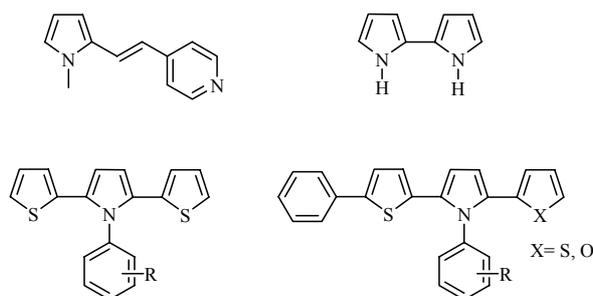
**Figura 4.5.** Estructura de los bitiofenos que se pretende sintetizar.

#### **4.1.2 Sistemas triheterocíclicos que contienen un anillo de pirrol *N*-sustituido para su posterior funcionalización.**

En los últimos años los derivados de pirrol y de 2,5-ditienilpirrol han sido muy estudiados. Estos compuestos, debido a sus propiedades ópticas tienen gran aplicación en el diseño de nuevos materiales NLO, como diodos emisores de luz, materiales fotocromicos, dispositivos fotovoltaicos, etc. (Figura 4.6).<sup>5</sup>

---

<sup>5</sup> (a) K. Ogura, H. Yanai, M. Miokawa, M. Akazome, *Tetrahedron Lett.*, 40, **1999**, 8887; (b) K. Ogura, K. Ooshima, M. Akazome, S. Matsumoto, *Tetrahedron*, 62, **2006**, 2413; (c) K. Ogura, K. Ooshima, M. Akazome, S. Matsumoto, *Tetrahedron*, 62, **2006**, 2484, y referencias citadas. (d) S. Matsumoto, T. Kobayashi, K. Ogura, *Heterocycles*, 68, **2006**, 283; (e) A. Facchetti, A. Abbotto, L. Beverina, M. E. van der Boom, P. Dutta, G. Evmenenko, T. J. Marks, G. A. Pagani, *Chem. Mat.*, 14, **2002**, 4996; (f) A. Facchetti, A. Abbotto, L. Beverina, M. E. van der Boom, P. Dutta, G. Evmenenko, G. A. Pagani, T. J. Marks, *Chem. Mat.*, 15, **2003**, 1064; (g) A. Abbotto, L. Beverina, S. Bradamante, A. Facchetti, G. A. Pagani, R. Bozio, C. Ferrante, D. Pedron, R. Signorini, *Synth. Met.*, 14, **2003**, 4996; (h) B. C. Thompson, K. A. About, J. R. Reynolds, K. Nakatani, P. Audebert, *New J. Chem.*, 29, **2005**, 1128.



**Figura 4.6.** Estructura de derivados de pirroles, 2,5-ditienil-pirroles, bipirroles y ariltienilfuranil-pirroles.

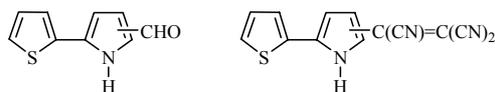
Los derivados conjugados de tiofeno y pirrol usados como sistema  $\pi$  conjugado y simultáneamente como “auxiliares dadores de electrones” son candidatos prometedores para variadas aplicaciones ópticas.<sup>6</sup> Contrariamente a los derivados de tiofeno y de furano, los derivados de pirrol pueden también ser sustituidos por el átomo de nitrógeno, funcionalizando de este modo el heteroátomo y alterando simultáneamente la densidad electrónica del cromóforo. Se ha comprobado incluso que, la sustitución del protón del grupo N-H de un anillo de pirrol por otro sustituyente, además de eliminar el enlace de hidrógeno intramolecular, puede afectar la estructura macroscópica y las propiedades fotofísicas de la molécula. Algunos de estos derivados, han sido utilizados como monómeros en materiales NLO y en polímeros orgánicos conductores. Estos derivados poseen una elevada conductividad eléctrica y gran estabilidad térmica y ambiental.<sup>7</sup>

La síntesis de los derivados de tienilpirroles, a pesar de sus potenciales aplicaciones como precursores de fármacos, monómeros de polímeros conductores

<sup>6</sup> (a) R. D. Miller, V. Y. Lee, C. R. Moylan, *Chem. Mat.*, 6, **1994**, 1023; (b) P. R. Varanasi, A. K.-Y. Jen, J. Chandrasekhar, I. N. N. Namboothiri, A. Rathna, *J. Am. Chem. Soc.*, 118, **1996**, 12443; (c) I. D. L. Albert, T. J. Marks, M. A. Ratner, *J. Am. Chem. Soc.*, 119, **1997**, 6575; (d) S. Bradamante, A. Facchetti, G. A. Pagani, *J. Phys. Org. Chem.*, 10, **1997**, 514; (e) I. D. L. Albert, T. J. Marks, M. A. Ratner, *Chem. Mat.*; 10, **1998**, 753; (f) Y.-K. Wang, C.-F. Shu, E. M. Breitung, R. J. MacMahon, *J. Mat. Chem.*; 9, **1999**, 1449; (g) E. M. Breitung, C.-F. Shu, R. J. MacMahon, *J. Am. Chem. Soc.*, 122, **2000**, 1154.

<sup>7</sup> (a) A. Facchetti, A. Abbotto, L. Beverina, M. E. van der Boom, P. Dutta, G. Evmenenko, A. D. Shukla, C. E. Stern, G. A. Pagani, T. J. Marks, *J. Am. Chem. Soc.*, 128, **2006**, 2142; (b) P. E. Just, K. I. Chane-Ching, P. C. Lacaze, *Tetrahedron*, 58, **2002**, 3467; (c) D. Kotkar, V. Joshi, P. K. Ghosh; *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1988**, 917. (d) J. P. Parakka, M. P. Cava; *Synth. Met.*, 68, **1995**, 275.

orgánicos y de materiales para NLO, no está muy estudiada.<sup>8</sup> Lo mismo ocurre con la caracterización de estos derivados. Apenas están descritos algunos derivados simples de formil- o tricianovinil-tienilpirroles (figura 4.7).<sup>9</sup>



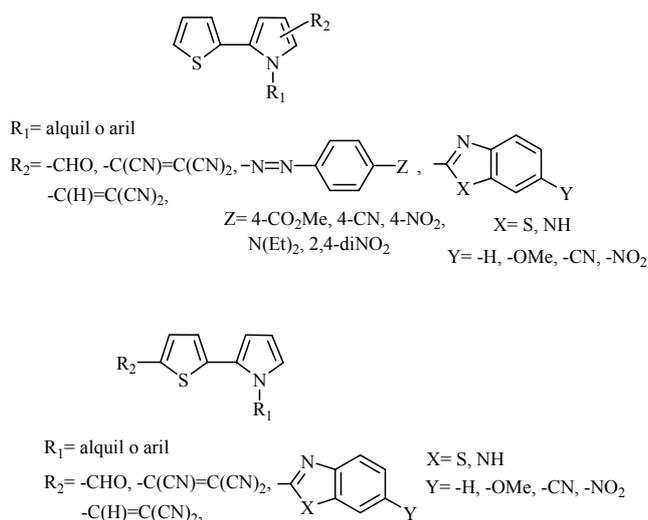
**Figura 4.7.** Estructura de derivados simples de tienilpirroles funcionalizados.

Debido a lo expuesto anteriormente, y a las potenciales aplicaciones de estos derivados heterocíclicos, fueron recientemente desarrollados métodos de síntesis, funcionalización y caracterización de varios derivados de tienil-pirroles funcionalizados con grupos del tipo dador-aceptor. El estudio de las propiedades solvatocrómicas, electroluminescentes, electroquímicas, fotocromicas y de no linealidad óptica (NLO) revela que estos nuevos cromóforos pueden ser utilizados como conductores orgánicos, sondas solvatocrómicas y de fluorescencia, así como en el desarrollo de materiales fotocromicos y con propiedades de NLO (Figura 4.8).<sup>10</sup>

<sup>8</sup> (a) R. E. Niziurski-Mann, M. Cava; *Heterocycles*, 34, **1992**, 2003; (b) S. E. Korostova, A. I. Mikhaleva, B. A. Trofimov; *Russ. Chem. Rev.*, 68, **1999**, 459.

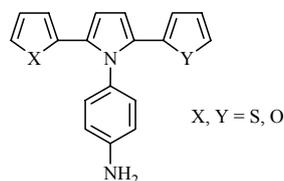
<sup>9</sup> (a) J.-P. Boukou-Poba, M. Farnier, R. Guillard; *Tetrahedron Lett.*, 20, **1979**, 1717; (b) J.-P. Boukou-Poba, M. Farnier, R. Guillard, *Can. J. Chem.*, 59, **1981**, 2962; (c) B. A. Trofimov, L. N. Sobenina, A. P. Demenev, A. I. Mikhaleva, I. A. Ushakov, O. A. Tarasova, V. I. Smirnov, K. B. Petrushenko, A. I. Vokin, N. M. Murzina, G. F. Myachina; *Arkivok*, ix, **2001**, 37.

<sup>10</sup> (a) M. M. M. Raposo, A. M. B. A. Sampaio, G. Kirsch, *Synthesis*, 2, **2005**, 199; (b) M. M. M. Raposo, A. M. R. C. Sousa, A. M. C. Fonseca, G. Kirsch, *Tetrahedron*, 61, **2005**, 8249; (c) M. M. M. Raposo, A. M. R. C. Sousa, G. Kirsch, F. Ferreira, M. Belsey, E. M. Gomes, A. M. C. Fonseca, *Tetrahedron*, 61, **2005**, 11991; (d) M. M. M. Raposo, A. M. R. C. Sousa, A. M. C. Fonseca, G. Kirsch, *Tetrahedron*, 62, **2006**, 3493. (e) P. Coelho, L. Carvalho, A. M. C. Fonseca, M. M. M. Raposo, *Tetrahedron Lett.*, 47, **2006**, 3711; (f) M. M. M. Raposo, A.M.R.C. Sousa, G. Kirsch, P. Cardoso, M. Belsey, E. M. Gomes, A. M. C. Fonseca, *Org. Lett.*, 8, **2006**, 3681; (g) R. M. F. Batista, S. P. G. Costa, M. Belsey, M. M. M. Raposo, *Tetrahedron*, 63, **2007**, 4258; (h) R. M. F. Batista, S. P. G. Costa, M. Belsey, M. M. M. Raposo, *Tetrahedron*, **2007**, doi: 10.1016/j.tet.2007.06.098.



**Figura 4.8.** Estructura de derivados de 1-alquil(aril)-tienilpirroles funcionalizados con grupos aceptores de electrones.

Los compuestos triheterocíclicos de interés en este capítulo son pirroles 2,5-disustituídos por tiofeno o furano y *N*-sustituídos por un grupo *p*-aminofenilo. La estructura general se muestra en la figura 4.9. La presencia de una amina primaria en este tipo de sistemas heterocíclicos nos da la posibilidad de introducir agrupaciones con capacidad de coordinar aniones (ureas, tioureas, sales de amonio cuaternarias y guanidinas) y obtener una serie amplia de sensores ópticos para aniones.



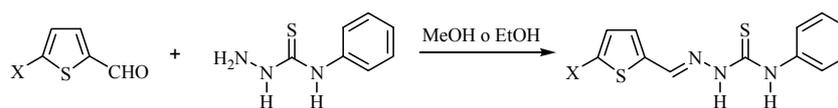
**Figura 4.9.** Estructura general de los triheterociclos.

Los poli(2,5-ditienil)pirroles han sido utilizados para la obtención de polímeros con características electrocromáticas.<sup>5h,7</sup> Por sustitución del anillo de pirrol, con grupos fotocromáticos, se obtienen materiales totalmente conjugados y con aplicaciones como dispositivos electrocromáticos, fotovoltaicos, o también como sensores.

### 4.1.3 Tiosemicarbazonas en el reconocimiento molecular.

La *N*-feniltiosemicarbazida reacciona con aldehídos aromáticos para dar las correspondientes *N*-feniltiosemicarbazonas conjugadas. Los productos que se obtienen de esta reacción son del tipo *N*-arilidenamido-*N'*-feniltioureas. Las tioureas, junto con las ureas y otras familias de compuestos que contienen el grupo N-H, donde el H tiene propiedades ácidas, han sido ampliamente estudiadas como grupos receptores de aniones.<sup>11</sup> La interacción es, fundamentalmente, por formación de enlaces de hidrógeno por lo que será más efectiva con los aniones más básicos. Al ser la tiourea más ácida que la urea, su interacción con aniones básicos, como el fluoruro, puede llegar a provocar la desprotonación del NH más ácido. Se ha modificado gran variedad de ureas y tioureas uniéndolas a grupos cromo-/fluorogénicos para el desarrollo de sensores ópticos.

Uno de los objetivos que se proponen en la síntesis de una familia de tiosemicarbazonas derivadas de ariltiofenos y oligotiofenos sustituidos por grupos dadores y aceptores, para estudiar su comportamiento en el reconocimiento de especies aniónicas, ver figura 4.10. Las tiosemicarbazonas con el anillo de tiofeno sustituido no han sido descritas previamente en la literatura, excepto la que contiene el feniltiofeno que si ha sido sintetizada en 1970.<sup>12</sup>



X= -H, -CH=C(CN)<sub>2</sub>, -OCH<sub>3</sub>, -2'-tienilo, -5'-etoxi-2'-tienilo, -5'-N,N-ditetil-2'-tienilo, -2,2'-bitienilo, -fenilo, -*p*-cianofenilo, -*p*-metoxifenilo, -*p*-benciliden-4-feniltiosemicarbazida.

**Figura 4.10.** Estructura general de las tiosemicarbazonas.

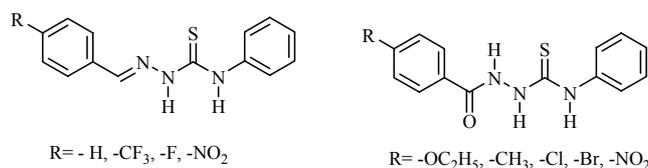
En trabajos publicados recientemente se han sintetizado tiosemicarbazonas derivadas de fenilos y acilfenilos sustituidos para su uso como sensores ópticos de aniones (figura 4.11).<sup>13</sup> Estos nuevos receptores presentan valores elevados para las constantes de formación de complejos con aniones como fluoruro, acetato y

<sup>11</sup> (a) R. Martínez-Mañez, F. Sancenón, *Chem. Rev.*, 103, **2003**, 4419; (b) E. Bianchi, K. Bowman-James, E. García-España, *Supramolecular Chemistry of Anions*; New York: Wiley-VCH, **1997**; (c) V. Amendola, M. Boiocchi, L. Fabbri, A. Palchetti, *Chem. Eur. J.*, 11, **2005**, 120.

<sup>12</sup> V. S. Misra, A. Khare, *Journal fuer Praktische Chemie*, 312, **1970**, 1188.

<sup>13</sup> (a) L. Nie, Z. Li, J. Han, X. Zhang, R. Yang, W.-X. Liu, F.-Y. Wu, J.-W. Xie, Y.-F. Zhao, Y.-B. Jiang, *J. Org. Chem.*, 69, **2004**, 6449; (b) M. Bonizzoni, L. Fabbri, A. Taglietti, F. Tiengo, *Eur. J. Org. Chem.*, 16, **2006**, 3517.

fosfato. Estos autores llegan a la conclusión que la interacción de estos ligandos con aniones en medios apróticos es favorable.



**Figura 4.11.** Estructura de ligandos similares a las tiosemicarbazonas sintetizadas que han sido estudiados como receptores de aniones.

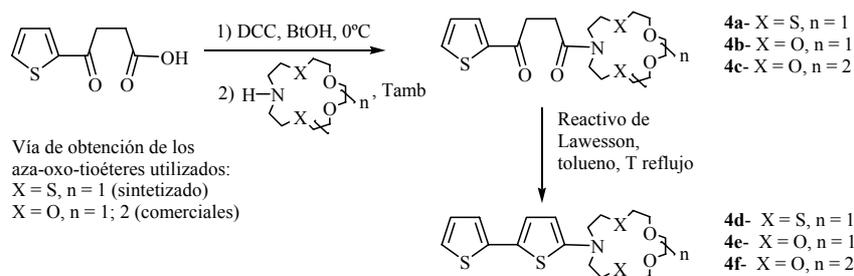
Los receptores objeto de este trabajo contendrán en su estructura, al menos un anillo de tiofeno, unido a la tiosemicarbazona. Se ha escogido el tiofeno como anillo aromático por su capacidad de deslocalizar los electrones en una cadena conjugada. Estas propiedades del tiofeno como buen transmisor de electrones se deben a su menor energía de estabilización (29 kcal mol<sup>-1</sup>) comparada con la del benceno (36 kcal mol<sup>-1</sup>).<sup>14</sup> Es de predecir que la versatilidad del tiofeno frente a la sustitución del anillo y su menor aromaticidad, favorezca el reconocimiento de especies aniónicas por parte del grupo tiosemicarbazona.

## 4.2 Síntesis y caracterización de los derivados heterocíclicos.

### 4.2.1 Síntesis y caracterización de bitiofenos.

El objetivo que se persigue es sintetizar derivados de bitiofenos que contienen aza-oxo-tio éteres en su estructura. Los éteres corona enlazados al núcleo de bitiofenos permitirán el reconocimiento de cationes mediante técnicas ópticas. En la figura 4.12 se muestran los productos sintetizados, así como las rutas seguidas para la obtención de estos. Es de destacar que los compuestos **4a-f** no aparecen reportados en la literatura consultada, por lo que se realizará su caracterización químico-física.

<sup>14</sup> J. March, “*Advanced Organic Chemistry*”, Wiley, New York, 3<sup>ra</sup> ed., 1985.



**Figura 4.12.** Estructura de los bitiofenos monosustituidos con un éter corona.

La síntesis de las dicetonas (**4a-c**) se realiza partiendo del ácido 4-oxo-4-tiofen-2-il-butírico, sintetizado anteriormente en el laboratorio.<sup>15</sup> Este ácido se hace reaccionar con el respectivo aza-éter cíclico, usando como agente activante la dicitclohexilcarbodiimida (DCC) en presencia de 1-hidroxibenzotriazol (BtOH).<sup>2j</sup>

Los aza-oxa-tioéteres empleados para la síntesis de **4b** y **4c** se obtienen de fuentes comerciales (ALDRICH). El ciclo utilizado en la obtención de **4a** se sintetiza en el laboratorio según la técnica descrita en la literatura.<sup>16</sup> Para su obtención se parte del cloruro de bis-(2-cloroetilamonio), que una vez protegido con di-*t*-butil)dicarbonato (Boc), se condensa con el 3,6-dioxaoctano-1,8-ditiol, empleando como base el Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

Para la preparación de los bitiofenos (**4d-f**) se utiliza el reactivo de Lawesson (2,4-bis(4-metoxifenil)-1,3,2,4-ditiadifosfenato-2,4-disulfuro), que convierte los grupos cetonas en tiocetonas, a continuación ocurre la reacción de ciclización, que origina la formación del anillo de tiofeno. Este es un reactivo usado en la tiónación de gran variedad de compuestos carbonílicos. Se prepara a partir del P<sub>4</sub>S<sub>10</sub>, haciendo reaccionar este con anisol. Sus ventajas radican en que es muy reactivo y suficientemente soluble en disolventes orgánicos calientes, por lo que permite realizar las reacciones en condiciones homogéneas.

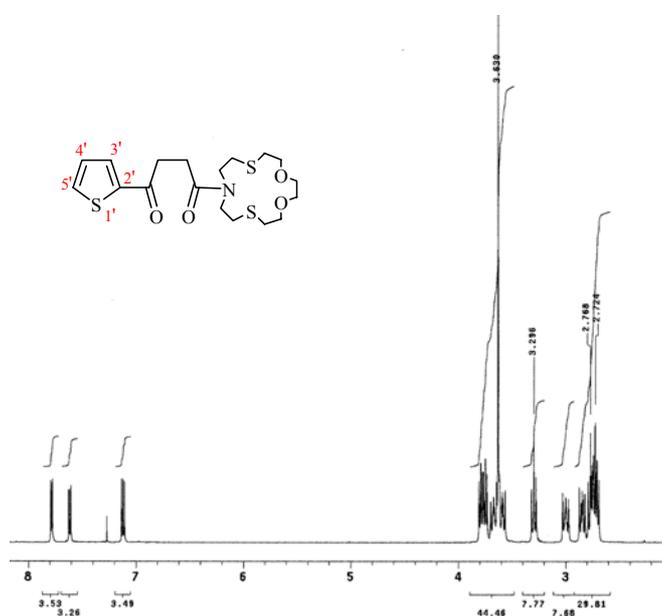
Las rutas de síntesis escogidas se basan en estudios previos realizados por M. M. Raposo y colaboradores para la obtención de bitiofenos análogos.<sup>2j</sup> En la síntesis de

<sup>15</sup> El ácido 4-oxo-4-tiofen-2-il-butírico se obtiene a partir del anhídrido succínico, el cual se convierte primeramente en cloruro de ácido. Este se hace reaccionar con tiofeno, y mediante una reacción de acilación de Friedel-Crafts dá lugar al 4-(2'-tienil)-4-oxobutanoato de metilo. Por hidrólisis alcalina de este último se obtiene el producto deseado. Ver referencia 2j.

<sup>16</sup> (a) L. G. A. van de Water, W. Buijs, W. L. Driessen, J. Reedijk, *New J. Chem.*, **25**, **2001**, 243; (b) F. Sancenón Galarza, "Receptores funcionalizados con grupos fotoactivos para el reconocimiento molecular de aniones y cationes", Tesis Doctoral, Departamento de Química, Universidad Politécnica de Valencia, **2003**.

las amidas (**4a-c**) usando la DCC se observa que es difícil la separación de la dicitclohexilurea (DCU) formada. Las señales de la DCU aparecen en los espectros de RMN de las amidas aún después de haberlas separado en la columna cromatográfica. Esto provoca una disminución de los rendimientos de la reacción, si sólo se tiene en cuenta la amida que se ha obtenido pura.

Al caracterizar la amida **4a** por RMN-<sup>1</sup>H se observa que aparecen en la zona alifática las señales correspondientes a los aza-ciclos. Las señales de los grupos metilenos, que son equivalentes por simetría en el ciclo, se desdoblán, apareciendo una señal por cada metileno. Esto se puede atribuir al carácter parcial de doble enlace que presentan las amidas, lo cual impide la libre rotación del enlace C-N y podría causar que se obtengan en RMN señales diferentes, para protones que se encuentran en posiciones equivalentes simétricamente en la molécula. En la figura 4.13 se muestra el espectro de RMN-<sup>1</sup>H obtenido para **4a** (4-oxo-1-tiofen-2-il-4-(1,4-dioxa-7,13-ditia-10-azaciclopentadec-10-il)butan-1-ona).

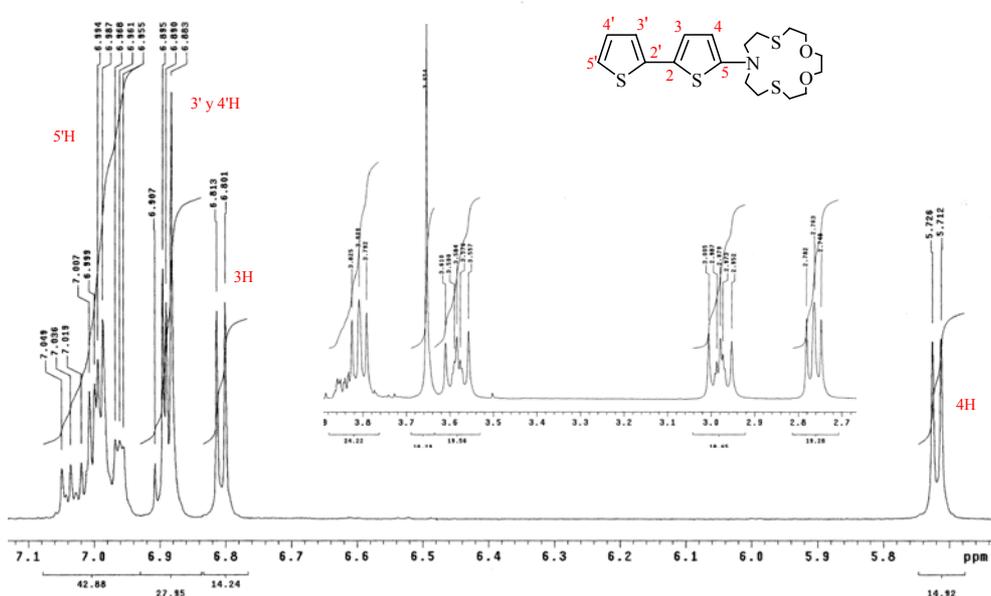


**Figura 4.13.** Espectro RMN-<sup>1</sup>H de 4-oxo-1-tiofen-2-il-4-(1,4-dioxa-7,13-ditia-10-azaciclopentadec-10-il)butan-1-ona (**4a**).

Las señales del anillo de tiofeno aparecen a 7.13 (dd), 7.62 (dd) y 7.80 (dd) ppm como es de esperar para este tipo de compuestos. Mediante el espectro de RMN-<sup>13</sup>C y HC-COSY de la molécula se puede llegar a asignar sin ninguna duda las

señales de todos los núcleos de carbono e hidrógeno de **4a**. Las amidas **4b** y **4c** aún están en fase de síntesis.

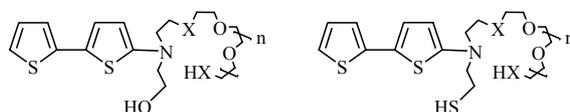
Al realizar el segundo paso de la reacción para sintetizar el bitiofeno **4d** se obtienen varios productos de reacción. Se procedió a purificar los crudos de reacción mediante cromatografía de columna y se analizan las fracciones obtenidas mediante espectroscopia de masas. Se obtiene el bitiofeno **4d** puro en una de las fracciones, el espectro RMN-<sup>1</sup>H de este producto se muestra en la figura 4.14. Es de destacar que las señales de la zona aromática son características de los bitiofenos 5-sustituídos. También es importante destacar que en este producto las señales de los grupos metilenos del macrociclo vuelven a ser simétricamente equivalentes por lo que aparecen 5 señales en la zona alifática. Los tripletes que aparecen a campos más bajos, 2.75 y 2.96 ppm, corresponden a los metilenos unidos a azufre, mientras que los unidos a nitrógeno aparecen a 3.58 ppm. Los metilenos enlazados con el oxígeno dan señales más desblindadas 3.65 (s) y 3.78-3.81 (t) ppm.



**Figura 4.14.** Espectro RMN-<sup>1</sup>H de 10-(2,2'-bitiofen-5-il)-1,4-dioxa-7,13-ditia-10-azaciclopentadecano (**4d**), en la parte interior de la zona aromática aparece insertada la zona alifática.

Del análisis de otras fracciones eluidas de la columna de la reacción de obtención de **4d**, se observa la formación de productos con el macrociclo abierto. Estos

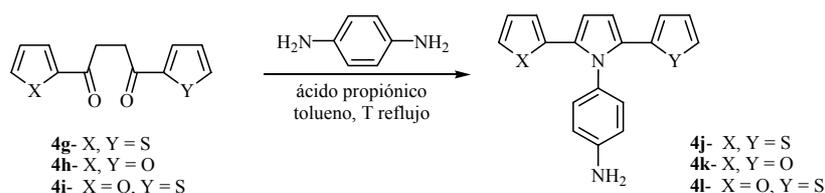
productos contienen los bitiofenos con el *N* sustituido por cadenas lineales con grupos -OH y -SH terminales, por el análisis de los espectros de Masas se puede suponer que corresponden con los compuestos cuya estructura aparece en la figura 4.15. Esta reacción está aún en fase de estudio, por lo que las características espectroscópicas de los bitiofenos **4e** y **4f** (figura 4.12) no se describirán en este trabajo.



**Figura 4.15.** Posibles productos obtenidos al hacer reaccionar las amidas (**4a-c**) con el reactivo de Lawesson.

#### 4.2.2 Síntesis y caracterización de triheterociclos.

También se han sintetizado precursores triheterocíclicos como los que se muestran en la figura 4.16, los cuales se pueden funcionalizar con grupos receptores de aniones como las ureas, tioureas, amidas o sales de guanidinio. De estos compuestos el **4g** aparece descrito en la literatura, mientras que **4h** y **4i** son sintetizados por primera vez, las estructuras de todos ellos se representan en la figura 4.16.

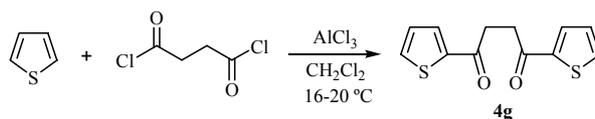


**Figura 4.16.** Estructura de los triheterociclos.

Para la síntesis de las dicetonas (**4g-i**) se siguieron 2 rutas sintéticas, según como aparecían reportadas en la literatura.<sup>17,18</sup> En el caso de la sustituida por dos anillos tienilos (**4g**) se parte del tiofeno y mediante una acilación de Friedel Crafts con cloruro de succinilo en presencia de tricloruro de aluminio obtenemos el producto deseado, figura 4.17. Este producto es comercial, pero se realizó la síntesis por considerarlo demasiado costoso.

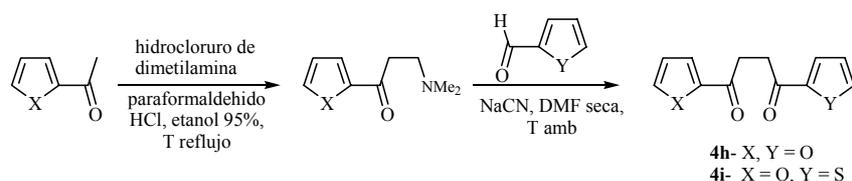
<sup>17</sup> M. V. Joshi, C. Hemler, M. P. Cava, J. L. Cain, M. G. Bakker, A. J. McKinley, R. M. Metzger, *J. Chem. Soc. Perkin Trans 2*, **1993**, 1081.

<sup>18</sup> A. Merz, F. Ellinger, *Synthesis*, **6**, **1991**, 462-464.



**Figura 4.17.** Esquema de obtención de la 1,4-ditiofen-2-ilbutano-1,4-diona (**4g**).

La síntesis de **4h** y **4i** se realiza a partir del acetilfurano/tiofeno en presencia de dimetilamina, paraformaldehído y ácido clorhídrico en etanol<sup>17</sup>, obteniéndose la 3-dimetilamino-1-(2-aryl)propanona correspondiente. En el segundo paso de la reacción la arilcetona obtenida se hace reaccionar con el tiofeno/furano-2-carboxaldehído y cianuro de sodio en dimetilformamida seca<sup>19</sup> para dar el producto deseado, figura 4.18.



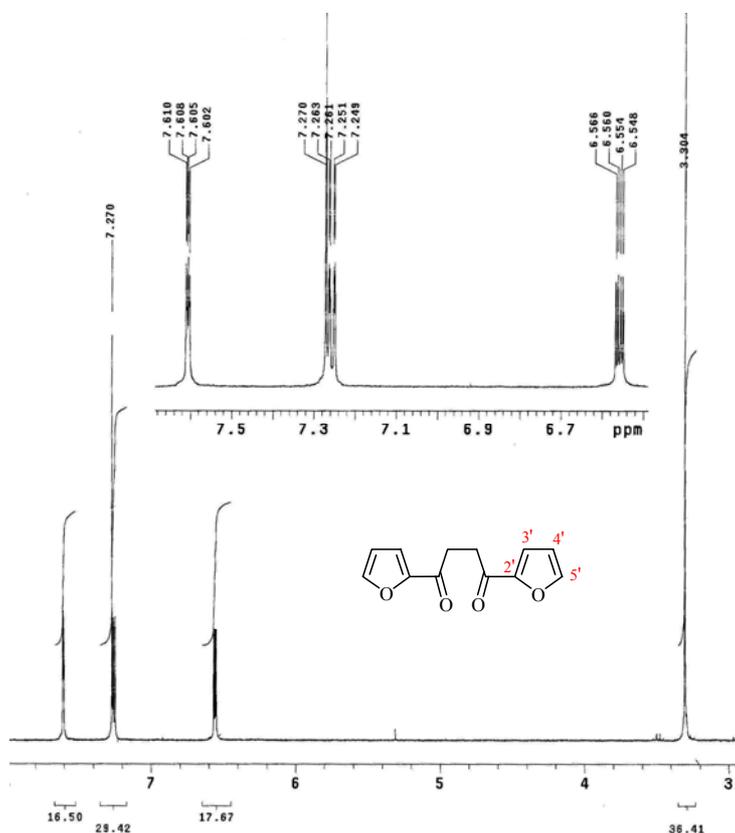
**Figura 4.18.** Ruta de síntesis de 1,4-difuran-2-ilbutano-1,4-diona (**4h**) y 1-furan-2-il-4-tiofen-2-ilbutano-1,4-diona (**4i**).

A la técnica descrita para **4h-i** sólo se le realizan pequeñas modificaciones. La 3-dimetilamino-1-(2-furil/tienil)-propanona intermediaria se lava con acetona en lugar de lavarla con éter. De esta forma el sólido adquiere un aspecto cristalino y es de color blanco. Lavando con éter se obtiene un sólido amorfo amarilloso que por RMN se observa, que es menos puro que el obtenido al lavar con acetona. Además para aislar los productos (**4h** y **4i**) en los dos casos se adiciona agua para que precipiten, después de extraída la mezcla de reacción con diclorometano, ya que si se sigue la técnica descrita es muy difícil eliminar la DMF que ha pasado a la fase orgánica. Los rendimientos obtenidos en esta síntesis (~20 %) no son tan altos como los que aparecen en la literatura (50-60 %), se considera que pueden estudiarse otros métodos de síntesis para estos compuestos.

En la figura 4.19 se observa el espectro de RMN-<sup>1</sup>H de 1,4-difuran-2-ilbutano-1,4-diona (**4h**). Al ser simétrica la molécula sólo se observan 4 señales, 3 de ellas de

<sup>19</sup> En este caso, el cianuro forma, como en la Reacción de Stetter, un derivado con el aldehído que convierte el carbono del grupo carbonilo en un centro nucleofílico, el cual ataca al carbono contiguo al grupo amino de la 3-dimetilamino-1-(2-aryl)propanona.

protones aromáticos y la de los metilenos. Es de destacar que las señales que aparecen como doblete de doblete a 6.56, 7.26 y 7.61 ppm corresponden a los protones del anillo de furano. La señal que aparece a campos más bajos (7.61 ppm) se asigna a los protones en posición 5' de ambos anillos. Las constantes de acoplamiento en todos los casos están en el orden de las calculadas para este tipo de anillo.



**Figura 4.19.** Espectro RMN- $^1\text{H}$  de 1,4-difuran-2-ilbutano-1,4-diona (**4h**).

La síntesis de **4j-i** se lleva a cabo mediante la reacción de Paal-Knorr para la obtención de pirroles. Se produce la condensación de los compuestos 1,4-dicarbonílicos (**4g-i**) obtenidos anteriormente, con una amina, en este caso la 1,4-fenilendiamina, ver figura 4.16. Esta reacción ocurre catalizada por ácidos. Para elegir el ácido a utilizar como catalizador se deben tener en cuenta varios factores. Un  $\text{pH} < 3$  provoca la formación del furano como producto principal, por lo que se

deben usar ácidos débiles, como el ácido acético, que es el más utilizado en este tipo de reacciones. Si la reacción se lleva a cabo con aminas aromáticas, menos nucleofílicas que el amonio o las alifáticas, se ha propuesto que el uso del ácido propiónico aumenta el rendimiento del producto deseado.<sup>20</sup> El pH ideal cuando se trata de realizar la reacción con aminas aromáticas está entre 4.5 y 5.5.<sup>21</sup>

Teniendo en cuenta las consideraciones anteriores se sintetizaron el 4-(2,5-ditiofen-2-il-pirrol-1-il)-anilina (**4j**) y el 4-(2,5-difuran-2-il-pirrol-1-il)-anilina (**4k**). Para ello se utilizó una relación molar 1:1 de dicetona-amina en tolueno y usando ácido propiónico como catalizador. Siguiendo esta técnica, en los dos casos, se recupera la mitad de la dicetona inicial que queda sin reaccionar. Si no tenemos en cuenta esta cantidad tenemos el producto deseado puro con un 63.1 y 68.4 % de rendimiento respectivamente.

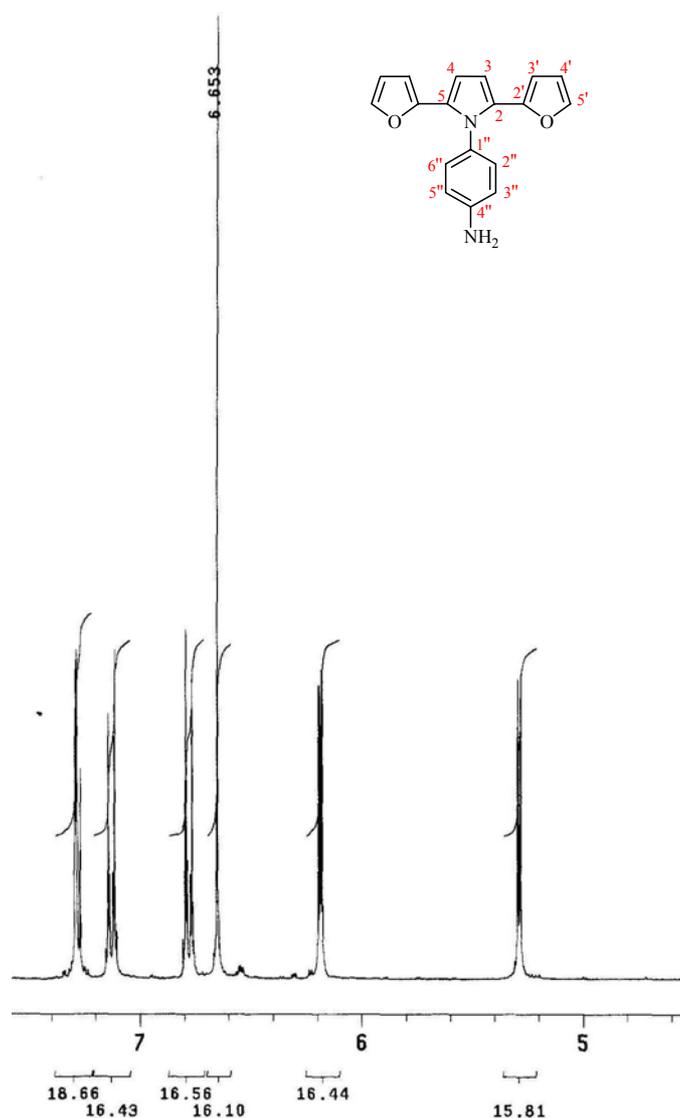
Los espectros de FT-IR muestran las bandas de absorción características debidas a las vibraciones de valencia N-H que aparecen a 3376 cm<sup>-1</sup>. A 1620 cm<sup>-1</sup> aparece la banda de la vibración de doblaje N-H. Entre 1517 y 1411 cm<sup>-1</sup> las bandas asociadas a las vibraciones de valencia de los enlaces C-C y C-X de los anillos aromáticos. En 1289 cm<sup>-1</sup>, en la zona de la huella de la molécula, se puede apreciar la banda asociada a la vibración de valencia C-N del grupo amino y en la región de 973 a 730 cm<sup>-1</sup> las vibraciones de doblaje C-H, típicas de compuestos aromáticos.

En la figura 4.20 se muestra el espectro de RMN-<sup>1</sup>H de 4-(2,5-difuran-2-il-pirrol-1-il)-anilina (**4k**).

---

<sup>20</sup> P. E. Just, K. L. Chane-Ching, P. C. Lacaze, *Tetrahedron*, 58, **2002**, 3467.

<sup>21</sup> L. Kurtí, B. Czakó, “*Strategic Applications of Named Reactions in Organic Chemistry*”, Elsevier Academia Press, **2005**.

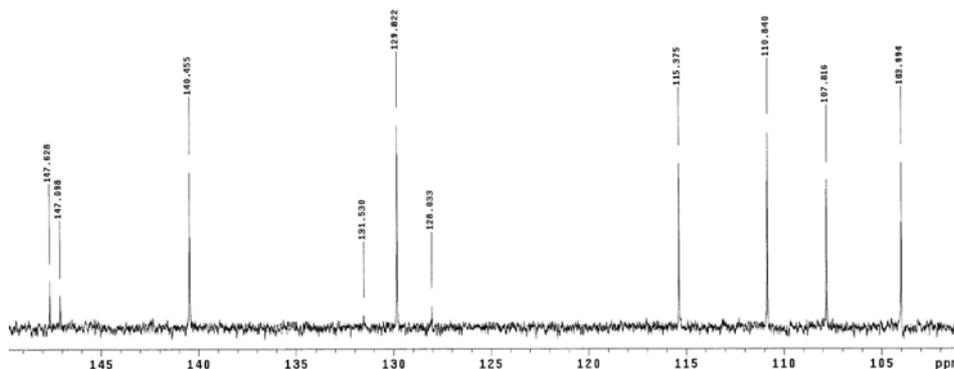


**Figura 4.20.** Espectro RMN-<sup>1</sup>H de 4-(2,5-difuran-2-il-pirrol-1-il)-anilina (**4k**).

Este producto se sintetiza a partir de la 1,4-difuran-2-ilbutano-1,4-diona (**4h**), cuyo espectro se muestra en la figura 4.19. Como se puede observar las señales de los anillos de furano que en la dicetona aparecen a 6.56 (4'-H), 7.26 (3'-H) y 7.61 (5'-H) al formarse el pirrol sufren un desplazamiento a campos más altos 5.29 (3'-H), 6.19 (4'-H) y 7.29 (5'-H). Por los valores de las constantes de acoplamiento de las señales se deduce que la menos desblindada (5.29 ppm,  $J = 0.6$  y  $3.3$  Hz)

corresponde a los protones de la posición 3' del anillo de furano. La señal de los protones del anillo de pirrol aparece a 6.65 ppm, en forma de singlete. Los dobletes de los dos pares de protones del benceno 1,4-disustituido se pueden observar a 6.78 y 7.13 ppm.

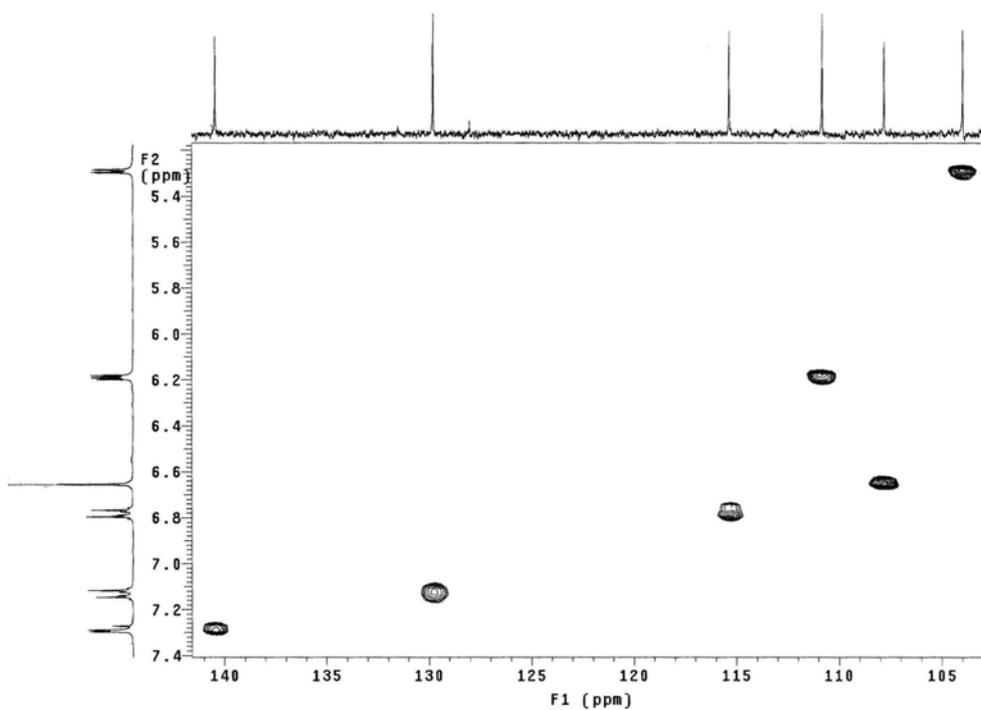
En el espectro de RMN-<sup>13</sup>C de la 4-(2,5-difuran-2-il-pirrol-1-il)-anilina (**4k**) se aprecia que están todas las señales correspondientes a los carbonos de la molécula, figura 4.21.



**Figura 4.21.** Espectro RMN-<sup>13</sup>C de 4-(2,5-difuran-2-il-pirrol-1-il)-anilina (**4k**).

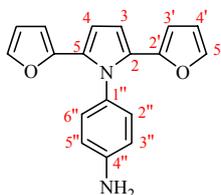
Para las señales de los núcleos de hidrógeno y de carbono cuya asignación es dudosa por los espectros RMN-<sup>1</sup>H, RMN-<sup>13</sup>C se emplea la técnica de coherencia cuántica múltiple heteronuclear (HMQC)<sup>22</sup> por detección protónica. Esta técnica de espectroscopia bidimensional proporciona información de la conectividad heteronuclear C-H. El espectro HMQC de **4k** se muestra en la figura 4.22. En la Tabla 4.1 aparecen las señales de los núcleos de carbono que pueden correlacionarse con los protones, mediante el espectro HMQC, por estar directamente unidos a estos.

<sup>22</sup> HMQC. Acrónimo de Heteronuclear Multiple Quantum Correlation.



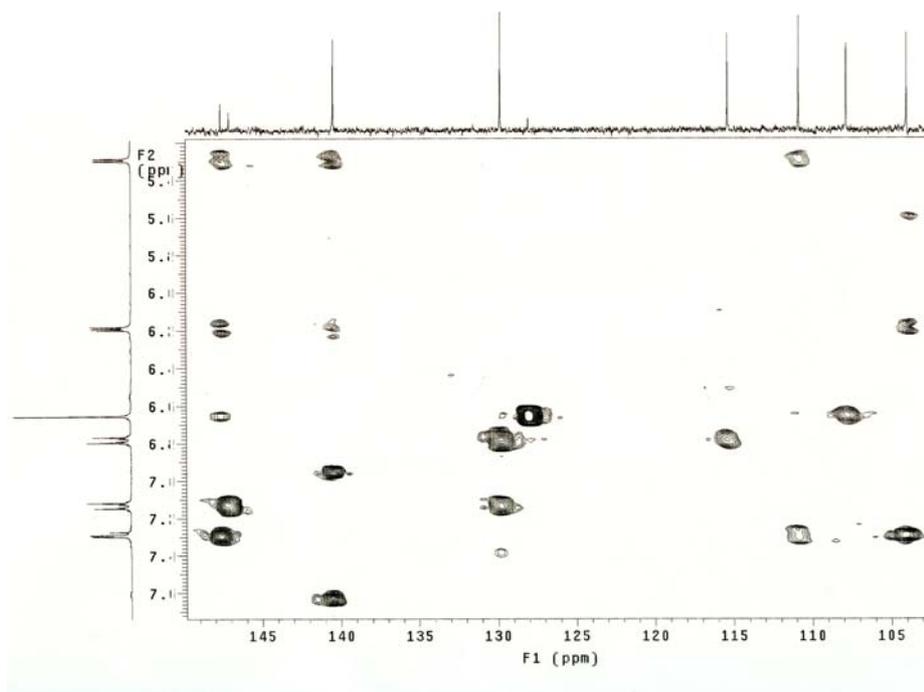
**Figura 4.22.** Espectro bidimensional RMN-HMOC de la 4-(2,5-difuran-2-il-pirrol-1-il)-anilina (**4k**).

**Tabla 4.1.** Correlación de las señales de  $^{13}\text{C}$  con las de los protones unidos directamente según el espectro RMN-HMOC en DMSO [ $\delta(\text{ppm})$ ] de **4k**.



$^1\text{H}$	$\delta(\text{ppm})$ $^1\text{H}$	C-H directo $\delta(\text{ppm})$ $^{13}\text{C}$	$^{13}\text{C}$ asignado
3'-H	5.29	103.99	C3'
4'-H	6.19	110.84	C4'
3- y 4- H	6.65	107.82	C3 y C4
2''- y 6''-H	6.78	115.37	C2'' y C6''
3''- y 5''-H	7.13	129.82	C3'' y C5''
5'-H	7.29	140.45	C5'

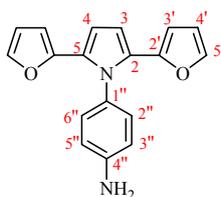
Para asignar los átomos de carbono cuaternarios, se utiliza la técnica de RMN bidimensional conocida como HMBC.<sup>23</sup> A través de este método se transmiten los acoplamientos  $^2J_{CH}$  y  $^3J_{CH}$ , que generan coherencias cuánticas múltiples heteronucleares a larga distancia. El espectro HMBC obtenido para **4k** se observa en la figura 4.23. Los desplazamientos de los carbonos cuaternarios, asignados sobre la base de este espectro se muestran en la Tabla 4.2.



**Figura 4.23.** Espectro bidimensional RMN-HMBC de la 4-(2,5-difuran-2-il-pirrol-1-il)-anilina (**4k**).

<sup>23</sup> HMBC. Acrónimo de Heteronuclear Shift Correlation via Multiple Bond Conectivities.

**Tabla 4.2.** Correlación de las señales de  $^{13}\text{C}$  con las de los protones no unidos directamente a ellos según el RMN-HMBC en DMSO [ $\delta(\text{ppm})$ ] de **4k**.



$\delta$ (ppm) $^{13}\text{C}$	C-H no unidos directamente $\delta$ (ppm) $^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$ asignado
115.36	6.78 (2''- y 6''-H)	C1''
128.03	6.65 (3- y 4-H)	C2 y C5
147.10	7.13 (3''- y 5''-H)	C4''
147.63	5.29 (3'-H) / 6.19 (4'-H) / 6.65 (3- y 4-H) / 7.29 (5'-H)	C2'

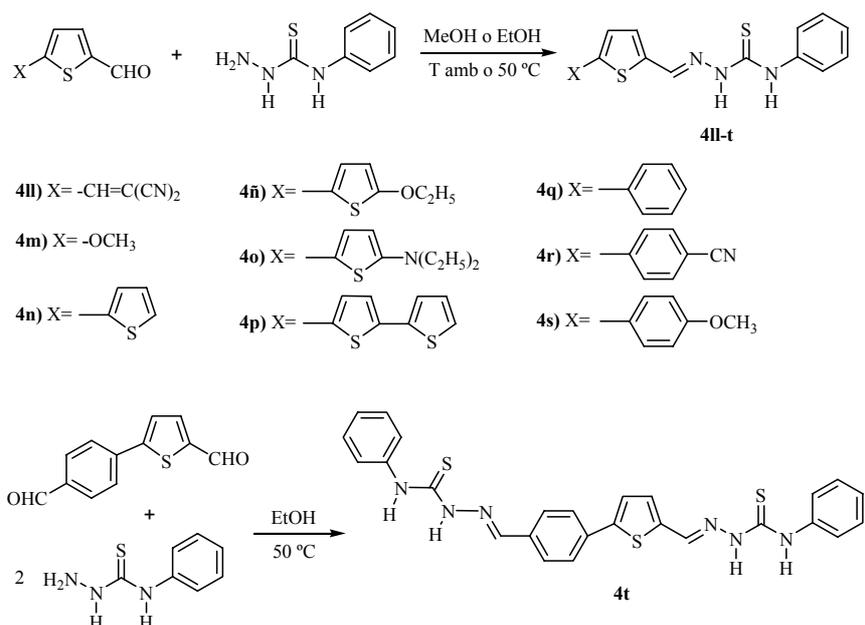
Al observar que con el uso de las condiciones anteriores reaccionaba poca dicetona de partida se intentó sintetizar **4k** con las condiciones reportadas por Bakker y colaboradores<sup>17</sup> para la obtención de *N*-metilpirrol-2,5-diarilos. En este caso los autores utilizan el acetato de sodio como catalizador y etanol como disolvente. En estas condiciones no se forma el producto de nuestro interés **4k**.

También se intentó sintetizar **4j** usando ácido *p*-toluensulfónico y ácido acético glacial como catalizador, pero con estas condiciones tampoco se obtienen buenos rendimientos. Este paso final de la síntesis de los triheterociclos se optimizará. Una de las variantes a probar será la sustitución de los ácidos orgánicos por catalizadores ácidos del tipo Montmorillonita K10/KSF. Cuando se haya comprobado bajo que condiciones de reacción se obtienen mejores rendimientos de **4k** y **4j**, se llevará a cabo la síntesis de **4l**.

#### 4.2.3 Síntesis y caracterización de feniltiosemicarbazonas.

Se sintetizaron una serie de feniltiosemicarbazonas derivadas de aldehídos 2-tiofenil-5-sustituídos. Estos aldehídos son facilitados por el grupo de M. Raposo<sup>2k,2n</sup> y otros son comerciales. Esta reacción transcurre mediante el ataque nucleofílico del grupo amino terminal de la tiosemicarbazida al carbonilo del

aldehído. La condensación del aldehído con la amina provoca la formación de la base de Schiff, en este caso la tiosemicarbazona (figura 4.24).<sup>24</sup>



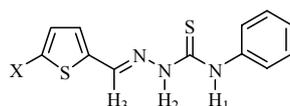
**Figura 4.24.** Estructura de las tiosemicarbazonas sintetizadas (**4II-t**).

Las reacciones en todos los casos se producen en condiciones muy suaves, a temperatura ambiente o calentando a 50 °C en los casos en que los aldehídos de partida eran poco solubles. Se obtienen buenos rendimientos del producto deseado (40-90 %), por debajo del 60 % de rendimiento sólo están los casos en que el producto no precipita con facilidad de la mezcla de reacción y al concentrar la mezcla se obtiene impuro. Se purifican los productos, en los casos en que es necesario, por recristalización de etanol o de mezclas etanol-agua.

La tabla 4.3 recoge los datos de rendimiento de reacción, temperatura de fusión y color de cada una de las tiosemicarbazonas sintetizadas. Además se muestran los valores de los desplazamientos en RMN-<sup>1</sup>H de los protones más ácidos en las tiosemicarbazonas. Estos valores servirán de referencia para analizar el comportamiento de estos receptores en el reconocimiento óptico de aniones, ya que estos hidrógenos pueden dar interacciones a través de la formación de enlaces de hidrógeno con ciertos aniones.

<sup>24</sup> H. Schiff, *Ann.*, 148, **1868**, 338.

Tabla 4.3. Datos de las tiosemicarbazonas sintetizadas.



	X	Rendimiento (%)	Temperatura de fusión (°C)	Color	RMN- <sup>1</sup> H δNH(ppm)		
					H3	H1	H2
4ll	H	65.5	185.6 - 186.9	amarillo pálido	8.14	9.11	10.29
4m	-CH=C(CN) <sub>2</sub>	76.9	185.0 - 186.0	rojo	8.02	9.07	9.60
4n	-OCH <sub>3</sub>	73.8	> 168.0 (cd)	amarillo	7.95	9.02	10.03
4ñ		61.2	188.5 - 189.0	amarillo	8.04	9.1	10.01
4o		50*	171.3 - 171.6	marrón	8.07	9.09	10.49
4p		41*	> 216.0 (cd)	naranja	7.97	9.09	9.35
4q		88.7	178.0 - 179.0	amarillo	8.04	9.13	9.79
4r		58.2	201.8 - 202.5	naranja	8.06	9.11	9.91
4s		64.6*	196.4 - 196.8	amarillo	8.08	9.13	10.14
4t	- <i>p</i> -(feniltiosemicarbazona)fenilo	77*	> 234.5 (cd)	naranja	insoluble en CDCl <sub>3</sub>		

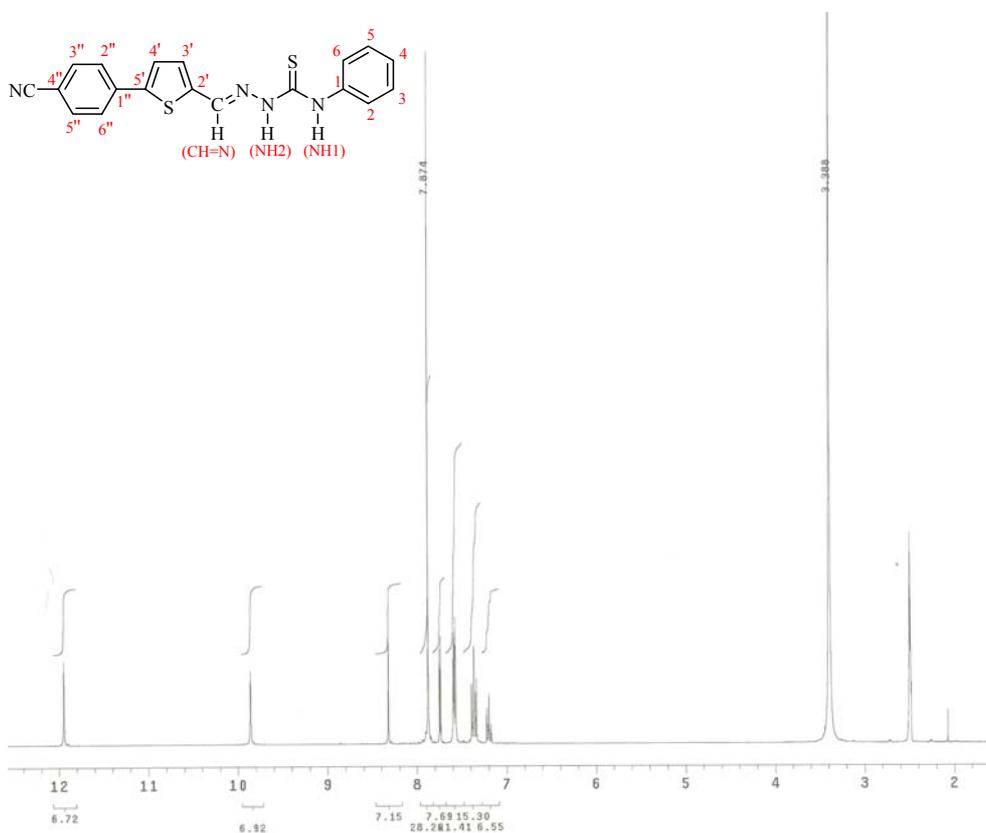
\* Rendimiento aproximado, quedan fracciones por recrystallizar.

cd - productos que funden con descomposición

Los espectros de FT-IR muestran las bandas de absorción características debidas a las vibraciones de valencia de los enlaces N-H en la región entre 3335 y 3290 cm<sup>-1</sup>. Entre 1599 y 1585 cm<sup>-1</sup> aparecen las bandas de vibración de valencia de los enlaces C-C en anillos aromáticos fuertemente conjugados. Además podemos observar en los espectros IR dos bandas producto de las vibraciones de valencia del grupo tiocarbonilo unido a nitrógeno, la primera entre 1300 y 1100 cm<sup>-1</sup> y la segunda entre 1550 y 1460 cm<sup>-1</sup>. En algunos de los compuestos se pueden observar también las vibraciones de valencia del =C-H a alrededor de 3100 cm<sup>-1</sup>, y las vibraciones de tensión fuera del plano de este mismo grupo, en la región de 1000 a 650 cm<sup>-1</sup>. En

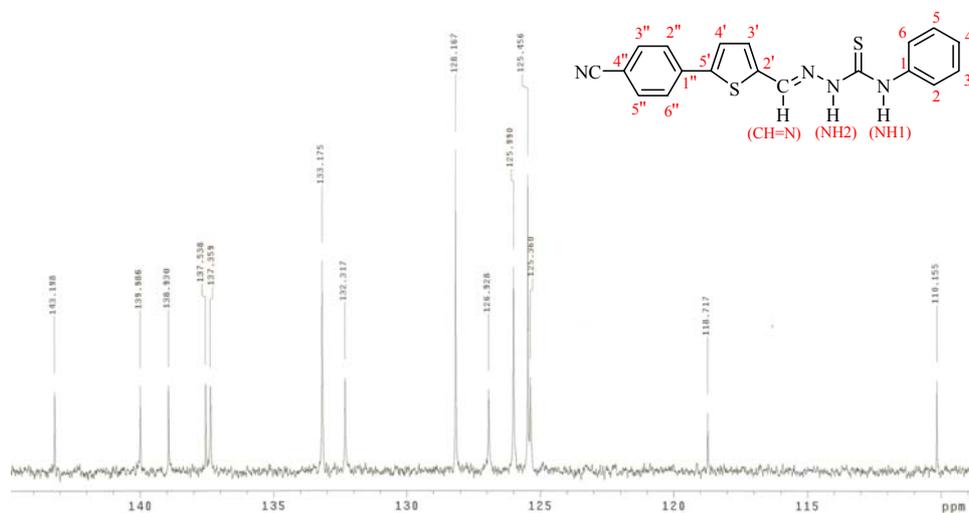
los casos en que los grupos funcionales enlazados a los anillos aromáticos presentan absorción en una región característica, se puede comprobar la presencia de estos en la molécula por la aparición de estas bandas. Este es el caso de la banda que aparece a  $2220\text{ cm}^{-1}$  en el espectro de **4r**, característica del grupo ciano.

Mediante los espectros de RMN se pueden dilucidar las estructuras de los compuestos obtenidos. A modo de ejemplo de los derivados heterocíclicos de las tiosemicarbazonas sintetizados se explica como se realizó la caracterización del producto **4r**. En la figura 4.25 y 4.26 se muestran los espectros RMN- $^1\text{H}$  y RMN- $^{13}\text{C}$  de **4r**, respectivamente. En el espectro RMN- $^1\text{H}$  del producto vemos que aparecen todas las señales de los protones que forman parte de la molécula. Excepto la señal entre 7.56 y 7.69 ppm que es un multiplete, el resto tiene la multiplicidad e integración que deben presentar.



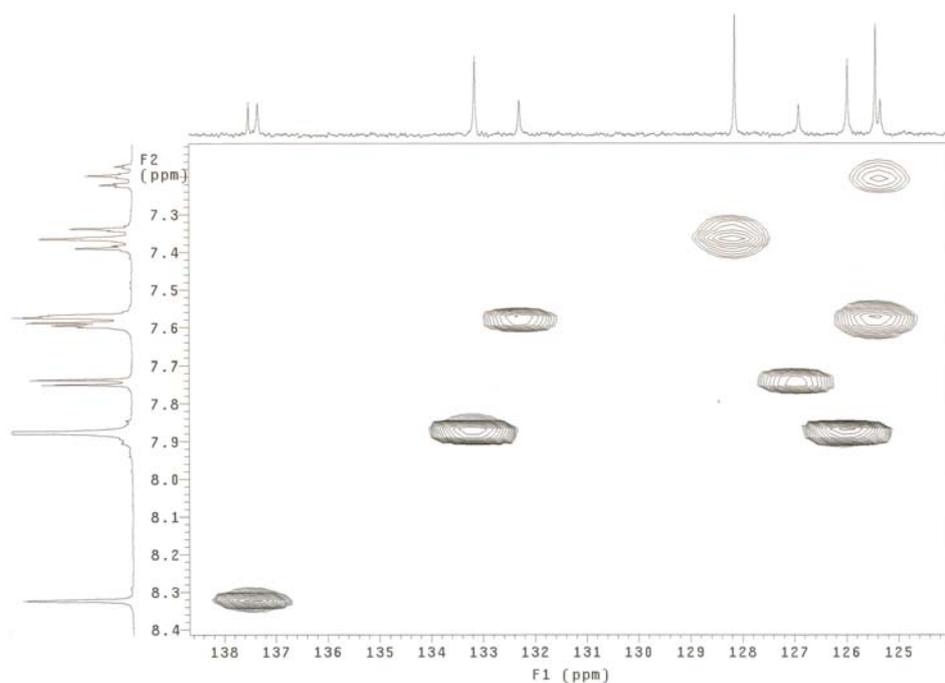
**Figura 4.25.** Espectro RMN- $^1\text{H}$  de la 5-(4-cianofenil)tiofeno-2-carbaldehído *N*-feniltiosemicarbazona (**4r**).

Las señales del espectro RMN-<sup>1</sup>H que aparecen a 9.86 y 11.94 ppm en forma de singletes, corresponden a los protones unidos a los nitrógenos, NH1 y NH2, respectivamente. Mientras que el singlete a 8.32 ppm corresponde al protón unido al carbono imínico (CH=N). Es de destacar que las señales de los protones del anillo de benceno enlazado al tiofeno colapsan en un singlete (7.87 ppm) por el efecto del grupo ciano. El espectro RMN-<sup>13</sup>C de **4r**, figura 4.26 confirma la estructura del compuesto.



**Figura 4.26.** Espectro RMN-<sup>13</sup>C de la 5-(4-cianofenil)tiofeno-2-carbaldehído *N*-feniltiosemicarbazona (**4r**).

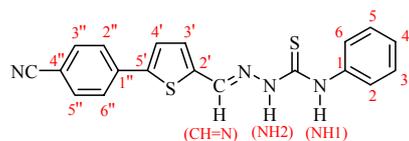
El espectro RMN-<sup>13</sup>C del producto muestra el número de señales correspondientes a los carbonos de que se encuentran formando parte de la molécula. La asignación de cada una de las señales resulta más complicada que en el caso de los protones, por lo que se complementa con los RMN bidimensionales que correlacionan las señales de los carbonos con las de los protones, figuras 4.27 y 4.28.



**Figura 4.27.** Espectro bidimensional RMN-HMQC de la 5-(4-cianofenil)tiofeno-2-carbaldehído *N*-feniltiosemicarbazona (**4r**).

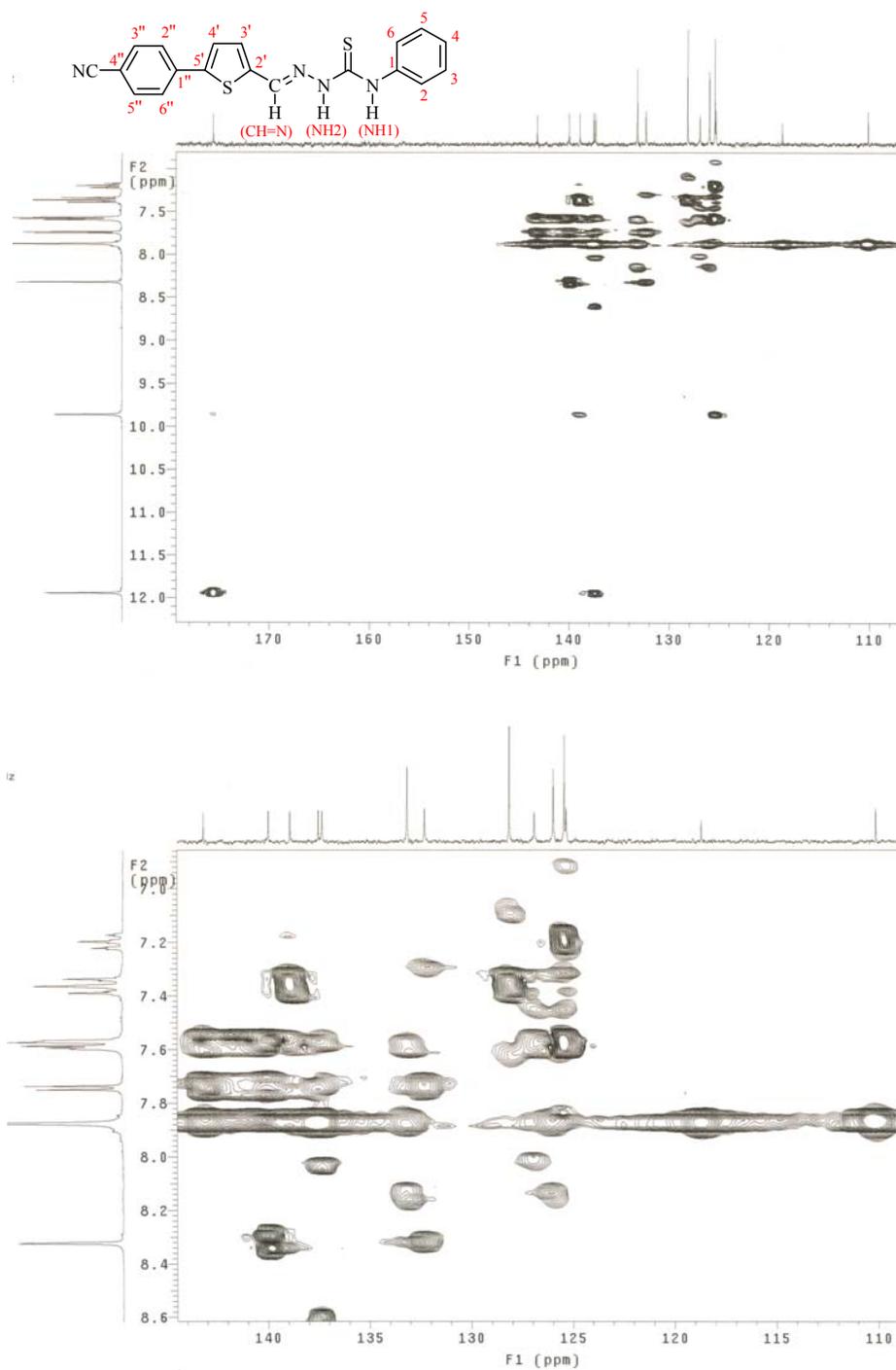
Con la información brindada por el espectro HMQC se pueden asignar las señales de los carbonos unidos a protones. Se observa que la señal a 137.54 ppm se correlaciona con la del protón a 8.32 ppm, por lo que se le asigna al carbono imínico. En la tabla 4.4 se muestran los valores de desplazamiento de todos los carbonos que fueron asignados mediante esta técnica.

**Tabla 4.4.** Correlación de las señales de  $^{13}\text{C}$  con las de los protones unidos directamente según el RMN-HMQC en DMSO [ $\delta(\text{ppm})$ ] de **4r**.



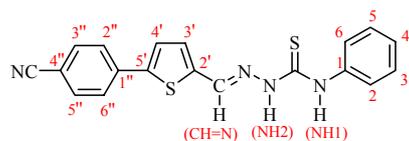
$^1\text{H}$	$\delta$ (ppm) $^1\text{H}$	C-H directo $\delta$ (ppm) $^{13}\text{C}$	$^{13}\text{C}$ asignado
4-H	7.20	125.36	C4
3- y 5-H	7.36	128.17	C3 y 5
2- y 6-H y 3'-H	7.56 - 7.69	132.32 y 125.46	C2 y 6 y C3'
4'-H	7.74	126.93	C4'
2'', 3'', 5''- y 6''-H	7.87 (s)	133.18 y 125.99	C2'' y 6'' y C3'' y 5''
- $\underline{\text{C}}\text{H}=\text{N}$	8.32	137.54	- $\underline{\text{C}}\text{H}=\text{N}$

Como se observa en la tabla anterior las señales de los carbonos del anillo bencénico enlazado al tiofeno (133.18 y 125.99 ppm), no pueden ser asignadas porque las de los protones unidos a estos carbonos aparecen como un singlete. La asignación de estas señales, así como las de los carbonos cuaternarios se realiza a través de la información brindada por el espectro HMBC, figura 4.28. La correlación de las señales que aparecen a 132.32 y 125.46 ppm, con los protones vecinos, permiten definir cual de ellas corresponde a los carbonos de la posición orto del anillo bencénico (C2 y 6) y cual al carbono del tiofeno (C3').



**Figura 4.28.** Espectro bidimensional RMN-HMBC de la 5-(4-cianofenil)tiofeno-2-carbaldehído *N*-feniltiosemicarbazona (**4r**).

**Tabla 4.5.** Correlación de las señales de  $^{13}\text{C}$  con las de los protones no unidos directamente según el RMN-HMBC en DMSO [ $\delta(\text{ppm})$ ] de **4r**.

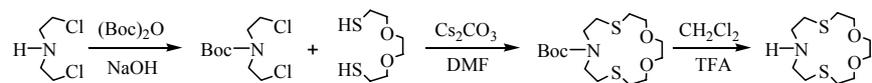


$\delta$ (ppm) $^{13}\text{C}$	C-H no unidos directamente $\delta$ (ppm) $^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$ asignado
110.16	7.87 (2'', 3'', 5''- y 6''-H)	C1'' o 4''
118.72	7.87 (2'', 3'', 5''- y 6''-H)	C1'' o 4''
125.46	7.36 (3-y 5-H) / 7.20 (4H)	C2 y 6
125.99	7.87 (2'', 3'', 5''- y 6''-H)	C3'' y 5''
132.32	8.32 (CH=N) / 7.74 (3'-H)	C3'
133.18	7.87 (2'', 3'', 5''- y 6''-H) / 7.56-7.69 (4'-H)	C2'' y 6''
137.36	no hay señal	<u>C</u> N
138.93	7.36 (3-y 5-H) / 7.56-7.69 (2- y 6-H)	C1
139.99	8.32 (CH=N) / 7.87 (2'', 3'', 5''- y 6''-H) / 7.74 (3'-H) / 7.56-7.69 (4'-H)	C2'
143.20	7.87 (2'', 3'', 5''- y 6''-H) / 7.74 (3'-H) / 7.56-7.69 (4'-H)	C5'
175.59	11.94 (NH2) y 9.86 (NH1)	C=S

Al analizar los picos cruzados del espectro HMBC se puede concluir la asignación de las señales de  $^{13}\text{C}$ . La señal que aparece a 175.59 ppm es la más desblindada por lo que se le asigna al carbono del tiocarbonilo (C=S) y se correlaciona con los protones de unidos a nitrógeno que se encuentran a 2 enlaces. Los carbonos cuaternarios del anillo de tiofeno se espera que aparezcan a campos bajos por estar unidos al azufre, se asignan las señales de 143.2 y 139.99 ppm. Existe un pico cruzado de la señal de 139.99 ppm con la de 8.32 ppm del protón imínico, por lo que esta será la señal que le corresponde al carbono del tiofeno unido a este grupo (C2'). Siguiendo este mismo procedimiento se caracterizan el resto de las tiosemicarbazonas sintetizadas.

### 4.3 Parte Experimental.<sup>25</sup>

#### 1. Síntesis de 1,4-dioxa-7,13-ditia-10-azaciclopentadecano.<sup>16</sup>



#### Paso 1.

En un matraz de 1 boca de 25 mL de capacidad se añaden 300 mg (1.68 mmol) de cloruro de bis-(2-cloroetil)amonio y 270 mg (6.72 mmol) de hidróxido de sodio y se disuelven en 10 mL de agua. La disolución se enfría en un baño de hielo hasta 0 °C y sobre ella se adicionan 370 mg (1.68 mmol) de di-*ter*-butildicarbonato (Boc)<sub>2</sub>O. La suspensión resultante se deja agitando 16 horas a temperatura ambiente. Al cabo de este tiempo se ha formado un aceite, que se extrae de la fase acuosa con 50 mL acetato de etilo, repitiendo la extracción 3 veces. Las fases orgánicas se unen y se secan sobre sulfato de magnesio anhidro. Posteriormente se filtra y se rotavapora obteniéndose 400 mg (98 %) de la *N*-Boc-bis(2-cloroetil)amina.

#### Paso 2.

En un matraz esférico de dos bocas, provisto de agitación magnética, atmósfera de argón y reflujo, se adicionan 645 mg (1.98 mmol) de carbonato de cesio anhidro y 100 mL de DMF seca, calentando hasta 100 °C. Se coloca un embudo de adición en una de las bocas y por espacio de 4 horas se adiciona una mezcla que contiene 400 mg (1.65 mmol) de la *N*-Boc-bis(2-cloroetil)amina obtenida anteriormente y 270 μL (1.65 mmol) de 3,6-dioxa-1,8-ditiool en 40 mL de DMF seca. La reacción se deja agitando a 100 °C durante 16 horas más y posteriormente se concentra al rotavapor. Se purifica el producto en una columna cromatográfica empaquetada con sílice, usando diclorometano y acetato de etilo como eluyentes. Se obtienen 140 mg (24 %) de *t*-butil-1,4-dioxa-7,13-ditia-10-azaciclopentadecano-10-carboxilato.

#### Paso 3.

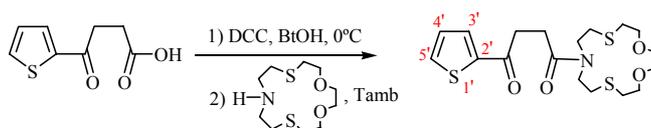
En un matraz se colocan 140 mg del ciclo puro protegido con Boc (*ter*-butil 1,4-dioxa-7,13-ditia-10-azaciclopentadecano-10-carboxilato) en 10 mL de

<sup>25</sup> En el caso de los compuestos sintetizados que aparecen previamente descritos en la literatura, sólo se realiza el RMN-<sup>1</sup>H para confirmar su estructura y se cita las referencias donde se encuentra la síntesis de los mismos. Para los compuestos nuevos si se realiza la caracterización intentando obtener el mayor número de datos posibles.

diclorometano. Se adicionan 10 mL de ácido trifluoacético (TFA) y se agita la mezcla durante 20 minutos y se lleva a sequedad en el rotavapor. Se añade agua y se basicifica con hidróxido de sodio 1 M hasta pH 12. La fase acuosa se extrae con diclorometano, al concentrar la fase orgánica se obtienen 99.7 mg (99 %) del ciclo puro (1,4-dioxa-7,13-ditia-10-azaciclopentadecano) en forma de aceite amarillo.

**RMN-<sup>1</sup>H** en CDCl<sub>3</sub> δ(ppm): 2.38 (brs, 1H, NH), 2.71-2.84 (m, 12H, CH<sub>2</sub>N y CH<sub>2</sub>S), 3.62-3.70 (m, 8H, CH<sub>2</sub>O).

2. Síntesis de 4-oxo-1-tiofen-2-il-4-(1,4-dioxa-7,13-ditia-10-azaciclopentadec-10-il)butan-1-ona (**4a**).



En un matraz de 1 boca de 25 mL de capacidad se disuelven 75.5 mg (0.4 mmol) del ácido 4-oxo-4-tiofen-2-il-butírico en 10 mL de diclorometano. La mezcla se agita y luego se enfría a 0 °C colocando el matraz en un baño de hielo. Se adicionan 99 mg (0.48 mmol) de 1,3-diciclohexilcarbodiimida y 65 mg (0.48 mmol) de 1-hidroxibenzotriazol, se agita durante 30 minutos. Se retira el baño de hielo y a temperatura ambiente se añaden 100 mg (0.4 mmol) de 1,4-dioxa-7,13-ditia-10-azaciclopentadecano. La reacción se sigue por TLC, comprobando que a las 24 horas se obtiene mejor rendimiento que si se deja mayor tiempo (Tabla 4.5).

La mezcla de reacción se filtra para separar la diciclohexilurea obtenida como producto colateral. El extracto orgánico se lava con ácido cítrico 5% (3 x 10 mL) y con hidrógenocarbonato de sodio 5% (3 x 10 mL), se seca sobre sulfato de magnesio y se concentra al rotavapor para dar un aceite marrón. El producto se purifica en columna cromatográfica empaquetada con sílica, usando como eluyente cantidades crecientes de éter etílico en éter de petróleo, obteniéndose un sólido blanco. T<sub>f</sub>= 86.3-86.7 °C.

**Tabla 4.6.** Rendimientos obtenidos al variar el tiempo de reacción

Tiempo de reacción (horas)	Rendimiento obtenido (%)
24	34
96	27

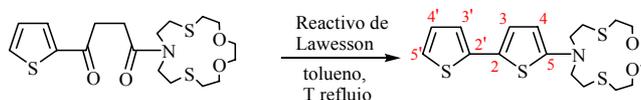
**RMN-<sup>1</sup>H** en CDCl<sub>3</sub> δ(ppm): 2.69-2.79 (m, 6H, CH<sub>2</sub>CO y SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 2.85 (t J= 8.1 Hz, 2H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 3.00 (t J= 8.1 Hz, 2H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 3.29 (t J= 8.1 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CO), 3.56-3.81 (m, 12H, CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub> y NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 7.13 (dd J= 3.9 y 5.1 Hz, 1H, 4'-H), 7.62 (dd J= 1.2 y 5.1 Hz, 1H, 5'-H), 7.80 (dd J= 1.2 y 3.9 Hz, 1H, 3'-H).

**RMN-<sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H}** en CDCl<sub>3</sub> δ(ppm): 27.25 (CH<sub>2</sub>CO), 30.46 (SCH<sub>2</sub>), 31.35 (SCH<sub>2</sub>), 31.45 (SCH<sub>2</sub>), 31.81 (SCH<sub>2</sub>), 34.23 (CH<sub>2</sub>CO), 47.93 (NCH<sub>2</sub>), 49.65 (NCH<sub>2</sub>), 70.57 (OCH<sub>2</sub>), 70.62 (OCH<sub>2</sub>), 73.74 (OCH<sub>2</sub>), 74.21 (OCH<sub>2</sub>), 128.07 (C4'), 132.01 (C3'), 133.40 (C5'), 143.93 (C2'), 171.35 (C=O), 192.01 (C=O).

**IR** (líquido, nujol): 1652, 1638, 1521, 1417, 1407, 1352, 1303, 1289, 1281, 1253, 1216, 1199, 1168, 1133, 1102, 1071, 1055, 1036, 995, 973, 911, 894, 853, 809, 775, 722, 658, 621, 581 562, 542, 505 cm<sup>-1</sup>.

**Espectro de masas:** Masa exacta 418.1179, calculada 418.1180.

3. 10-(2,2'-bitiofen-5-il)-1,4-dioxa-7,13-ditia-10-azaciclopentadecano (**4d**).



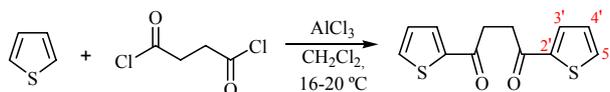
En un matraz de 2 bocas de 50 mL de capacidad equipado con condensador de reflujo y tubo de cloruro de calcio se disuelven 98 mg (0.24 mmol) de la 4-oxo-1-tiofen-2-il-4-(1,4-dioxa-7,13-ditia-10-azaciclopentadec-10-il)butan-1-ona (**4a**) y 116.4 mg (0.29 mmol) de Reactivo de Lawesson en 15 mL de tolueno seco, bajo atmósfera de nitrógeno. La temperatura se va aumentando de forma gradual, hasta alcanzar la de reflujo del tolueno. Pasada 1 hora se observa por TLC que no hay amida de partida, por lo que se detiene la reacción. El crudo se lleva a sequedad y se purifica usando una columna de sílice empaquetada con éter de petróleo y

usando como eluyente una mezcla éter etílico-éter de petróleo 50:50. Se obtienen 51 mg (52 %) del producto deseado.  $T_f = 88-89\text{ }^\circ\text{C}$ .

**RMN- $^1\text{H}$**  en  $\text{CDCl}_3$   $\delta(\text{ppm})$ : 2.75 (t  $J = 4.8$  Hz, 4H,  $\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 2.96 (t  $J = 7.8$  Hz, 4H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{S}$ ), 3.58 (t  $J = 7.8$  Hz, 4H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{S}$ ), 3.65 (s, 4H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.81 (t  $J = 4.8$  Hz, 4H,  $\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 5.72 (d  $J = 4.2$  Hz, 1H, 4-H), 6.81 (d  $J = 4.2$  Hz, 1H, 3-H), 6.88-6.91 (m, 2H, 3' y 4'-H), 6.99-7.01 (m, 1H, 5'-H).

**RMN- $^{13}\text{C}$  { $^1\text{H}$ }** en  $\text{CDCl}_3$   $\delta(\text{ppm})$ : 29.46 ( $\text{SCH}_2$ ), 31.36 ( $\text{SCH}_2$ ), 54.61 ( $\text{NCH}_2$ ), 70.65 ( $\text{OCH}_2$ ), 74.07 ( $\text{OCH}_2$ ), 102.29 ( $\text{C}_4$ ), 120.96 ( $\text{C}_4'$ ), 121.04 ( $\text{C}_5$ ), 122.00 ( $\text{C}_5'$ ), 123.70 ( $\text{C}_3$ ), 127.49 ( $\text{C}_3'$ ), 138.5 ( $\text{C}_2'$ ), 155.04 ( $\text{C}_2$ ).

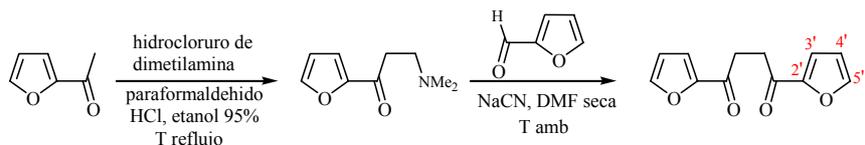
#### 4. Síntesis de 1,4-ditiofen-2-ilbutano-1,4-diona (**4g**).<sup>18</sup>



En un matraz de 2 bocas de 100 mL de capacidad acoplado a un condensador de reflujo con tubo de cloruro de calcio en la parte superior, se añaden 16 g (0.12 mol) de tricloruro de aluminio y 15 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  seco. Se agita durante 15 minutos manteniendo la temperatura entre 16 y 20 °C colocando el matraz sobre un baño de hielo cuando es necesario. Sobre la suspensión formada se añaden, mediante un embudo de adición, 9.61 mL (0.12 mol) de tiofeno y 5.51 mL (0.05 mol) de cloruro de succinilo disueltos en 10 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , gota a gota y agitando. Se agita la mezcla durante 3 h más, manteniendo la temperatura entre 16 y 20 °C. Cuando la evolución de HCl ha cesado se hidroliza la mezcla con 200 g de hielo y 5 mL de HCL. Después se continúa la agitación durante 30 minutos y se separa una fase orgánica verde oscura. La fase orgánica se lava sucesivamente con HCl 2M (2 x 100 mL), agua (2 x 100 mL) y  $\text{NaHCO}_3$  al 5% (3 x 100 mL) y se seca sobre sulfato de magnesio. La mezcla se lleva a sequedad en el rotavapor y al sólido se le adicionan 15 mL de etanol en frío. Se filtra el producto y se lava con éter. Se obtienen 6.99 g (47 %) de la dicetona pura.

**RMN- $^1\text{H}$**  en  $\text{CDCl}_3$   $\delta(\text{ppm})$ : 3.41 (s, 4H, 2 x  $\text{CH}_2\text{CO}$ ), 7.16 (dd  $J = 4.8$  y 3.9 Hz, 2H, 2 x 4'-H), 7.66 (dd  $J = 4.8$  y 1.2 Hz, 2H, 2 x 5'-H), 7.83 (dd  $J = 3.9$  y 1.2 Hz, 2H, 2 x 3'-H).

5. Síntesis de 1,4-difuran-2-ilbutano-1,4-diona (**4h**).<sup>17</sup>

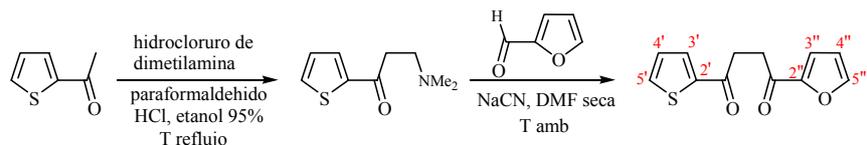


En un matraz de 250 mL de capacidad se añaden de 8.8 g (0.08 mol) de acetilfurano, 2.7 g (0.09 mol) de paraformaldehído, 7.35 g (0.09 mol) de hidrocloreuro de dimetilamina y 0.4 mL de ácido clorhídrico. La mezcla se disuelve en 20 mL de etanol al 95 % y se refluja a 78 °C durante 16 horas. Luego se deja enfriar y se filtra el precipitado obtenido, este se lava con acetona y se seca en la estufa a 45 °C. Se toman 2.3 g de este sólido y se disuelven en 10 mL de agua, se añade hidróxido de amonio al 5% hasta pH 10. La fase acuosa se lava con éter (2 x 50 mL) y se seca sobre sulfato de magnesio. Después de evaporar el éter se obtienen 1.76 g (10.5 mmol) de 3-dimetilamino-1-(2-furil)propanona pura.

En un matraz de 3 bocas de 100 mL, equipado con un septum y trampa de gases se suspenden 0.31 g (6.3 mmol) de cianuro de sodio en 4 mL de DMF seca. A esta suspensión se le añade 1 mL (12 mmol) de 2-furaldehído disuelto en 4 mL de DMF seca. Se agita la mezcla durante 15 minutos bajo atmósfera de N<sub>2</sub> y se adicionan 1.76 g (10.5 mmol) de 3-dimetilamino-1-(2-furil)propanona disueltos en 10 mL of DMF seca. La mezcla se continúa agitando durante toda la noche. Luego se adicionan 50 mL de agua y se extrae el precipitado que comienza a aparecer con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 25 mL). El disolvente se rotavapora parcialmente y se añade agua. El precipitado de color rojo formado se filtra y se lava con éter. Se obtienen 0.44 g (19%) de la dicetona pura. Por cromatografía de capa fina se observa que en la fase acuosa, de donde precipita el producto, aún queda una parte disuelta. Si se purifica esta fracción de la dicetona se obtendrá una mayor cantidad.

**RMN-<sup>1</sup>H** en CDCl<sub>3</sub> δ(ppm): 3.30 (s, 4H, 2 x CH<sub>2</sub>CO), 6.56 (dd J=3.6 y 1.8 Hz, 2H, 2 x 4'-H), 7.26 (dd J=3.6 y 0.6 Hz, 2H, 2 x 3'-H), 7.61 (dd J=1.8 y 0.6 Hz, 2H, 2 x 5'-H).

6. Síntesis de 1-furan-2-il-4-tiofen-2-ilbutano-1,4-diona (**4i**).<sup>17</sup>

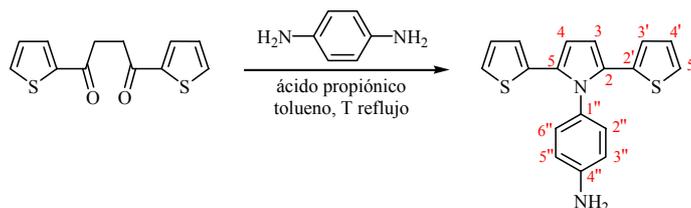


En un matraz de 250 mL de capacidad se añaden de 11.3 g (0.09 mol) de acetiltiofeno, 2.7 g (0.09 mol) de paraformaldehído, 7.35 g (0.09 mol) de hidrocloreuro de dimetilamina y 0.4 mL de ácido clorhídrico. La mezcla se disuelve en 20 mL de etanol al 95 % y se refluja a 78 °C durante 16 horas. Luego se deja enfriar y se filtra el precipitado obtenido, este se lava con acetona y se seca en la estufa a 45 °C. Se toman 4 g de este sólido y se disuelven en 20 mL de agua, se añade hidróxido de amonio al 5% hasta pH 10. La fase acuosa se lava con éter (2 x 50 mL) y se seca sobre sulfato de magnesio. Después de evaporar el éter se obtienen 2.7 g (14.7 mmol) en forma de aceite de la 3-dimetilamino-1-(2-tienil)propanona pura.

En un matraz de 3 bocas de 100 mL, equipado con un septum y trampa de gases se suspenden 0.45 g (9.2 mmol) de cianuro de sodio en 6 mL de DMF seca. A esta suspensión se le añade 1.5 mL (18.4 mmol) de 2-furaldehído disuelto en 6 mL de DMF seca. Se agita la mezcla durante 15 minutos bajo atmósfera de N<sub>2</sub> y se adicionan 2.7 g (14.7 mmol) de 3-dimetilamino-1-(2-tienil)propanona disueltos en 15 mL of DMF seca. La mezcla se continúa agitando durante toda la noche. Luego se adicionan 50 mL de agua y se extrae el precipitado que comienza a aparecer con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 25 mL). El disolvente se rotavapora parcialmente y se añade agua. No aparece ningún precipitado, por lo que se rotavavapro la mezcla nuevamente y se separa el producto en una columna cromatográfica, empaquetada con sílice y usando como eluyentes éter de petróleo y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Se obtienen 0.154 g (5 %) de la dicetona pura en una de las fracciones. (Otras fracciones contienen una mezcla de productos colaterales con la dicetona, pero aún no se han separado)

**RMN-<sup>1</sup>H** en CDCl<sub>3</sub> δ(ppm): 3.20-3.40 (m, 4H, 2 x CH<sub>2</sub>CO), 6.56 (dd J=3.6 y 1.8 Hz, 1H, 4''-H), 7.12-7.20 (m, 1H, 4'-H), 7.26 (dd J=3.3 y 0.9 Hz, 1H, 3''-H), 7.59-7.62 (m, 1H, 5''-H), 7.65 (dd J=5.1 y 1.2 Hz, 1H, 5'-H), 7.82 (dd J=3.6 y 1.2 Hz, 1H, 3'-H).

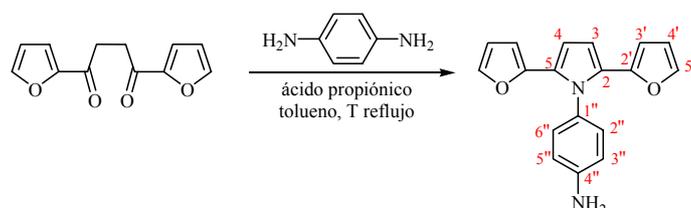
7. Síntesis de 4-(2,5-ditiofen-2-il-pirrol-1-il)-anilina (**4j**).<sup>20</sup>



En un matraz de dos bocas de 50 mL de capacidad se añaden 0.25 g (1 mmol) de 1,4-di-tiofen-2-il-butano-1,4-diona, 0.108 g (1 mmol) de 1,4-fenilendiamina, 0.1 mL (1.35 mmol) de ácido propiónico y 10 mL de tolueno. La mezcla se agita bajo atmósfera de nitrógeno. Se aumenta la temperatura hasta que comience a reflujar (~110 °C) y se deja en estas condiciones durante 24 h. Luego se retira de la fuente de calor y se espera a que alcance la temperatura ambiente. Se concentra en el rotavapor. La mezcla se disuelve en la mínima cantidad de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. La parte soluble se purifica en una columna cromatográfica empaquetada con sílice. Se eluye con éter de petróleo al que se le van adicionando cantidades crecientes de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. En las primeras fracciones se obtiene el producto deseado puro (0.097 g). Si se continúa eluyendo la columna se obtienen 0.13 g de la dicetona de partida que ha quedado sin reaccionar. El rendimiento de la reacción sería 63 %, si se le restan a la cantidad de dicetona utilizada inicialmente la recuperada en la columna.

**RMN-<sup>1</sup>H** en CDCl<sub>3</sub> δ(ppm): 3.9 (brs, 2H, NH<sub>2</sub>), 6.53 (s, 2H, 3- y 4-H), 6.64 (dd J= 0.9 y 3.9 Hz, 2H, 2 x 3'-H), 6.72 (d J= 7.2 Hz, 2H, 2''- y 6''-H), 6.84 (dd J= 3.9 y 5.1 Hz, 2H, 2 x 4'-H), 7.05 (dd J= 0.9 y 5.1 Hz, 2H, 2 x 5'-H), 7.10 (d J= 7.2 Hz, 2H, 3''- y 5''-H).

8. Síntesis de 4-(2,5-difuran-2-il-pirrol-1-il)-anilina (**4k**).



En un matraz de dos bocas de 50 mL de capacidad se añaden 0.218 g (1 mmol) de 1,4-di-furan-2-il-butano-1,4-diona, 0.108 g (1 mmol) de 1,4-fenilendiamina, 0.1 mL (1.35 mmol) de ácido propiónico y 10 mL de tolueno. La mezcla se agita bajo

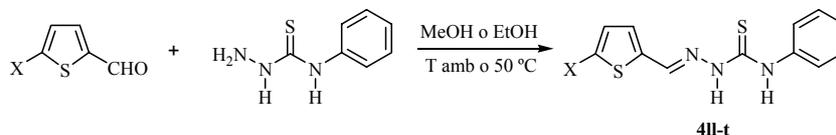
atmósfera de nitrógeno. Se aumenta la temperatura hasta que comience a reflujar (~110 °C) y se deja en estas condiciones durante 24 h. Luego se retira de la fuente de calor y se espera a que alcance la temperatura ambiente. Se concentra en el rotavapor. La mezcla se disuelve en la mínima cantidad de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. La parte soluble se purifica en una columna cromatográfica empaquetada con sílice. Se eluye con éter de petróleo al que se le van adicionando cantidades crecientes de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. En las primeras fracciones se obtiene el producto deseado puro (0.091 g). Si se continúa eluyendo la columna se obtienen 0.11 g de la dicetona de partida que ha quedado sin reaccionar. El rendimiento de la reacción sería 68 %, si se le restan a la cantidad de dicetona utilizada inicialmente la recuperada en la columna. T<sub>f</sub>= 144 °C (con descomposición).

**RMN-<sup>1</sup>H** en CDCl<sub>3</sub> δ(ppm): 5.29 (dd J= 0.6 y 3.3 Hz, 2H, 2 x 3'-H), 6.19 (dd J= 1.8 y 3.3 Hz, 2H, 2 x 4'-H), 6.65 (s, 2H, 3- y 4-H), 6.78 (d J= 8.7 Hz, 2H, 2''- y 6''-H), 7.14 (d J= 8.7 Hz, 2H, 3''- y 5''-H), 7.29 (dd J= 0.6 y 1.8 Hz, 2H, 2 x 5'-H).

**RMN-<sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H}** en CDCl<sub>3</sub> δ(ppm): 103.99 (2 x C3'), 107.82 (C3 y C4), 110.84 (2 x C4'), 115.36 (C1''), 115.38 (C2'' y C6''), 128.03 (C2 y C5), 129.82 (C3'' y C5''), 140.46 (2 x C5'), 147.10 (C4''), 147.63 (C2').

**IR** (líquido, nujol): 3376 (NH), 1620, 1517, 1459, 1411, 1389, 1289, 1212, 1123, 1079, 1043, 1018, 973, 887, 834, 771, 732 cm<sup>-1</sup>.

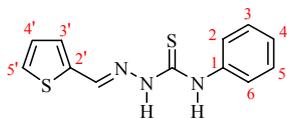
#### 9. Método general de síntesis de las feniltiosemicarbazonas (**4II-t**).



Se pesan cantidades equimolares de la 4-fenil-3-tiosemicarbazida y del formil-heterociclo y se disuelven en la mínima cantidad de metanol o etanol, según en que disolvente presenten una mayor solubilidad. En caso necesario se calienta hasta 50 °C para lograr la disolución total del aldehído. La mezcla se agita a temperatura ambiente durante toda la noche y luego se deja en reposo hasta la aparición de un precipitado. Se filtra la mezcla y se lava el sólido con etanol (3 x 15 mL). En muchos casos se obtiene el producto puro y en otros es necesaria la posterior recrystalización de etanol o de mezclas etanol-agua. Los rendimientos, puntos de fusión y colores de los productos obtenidos se presentan en la tabla 4.3.

### Características espectroscópicas de las feniltiosemicarbazonas obtenidas.

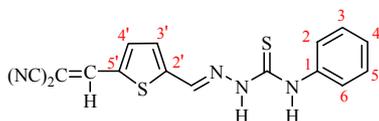
#### 4II- tiofeno-2'-carbaldehído *N*-feniltiosemicarbazona.<sup>26</sup>



**RMN-<sup>1</sup>H** en CDCl<sub>3</sub> δ(ppm): 7.07-7.10 (m, 1H, 4'-H), 7.25-7.29 (m, 1H, 4-H), 7.32 (dd J=3.9 y 0.9 Hz, 1H, 3'-H), 7.39-7.48 (m, 3H, 3- y 5-H y 5'-H), 7.66 (brd J=9 Hz, 2H, 2- y 6-H), 8.11 (s, 1H, -CH=N), 9.11 (s, 1H, NH), 10.29 (s, 1H, NH).

**IR** (líquido, nujol): 3297, 3141, 1588, 1547, 1521, 1505, 1445, 1386, 1311, 1268, 1220, 1204, 1068, 1041, 922, 855, 817, 784, 763, 726, 742, 712, 701, 687, 622, 541 cm<sup>-1</sup>.

#### 4m- 5'-(2,2-dicianovinil)tiofeno-2'-carbaldehído *N*-feniltiosemicarbazona.

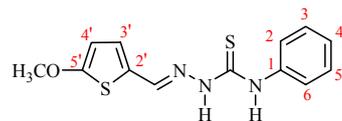


**RMN-<sup>1</sup>H** en CDCl<sub>3</sub> δ(ppm): 7.22-7.28 (brt J=7.2 Hz, 1H, 4-H), 7.52 (brd J=7.8 Hz, 2H, 3- y 5-H), 7.52 (brd J=7.2 Hz, 2H, 2- y 6-H), 7.82 (brs, 1H, 4'-H), 7.87 (brs, 1H, 3'-H), 7.96 (s, 1H, -CH=N), 8.02 (s, 1H, -CH=C(CN)<sub>2</sub>), 9.08 (s, 1H, NH), 9.6 (s, 1H, NH).

**RMN-<sup>1</sup>H** en DMSO δ(ppm): 7.22-7.28 (brt J=7.2 Hz, 1H, 4-H), 7.52 (brd J=7.8 Hz, 2H, 3- y 5-H), 7.52 (brd J=7.2 Hz, 2H, 2- y 6-H), 7.79 (d J=3.9 Hz, 1H, 4'-H), 7.90 (d J=3.9 Hz, 1H, 3'-H), 8.35 (s, 1H, -CH=N), 8.65 (s, 1H, -CH=C(CN)<sub>2</sub>), 10.1 (s, 1H, NH), 12.1 (s, 1H, NH).

<sup>26</sup> P. Mapathy, A. P. Budhkar, C. S. Dorai, *Indian Journal of Chemistry*, 63, **1986**, 714 y referencias citadas.

**4n-** 5'-metoxitiofeno-2'-carbaldehído *N*-feniltiosemicarbazona.

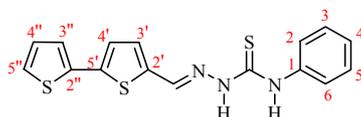


**RMN-<sup>1</sup>H** en CDCl<sub>3</sub> δ(ppm): 3.95 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 6.18 (d J=3.9 Hz, 1H, 4'-H), 7.00 (d J=3.9 Hz, 1H, 3'-H), 7.23-7.29 (m, 1H, 4-H), 7.41 (brt J=7.2 Hz, 2H, 3- y 5-H), 7.65 (brd J=8.4 Hz, 2H, 2- y 6-H), 7.95 (s, 1H, -CH=N), 9.02 (s, 1H, NH), 10.03 (s, 1H, NH).

**RMN-<sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H}** en CDCl<sub>3</sub> δ(ppm): 60.29 (OCH<sub>3</sub>), 104.82, 124.47, 125.17, 125.40, 128.10, 131.02, 139.03, 139.20, 168.62, 175.03 (C=S).

**IR** (líquido, nujol): 3335, 3137, 1588, 1556, 1536, 1511, 1487, 1446, 1416, 1390, 1345, 1314, 1274, 1206, 1076, 1046, 980, 923, 771, 764, 740, 700, 505 cm<sup>-1</sup>.

**4ñ-** 2,2'-bitiofeno-5-carbaldehído *N*-feniltiosemicarbazona.



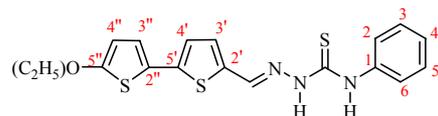
**Análisis elemental** (C, H, N) encontrado → C: 55.99 %; H: 3.87 %; N: 12.33 %; S: 27.66. Calculado para C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>S<sub>3</sub>: C: 55.95 %; H: 3.81 %; N: 12.23 %; S: 28.01.

**RMN-<sup>1</sup>H** en CDCl<sub>3</sub> δ(ppm): 7.03-7.08 (m, 1H, 4''-H), 7.14 (d J=3.9 Hz, 1H, 3'-H), 7.21 (d J=3.9 Hz, 1H, 4'-H), 7.25-7.32 (m, 3H, 4-H y 3''- y 5''-H), 7.44 (brt J=7.5 Hz, 2H, 3- y 5-H), 7.68 (brd J=7.8 Hz, 2H, 2- y 6-H), 8.06 (s, 1H, -CH=N), 9.10 (s, 1H, NH), 10.2 (s, 1H, NH).

**RMN-<sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H}** en CDCl<sub>3</sub> δ(ppm): 124.00, 124.66, 124.85, 125.74, 126.33, 128.12, 128.82, 132.18, 136.17, 136.62, 137.20, 137.74, 140.72, 175.25 (C=S).

**IR** (líquido, nujol): 3322, 1588, 1546, 1515, 1468, 1459, 1377, 1268, 1201, 1074, 1055, 925, 842, 792, 764, 742, 716, 702, 688, 612 cm<sup>-1</sup>.

**4o** - 5'-metoxi-2,2'-bitiofeno-5-carbaldehído *N*-feniltiosemicarbazona.

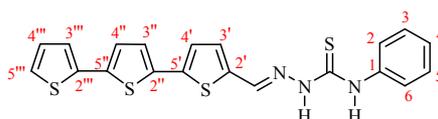


**RMN-<sup>1</sup>H** en CDCl<sub>3</sub> δ(ppm): 1.44 (t J=7.2 Hz, 3H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4.14 (q J=7.2 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 6.15 (d J=3.9 Hz, 1H, 4''-H), 6.91 (d J=3.9 Hz, 1H, 3''-H), 6.93 (d J=3.9 Hz, 1H, 3'-H), 7.15 (d J=3.9 Hz, 1H, 4'-H), 7.25-7.32 (m, 1H, 4-H), 7.43 (brt J=7.5 Hz, 2H, 3- y 5-H), 7.67 (brd J=7.5 Hz, 2H, 2- y 6-H), 8.07 (s, 1H, -CH=N), 9.09 (s, 1H, NH), 10.5 (s, 1H, NH).

**RMN-<sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H}** en CDCl<sub>3</sub> δ(ppm): 14.64 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 69.58 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 105.69 (C4''), 122.17 (C3''), 122.90 (C3'), 122.91 (C2'), 124.72 (C2 y C6), 126.25 (C4), 128.78 (C3 y C5), 132.36 (C4'), 134.79 (C5'), 137.60 (CH=N), 137.75 (C1), 141.68 (C2''), 165.72 (C5''), 174.96 (C=S).

**IR** (líquido, nujol): 3329, 3127, 1588, 1550, 1509, 1483, 1465, 1384, 1322, 1274, 1245, 1206, 1079, 1039, 912, 873, 779, 764, 743, 729, 703, 692, 614 cm<sup>-1</sup>.

**4p** - 5'-(2''-tiofenil)-2,2'-bitiofeno-5-carbaldehído *N*-feniltiosemicarbazona.



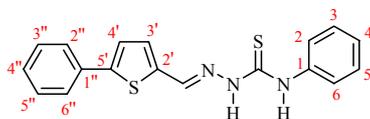
**RMN-<sup>1</sup>H** en CDCl<sub>3</sub> δ(ppm): 7.05-7.18 (m, 8H, 4-H y tiof-H), 7.21 (t, 2H, 3- y 5-H), 7.70 (d, 2H, 2- y 6-H), 7.97 (s, 1H, -CH=N), 9.09 (s, 1H, NH), 9.35 (s, 1H, NH).

**RMN-<sup>1</sup>H** en DMSO δ(ppm): 7.09-7.12 (m, 1H, 4'''-H), 7.19 (brt J=7.2 Hz, 1H, 4-H), 7.29 (2 J=3.9 Hz, 1H, 4''-H), 7.32-7.40 (m, 5H, 3- y 5-H y tiof-H), 7.52-7.60 (m, 3H, 2- y 6-H y 4'-H), 8.30 (s, 1H, -CH=N), 9.84 (s, 1H, NH), 11.88 (s, 1H, NH).

**RMN-<sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H}** en DMSO δ(ppm): 124.59, 124.66, 125.19, 125.32, 125.57, 125.92, 126.07, 128.13, 128.56, 132.34, 134.82, 135.79, 136.34, 137.44, 137.58, 138.33, 139.00, 175.47 (C=S).

**IR** (líquido, nujol): 3310, 1742, 1586, 1546, 1463, 1456, 1377, 1307, 1270, 1202, 1169, 1156, 1076, 1059, 967, 922, 892, 783, 722, 703, 514  $\text{cm}^{-1}$ .

**4q**- 5'-feniltiofeno-2'-carbaldehído *N*-feniltiosemicarbazona.<sup>27</sup>

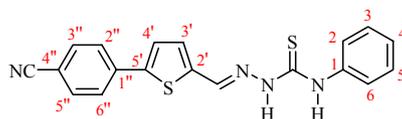


**RMN-<sup>1</sup>H** en  $\text{CDCl}_3$   $\delta$ (ppm): 7.27-7.46 (m, 8H, Ar-H y tiof-H), 7.63-7.71 (m, 4H, Ar-H), 8.04 (s, 1H, -CH=N), 9.13 (s, 1H, NH), 9.79 (s, 1H, NH).

**RMN-<sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H}** en  $\text{CDCl}_3$   $\delta$ (ppm): 123.56, 124.26, 125.85, 125.96, 128.40, 128.65, 128.98, 132.06, 133.41, 136.90, 137.13, 147.48, 175.38.

**IR** (líquido, nujol): 3435 1623, 1589, 1547, 1509, 1493, 1444, 1268, 1210, 924, 796, 755, 730, 707, 688  $\text{cm}^{-1}$ .

**4r**- 5'-(4-cianofenil)tiofeno-2'-carbaldehído *N*-feniltiosemicarbazona.



**RMN-<sup>1</sup>H** en  $\text{CDCl}_3$   $\delta$ (ppm): 7.27-7.33 (m, 3H, 3-, 5- y 4-H), 7.39-7.47 (m, 3H, 2- y 6-H y 4'-H) 7.67-7.75 (m, 5H, 3'-H y 2'', 3'', 5''- y 6''-H), 8.06 (s, 1H, -CH=N), 9.11 (s, 1H, NH), 9.91 (s, 1H, NH).

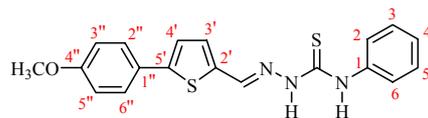
**RMN-<sup>1</sup>H** en DMSO  $\delta$ (ppm): 7.20 (brt J=8.4 Hz, 1H, 4-H), 7.36 (brt J=7.5 Hz, 2H, 3- y 5-H), 7.56-7.69 (m, 3H, 2- y 6-H y 4'-H), 7.74 (d J=3.9 Hz, 1H, 3'-H), 7.87 (s, 4H, 2'', 3'', 5''- y 6''-H), 8.32 (s, 1H, -CH=N), 9.86 (s, 1H, NH), 11.94 (s, 1H, NH).

**RMN-<sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H}** en DMSO  $\delta$ (ppm): 110.16, 118.72, 125.36, 125.46, 125.99, 126.93, 128.17, 132.32, 133.18, 137.36, 137.54, 138.93, 139.99, 143.20, 175.59 (C=S).

**IR** (líquido, nujol): 3291, 3129, 2220 (CN), 1599, 1551, 1517, 1496, 1461, 1377, 1266, 1206, 1175, 926, 943, 799, 767, 746  $\text{cm}^{-1}$ .

<sup>27</sup> V. S. Misra, A. Khare, *Journal fuer Praktische Chemie (Leipzig)*, 312, **1970**, 1188.

**4s-** 5'-{(4-metoxifenil)tiofeno-2'-carbaldehído *N*-feniltiosemicarbazona.



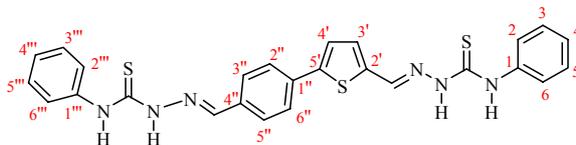
**Análisis elemental** (C, H, N) encontrado → C: 62.10 %; H: 4.66 %; N: 11.43 %; S: 17.45. Calculado para C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>S<sub>3</sub>: C: 61.19 %; H: 4.68 %; N: 11.35 %; S: 17.48.

**RMN-<sup>1</sup>H** en CDCl<sub>3</sub> δ(ppm): 3.86 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 6.94 (d J=8.7 Hz, 2H, 3'' y 5''-H), 7.17 (d J=3.9 Hz, 1H, 3'-H), 7.25 (d J=3.9 Hz, 1H, 4'-H), 7.26-7.32 (m, 1H, 4-H), 7.44 (brt J=7.8 Hz, 2H, 3- y 5-H), 7.57 (d J=8.7 Hz, 2H, 2''- y 6''-H), 7.69 (d J=7.8 Hz, 2H, 2- y 6-H), 8.08 (s, 1H, -CH=N), 9.13 (s, 1H, NH), 10.14 (s, 1H, NH).

**RMN-<sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H}** en CDCl<sub>3</sub> δ(ppm): 55.39 (OCH<sub>3</sub>), 114.46, 122.57, 124.59, 126.24, 126.30, 127.31, 128.81, 132.57, 135.71, 137.59, 137.81, 147.88, 159.99, 175.17 (C=S).

**IR** (líquido, nujol): 3335, 3182, 1589, 1549, 1515, 1502, 1275, 1256, 1205, 1179, 1057, 1023, 833, 792, 747, 707, 692 cm<sup>-1</sup>.

**4t-** 4-(5'-{(*E*)-[(fenilcarbamotioil)hidrazono]fenil}tiofeno-2'-il)benzonitrilo.



**RMN-<sup>1</sup>H** en DMSO δ(ppm): 7.16-7.24 (m, 2H, Ar-H), 7.30-7.42 (m, 4H, Ar-H), 7.52-7.60 (m, 5H, Ar-H y 3'-H), 7.66 (d J=3.9 Hz, 1H, 4'-H), 7.75 (d J=8.7 Hz, 2H, 2''- y 6''-H), 7.96 (d J=8.7 Hz, 2H, 3''- y 5''-H), 8.15 (s, 1H, -CH=N), 8.32 (s, 1H, -CH=N), 9.84 (s, 1H, NH), 10.2 (s, 1H, NH), 11.87 (s, 1H, NH), 11.90 (s, 1H, NH).

**RMN-<sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H}** en DMSO δ(ppm): 125.32, 125.41, 125.47, 125.57, 126.03, 128.08, 128.12, 128.45, 132.46, 133.84, 134.48, 137.73, 138.20, 138.84, 138.97, 139.07, 142.09, 145.00, 175.52 (C=S), 176.01 (C=S).

**IR** (líquido, nujol): 3316, 3144, 1661, 1595, 1551, 1500, 1445, 1378, 1268, 1197, 1073, 1028, 1004, 939, 920, 898, 866, 825, 793, 746, 723, 703, 691, 661, 614 cm<sup>-1</sup>.



## CONCLUSIONES

Como conclusiones mas destacadas del trabajo llevado a cabo durante el período de esta Tesis Doctoral se pueden citar:

1.- Aplicación de polímeros orgánicos conteniendo diversos derivados del pirilio en la determinación selectiva de los aniones cianuro y carbonato en agua. En estas determinaciones se ha demostrado que es de crucial importancia la elección del pH en el que se lleva a cabo la determinación ya que puede dictarnos la selectividad del material polimérico en cuestión. Así un mismo polímero puede responder a cianuro si las determinaciones se realizan a pH 11.0 y a hidrógeno carbonato si las determinaciones se realizan a pH neutro. El mecanismo de respuesta esta basado en la reactividad del anillo de pirilio frente a nucleófilos y consiste en un cambio de color que sufre el material polimérico al pasar de color amarillo (anillo de pirilio) a color rojo (forma dicetónica). Los dos sistemas sensores funcionan en agua lo que puede ser interesante de cara a una posible aplicación en muestras reales en un futuro. Aunque los límites de detección no son muy altos se espera en un futuro una reducción de los mismos. El polímero **2i** resultó ser el más selectivo a cianuro. Este mismo polímero, **2i** y **2j** son los que muestran mayor selectividad a carbonato.

2.- Se ha obtenido una respuesta selectiva hacia ciertas aminas biogénicas empleando reactivos conteniendo anillos de pirilio. Los receptores **2v** y **2w** son los que muestran mayor selectividad. El mecanismo de la respuesta es, de nuevo, un cambio de color de azul a amarillo relacionado con el ataque de las aminas biogénicas sobre el anillo de pirilio, así los receptores conteniendo el anillo de pirilio son azules y al reaccionar con las aminas se transforman en las correspondientes sales de piridinio que son amarillas. Estos receptores únicamente dan cambio de color en presencia de las aminas biogénicas y no de los aminoácidos que son sus precursores.

Se ha intentado emplear estos receptores en la detección de aminas biogénicas en alimentos de cara a una posible aplicación en el campo de la tecnología de alimentos. Los resultados preliminares son esperanzadores y parecen indicar que si se podrían aplicar estos sistemas en muestras reales.

3.- Se ha estudiado el comportamiento de derivados macrocíclicos funcionalizados con 2,4,6-trifenilpiridina como receptores de cationes. Los ligandos sintetizados forman complejos coloreados con algunos cationes metálicos ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,

### Conclusiones.

$\text{Pb}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$ ), de manera poco selectiva. La formación de estos complejos provoca un cambio de color de las disoluciones, producto de la coordinación por la unidad aceptora de la molécula (el anillo piridínico). En el caso del ligando **3b** con  $\text{Hg}^{2+}$  el complejo formado es incoloro, pues el macrociclo que contiene átomos de azufre forma complejos estables con este catión. En este caso el complejo formado no provoca desplazamientos batocrómicos de la banda de absorción porque se forma con la unidad dadora de la molécula (nitrógeno anilínico).

Los complejos formados ligando-catión metálico se utilizaron para la detección de aniones. Se observó que se puede llegar a obtener patrones de reconocimiento selectivo para algunos aniones como acetato y cianuro.

4.- Se sintetizaron 12 receptores heterocíclicos, 9 de ellos nuevos. Se realizó la caracterización químico-física de los compuestos sintetizados. Los compuestos sintetizados pertenecen a 3 grupos

- Bitiofenos sustituidos con macrociclos que contienen heteroátomos (N, S y O). La síntesis de estos derivados aún se encuentra en estudio.
- Triheterociclos que contienen un anillo de pirrol central *N*-sustituido con el *p*-aminobenceno
- Feniltiosemicarbazonas de 2'-tiofenos. Los anillos de tiofenos se sustituyen, en posición 5', con diferentes grupos con propiedades dador/aceptoras para estudiar el efecto de estos en el reconocimiento molecular.

## CONCLUSIONS

The most important conclusions of the present work are:

1.- The organic polymers containing pyryliums derivatives are good candidates to be used in the selective determination of cyanide and carbonate anions in water. The pH of the medium in these reactions is decisive for the selectivity showed by the polymeric material. The color of the same polymer can change with cyanide at pH 11 and with carbonate at neutral pH. The mechanism of response is based in the reactivity of the pyrylium ring towards nucleophilic species. The polymeric film's color change from yellow (pyrylium ring) to red (diketonc form) when react with a nucleophile. The recognition is carry out in water, which is the reason it can be used in real samples in the future. Detection limits is expected to decrease with the development of new materials. **2i** is the most selective polymer toward cyanide. **2i** and **2j** are also the best polymers in recognition of carbonate.

2.- A selective response towards biogenic amines using dosimeters containing pyrylium ring is obtained. The receptors **2v** and **2w** show the best selectivity. The mechanism of response is also a color change from blue to yellow produced by the attack of the biogenic amines to the pyrylium ring. In this reaction a pyridinium salt is formed. These receptors do not change in the presence of the aminoacids precursors of aforementioned biogenic amines.

The receptors are employed in the determination of biogenic amines in food. Preliminary results indicate that this systems can be used with real samples in the food technology area with good results.

3.- The behavior of macrocycle derivatives functionalized with 2,4,6-triphenilpyrydine is studied in cation recongnition. The synthesized ligands form colored complexes with some metal cations ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  and  $\text{Fe}^{3+}$ ), in a non-selective way. The formation of these complexes produced a color change in receptor solutions. The coordination takes place through the pyridinic ring (acceptor unit of the molecule). The ligand **3b** form with  $\text{Hg}^{2+}$  an uncolored complex. The macrocycle containing sulfur atoms is selective to  $\text{Hg}^{2+}$  cation and form an stable complex. The formation of this complex does not produce a bathochromic shift in the absortion band of the receptor, since the coordination involves the nitrogen of the aniline moiety (donor unit of the molecule).

*Conclusiones.*

These receptor-metal cations complexes were further employed for differential anion sensing. Differential recognition patterns were obtained for anions as acetate and cyanide.

4.- 12 heterocyclic receptors have been synthesized, 9 of them are new compounds. The characterization of the compounds was performance. The synthesized compounds belong to 3 groups:

- Bithiophenes substituted with macrocyclic rings containing heteroatoms (N, S and O). The synthesis of these derivatives is still under studies.
- The second one is a family of triheterocycles containing a *N*-substituted pyrrol with *p*-aminobencene.
- The last one is a group of *N*-phenylthiosemicarbazones of 2'-thiophenes functionalized at the 5' position with donor/acceptor moieties for the study of the effect of these groups in molecular recognition.

## ANEXOS

**Anexo I. Nomenclatura de los compuestos químicos sintetizados.**

- 2v-** Tetrafluoroborato de 2,6-difenil-4-[2-(4-*N,N*-dimetilfenil)vinil]pirilio.
- 2w-** Tetrafluoroborato de 2,6-difenil-4-{2-[4-(1,4,7,10-tetraoxa-13-azaciclopentadecan-13-il)-fenil]vinil}pirilio.
- 2x-** Tetrafluoroborato de 2,6-ditiofenil-4-{2-[4-(1,4,7,10-tetraoxa-13-azaciclopentadecan-13-il)-fenil]vinil}pirilio.
- 2y-** Tetrafluoroborato de 2,6-ditiofenil-4-[2-(4-*N,N*-dimetilfenil)vinil]pirilio.
- 2z-** Tetrafluoroborato de 2,6-difenil-4-[2-(4-*N,N*-dimetilfenil)vinil]pirilio.
- 3a-** [4-(2,6-difenilpiridin-4-il)-fenil]-dimetilamina.
- 3b-** 10-[4-(2,6-difenilpiridin-4-il)-fenil]-10-aza-1,4-dioxa-7,13-ditia-ciclopentadecano.
- 3c-** 10-[4-(2,6-difenilpiridin-4-il)-fenil]-10-aza-1,4,7-trioxa-ciclododecano.
- 4a-** 4-oxo-1-tiofen-2-il-4-(1,4-dioxa-7,13-ditia-10-azaciclopentadec-10-il)butan-1-ona.
- 4b-** 4-oxo-1-tiofen-2-il-4-(1,4,7,10-tetraoxa-13-aza-ciclopentadec-13-il)butan-1-ona.
- 4c-** 4-oxo-1-tiofen-2-il-4-(1,4,7,10,13-pentaoxa-16-aza-ciclooctadec-16-il)butan-1-ona.
- 4d-** 10-(2,2'-bitiofen-5-il)-1,4-dioxa-7,13-ditia-10-azaciclopentadecano.
- 4e-** 13-(2,2'-bitiofen-5-il)-1,4,7,10-tetraoxa-13-aza-ciclopentadecano.
- 4f-** 16-(2,2'-bitiofen-5-il)-1,4,7,10,13-pentaoxa-16-aza-ciclooctadecano.
- 4g-** 1,4-ditiofen-2-ilbutano-1,4-diona (4g).
- 4h-** 1,4-difuran-2-ilbutano-1,4-diona (4h).
- 4i-** 1-furan-2-il-4-tiofen-2-ilbutano-1,4-diona (4i).
- 4j-** 4-(2,5-ditiofen-2-il-pirrol-1-il)-anilina (4j).
- 4k-** 4-(2,5-difuran-2-il-pirrol-1-il)-anilina (4k).
- 4l-** 4-(2-furan-2-il-5-tiofen-2-il-pirrol-1-il)-anilina (4l).
- 4ll-** tiofeno-2-carbaldehído *N*-feniltiosemicarbazona.
- 4m-** 5-(2,2-dicianovinil)tiofeno-2-carbaldehído *N*-feniltiosemicarbazona.
- 4n-** 5-metoxitiofeno-2-carbaldehído *N*-feniltiosemicarbazona.
- 4ñ-** 2,2'-bitiofeno-5-carbaldehído *N*-feniltiosemicarbazona.
- 4o-** 5'-metoxi-2,2'-bitiofeno-5-carbaldehído *N*-feniltiosemicarbazona.

*Anexos.*

**4p** - 5'-(2"-tiofenil)-2,2'-bitiofeno-5-carbaldehído *N*-feniltiosemicarbazona.

**4q**- 5-feniltiofeno-2-carbaldehído *N*-feniltiosemicarbazona.

**4r**- 5-(4-cianofenil)tiofeno-2-carbaldehído *N*-feniltiosemicarbazona.

**4s**- 5-(4-metoxifenil)tiofeno-2-carbaldehído *N*-feniltiosemicarbazona.

**4t**- 4-(5-{(E)-[(fenilcarbamoil)hidrazono]fenil})tiofen-2-il)benzoniitrilo.

## **Anexo II. Disolventes y equipos.**

### **Espectroscopia de RMN, Masas, IR y análisis elemental.**

Los espectros de RMN fueron medidos con un espectrómetro Varian Gemini 300, operando a 300 MHz. Los desplazamientos químicos de los espectros de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  fueron asignados tomando como referencia los disolventes deuterados.

Los análisis elementales (C, H, N, S) fueron realizados en el Departamento de Química de la Universidad do Minho, Portugal, con un equipo Fisons EA 1108 CHNS.

Los espectros de masas fueron realizados en el Servicio Central de Soporte a la Investigación Experimental (S.C.S.I.E.) de la Universidad de Valencia con un equipo VG AUTOSFT.

Los espectros IR fueron registrados con un espectrofotómetro Perkin Elmer 1600 FTIR.

### **Medidas de fluorescencia y UV-visible.**

Las medidas de fluorescencia fueron realizadas con un fluorímetro FS900CDT Steady State T-Geometry de Edinburgh Analytical Instruments.

Las medidas de UV-visible fueron realizadas con un espectrofotómetro UV-visible Shimadzu UV-160 A y con un espectrofotómetro HP Diode Array Spectrophotometer 8452 A.

El espectrocolorímetro utilizado fue MINOLTA "CM 3600d", con iluminante D65, observador  $10^\circ$  y tamaño de lámina pequeña (SAV).

### **Medidas electroquímicas.**

Las medidas electroquímicas se obtuvieron con un generador programable de funciones Tacusel IMT-1 conectado a un potencióstato Tacusel PJT 120-1 y un electrodo de platino o de grafito como electrodo de trabajo. Las medidas se tomaron frente a un electrodo de referencia de calomelanos saturado, en una celda estándar con un hilo de platino como electrodo auxiliar. Como electrolito de fondo se utilizó el  $[\text{Bu}_4\text{N}][\text{ClO}_4]$ .

**Disolventes utilizados.**

Diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), grado analítico, SCHARLAU.

Tolueno, 99%, SCHARLAU.

Dietiléter, 99% MERCK.

Tetrahidrofurano (THF), 99% MERCK.

Dimetilsulfóxido (DMSO), 99% ALDRICH.

Acetat de etilo (AcOEt), grado analítico, SCHARLAU.

Acetona, grado analítico, SCHARLAU.

Acetonitrilo (ACN), 99.9% SCHARLAU.

Etanol (EtOH), 96%, SCHARLAU.

Etanol (EtOH), 99.8%, SCHARLAU.

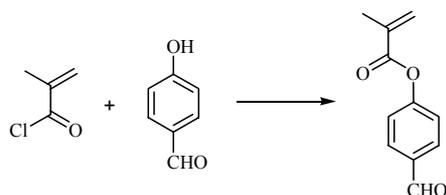
Cloroformo (CHCl<sub>3</sub>), 99.8% SCHARLAU.

Dimetilformamida (DMF), 99% ALDRICH.

*n*-Hexano, grado analítico, SCHARLAU.

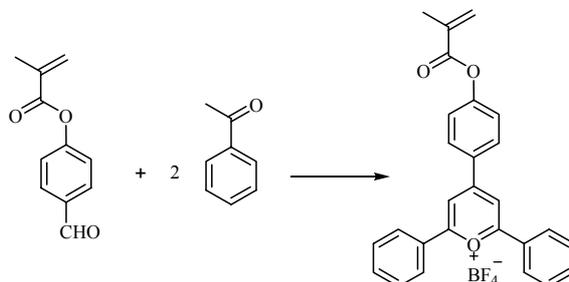
### Anexo III. Síntesis de los polímeros con sales de pirilio.

#### Síntesis del metacrilato de 4-formilfenilo.



A una disolución de 5 g (0,04 mol) de 4-hidroxibenzaldehído en 50 mL de diclorometano se añaden 7 mL (0,05 mol) de trietilamina y se enfría a 0 °C. Posteriormente se añaden lentamente 4,9 mL (0,05 mol) de cloruro de metacrilato disueltos en 15 mL de diclorometano. Se mantiene la agitación y se deja que la reacción prosiga durante 24 horas a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo se filtra el cloruro de trietil amonio formado y la disolución se extrae primero con una disolución diluida de hidróxido sódico y después con ácido clorhídrico diluido. La fase orgánica se lava varias veces con agua, se seca con sulfato sódico anhidro y se filtra. A continuación se decolora añadiendo carbón activo y manteniéndolo a reflujo durante 1 hora. Se filtra y se elimina el disolvente. Y el producto se emplea en el siguiente paso sin purificación previa. Rendimiento: 6.65 g (87,4%).

#### Síntesis del tetrafluoroborato de 2,6-fenilo-4-(p-metacrililoixi)fenil pirilio.



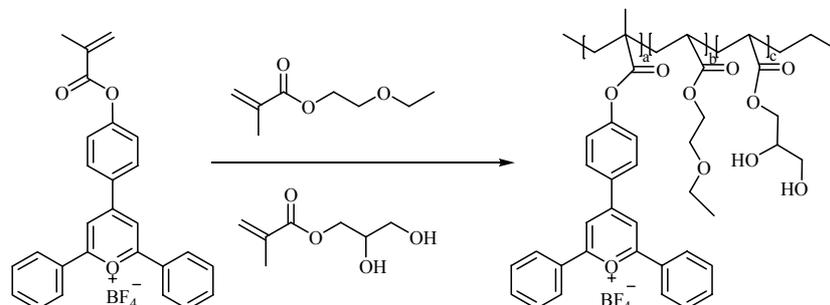
Sobre una disolución de 8,25 g (0,069 mol) de acetofenona y 3 g (0,027 mol) de metacrilato de 4-formilfenilo en 25 mL de 1,2-dicloroetano se añaden gota a gota 7,2 mL (0.069 mol) de trifluoruro de boro dietil eterato. Se mantiene la agitación a una temperatura de 65 °C durante 6 horas. Transcurrido ese tiempo la disolución oscura se precipita sobre 150 mL de éter etílico, y el precipitado amarillo se filtra

*Anexos.*

obteniéndose un sólido amarillo pulverulento que se purifica por cristalización en ácido acético, dando lugar a cristales amarillos en forma de agujas.

Rendimiento: 3,17 g (24%). P. f.: 150-152 °C (d).

*Síntesis de la membrana polimérica 2i.*



Se disuelven 1.100 mg (9,47 mmol) de acrilato de 2-hidroxietilo, 91 mg (0,189 mmol) de comonómero metacrílico que contiene el grupo pirilio, 23 mg (0,1 mmol) de dimetacrilato de etilenglicol y 11 mg de AIBN, en una pequeña cantidad de dimetilformamida (1 mL aproximadamente). A continuación se vierte esta disolución en un molde de polietileno de 245 µm de espesor colocado sobre una superficie de vidrio silanizada. El sistema se mantiene a una temperatura de 70 °C durante un día para que tenga lugar la polimerización y transcurrido ese tiempo la membrana se retira del molde. Después de sucesivos lavados en agua y acetona, la membrana amarilla se seca al aire durante tres días.

**Anexo IV. Publicación. “Sensory hybrid host materials for the selective chromo-fluorogenic detection of biogenic amines”.**

Beatriz García-Acosta,<sup>a</sup> María Comes,<sup>a</sup> Julia L. Bricks,<sup>\*b</sup> Margarita A. Kudinova,<sup>b</sup> Vladimir V. Kurdyukov,<sup>b</sup> Alexei I. Tolmachev,<sup>b</sup> Ana B. Descalzo,<sup>a,c</sup> M. Dolores Marcos,<sup>a</sup> Ramón Martínez-Mañez,<sup>\*a</sup> Ana Moreno,<sup>a</sup> Félix Sancenón,<sup>a</sup> Juan Soto,<sup>a</sup> Luis A. Villaescusa,<sup>a</sup> Knut Rurack,<sup>\*c</sup> José M. Barat,<sup>d</sup> Isabel Escriche<sup>d</sup> and Pedro Amorós<sup>e</sup>.

<sup>a</sup> Instituto de Química Molecular Aplicada, Departamento de Química, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n, E-46071 Valencia, Spain. E-mail: rmaez@qim.upv.es

<sup>b</sup> Institute of Organic Chemistry, National Academy of Sciences, 5 Murmanskaya St., Kiev-94, UKR-253660, Ukraine. E-mail: timophei@bricks.kiev.ua

<sup>c</sup> Div. I.5, Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung (BAM), Richard-Willstätter-Strasse 11, D-12489 Berlin, Germany. E-mail: knut.rurack@bam.de

<sup>d</sup> Departamento de Tecnología de Alimentos, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n, E-46022 Valencia, Spain.

<sup>e</sup> Institut de Ciència del Materials (ICMUV), Universitat de Valencia, P.O. Box 2085, E-46071 Valencia, Spain.

Received (in Cambridge, UK) 20th February 2006, Accepted 6th April 2006

First published as an Advance Article on the web 2nd May 2006 DOI: 10.1039/b602497a.

**Pyrylium-containing mesoporous materials have been used for the chromo-fluorogenic sensing of biogenic amines in an aqueous environment.**

Biologically active amines are ubiquitous chemical compounds that play an important role in many different areas. Depending on their chemical composition and origin, basically two different groups can be found. A major group are the so-called biogenic amines that are formed in the normal metabolism of animals, plants and micro-organisms via decarboxylation of the respective amino acid through substrate-specific enzymatic reactions. The formation of these biogenic amines is undesirable in foods and beverages because they can induce headaches, respiratory

distress, heart palpitations and several allergenic disorders.<sup>1</sup> Histamine is the most toxic of the biogenic amines and the main cause of scombroid poisoning by acting synergistically with other amines.

Thus, the level of biogenic amines in a food product is a quality index and the development of easy-to-use determination protocols is of interest. The second group are fatty amines such as sphingosine (a fatty amine that carries two additional hydroxyl groups in the polar head region) and its close metabolites that are important cellular messengers and have a profound impact on e.g. mitosis and apoptosis.<sup>2</sup> Other fatty amines, that usually stem from anthropogenic sources, are simple amines with a chain length > C10 that find wide-spread application in corrosion inhibition, asphalt emulsions or as petroleum additives and are well known for their antifungal and disinfectant properties.<sup>3</sup> Accordingly, the toxicological role of the latter group of compounds has the largest impact on aquatic organisms and, for instance in marine foodstuffs, a combination of all these amines can be encountered.

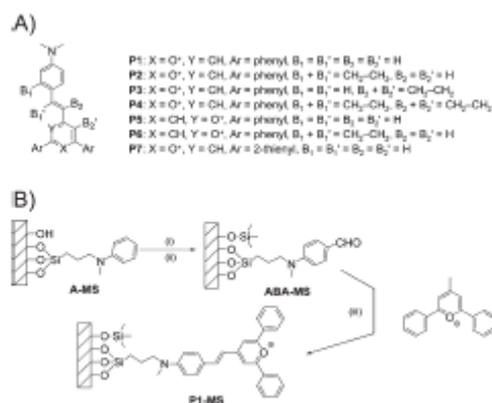
All these amines are usually determined by chromatographic methods. However, these techniques are costly and not suitable for in situ sensing or rapid screening applications. An appealing alternative is the use of selective chromo- or fluorogenic chemosensors.<sup>4</sup> In fact the development of highly selective probes or indicators for small bio-molecules is still a barely studied field.

One such advanced goal is the development of selective probes for real samples that would sense biogenic amines (first group, see above) via a simple chromo-fluorogenic test but would ideally remain silent in the presence of fatty amines (second group) and amino acids (another prominent source of amino moieties).

To achieve this goal we focused our attention on pyrylium compounds. As we and others have shown previously, such heterocyclic ring systems react with amines to give the corresponding pyridinium derivatives.<sup>5</sup> Furthermore, pyrylium and the respective pyridinium salts are strong electron acceptors so that appropriate integration into a charge-transfer chromophore yields deeply coloured dyes that absorb and emit in the red spectral range.<sup>6</sup>

The compounds **P1–P7** (pyrylium dyes) and **M1–M7** (methylpyridinium derivatives) (see Scheme 1) were prepared<sup>7</sup> and investigated to select the optimum combination of pyrylium– methylpyridinium dye for the selective and sensitive detection of the target analytes. While all the **P** dyes absorb at ca. 640 nm in highly polar solvents, their different bridging patterns and positions of the reactive oxygen atom were assumed to influence selectivity. The decisive criterion for the **M** dyes,

that serve as models for the product of the sensing reaction between amine and **P** dye, lies with signal output. Whereas the emission of differently rigidized styryl dyes is commonly found at similar wavelengths, their fluorescence yields often depend dramatically on the flexibility of the *p* system.<sup>8</sup> Spectroscopic studies of the dyes revealed that three of the methylpyridinium dyes (**M1**, **M2**, **M4**) show a reasonable fluorescence of  $0.05 > \Phi_f > 5 \times 10^{-3}$  in MeCN in the red spectral range, at  $\lambda_{max} \sim 660$  nm.



**Scheme 1.** (A) Compound library of pyrylium dyes spectroscopically studied and tested as sensor molecules for biologically active amines. The corresponding methylpyridinium derivatives **M1–M7** with N<sup>+</sup>-CH<sub>3</sub> instead of O<sup>+</sup> have been also studied spectroscopically. (B) Synthesis of solid **P1–MS**. (i) Hexamethyldisilazane, toluene, room temperature, 16 h, (ii) POCl<sub>3</sub> in DMF 1h at 0°C and then 3h at 100°C, (iii) 4-methyl-2,6- diphenylpyrylium, MeCN, 80 °C, 16 h.

However, concerning a unique preference for biologically active amines, all the **P** dyes are rather unselective and thus not suitable as molecular sensors. At room temperature, they react with biogenic amines such as histamine, putrescine and cadaverine as well as with decylamine (as a representative of large lipophilic fatty amines) in mixed aqueous organic solutions (H<sub>2</sub>O: MeCN 90 : 10 v/v) at basic pH, but also with a number of natural aminoacids, especially glycine, tyrosine, histidine, cysteine and lysine. As the best performance in this respect was found for **P1** and since **M1** is among the most fluorescent **M** derivatives, the pair **P1–M1** was selected for further improvement of the system.

A way to overcome a lack of selectivity is to enhance host–guest interactions for the particular target analyte. Apart from the traditional design of complex hosts with multiple binding sites, enhanced selectivity can be obtained by coupling the

probe to nanoscopic inorganic solids. Here, the use of mesoporous solids is highly suitable because, if properly functionalised, their rigid 3D nanoscopic scaffold can behave as a biomimetic prototype of “binding pockets” of bio-molecules.<sup>9</sup> Thus, to improve the analytical performance of the couple **P1–M1** we anchored **P1** covalently to the inner walls of the hydrophobically functionalised mesopores of a disordered MCM-41 type<sup>10</sup> hybrid material (Scheme 1).<sup>11</sup>

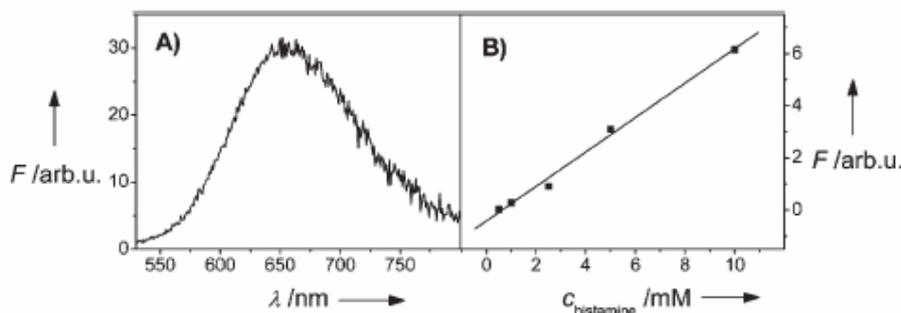
For comparison and to demonstrate the effect of the functionalised “binding pockets” on the final selectivity observed, two more systems were prepared; (i) the **P1–FS** solid containing **P1** probes anchored onto hydrophobized fumed silica (similar to **P1–MS** but without the presence of mesopores) and (ii) a sensory PVC-membrane containing the dye **P1** and NPOE as plasticizer (**P1–PVC**).<sup>12</sup>

The performance of these materials was tested in water at pH 10.5 in the presence of biogenic amines and natural amino acids as potential competitors. The reaction of the blue materials ( $\lambda_{\text{max}} = 650 \text{ nm}$ ) with histamine, putrescine and cadaverine resulted in the evolution of a new band at 521 nm due to the formation of the corresponding pyridinium derivative (colour modulation from blue to red) within a few minutes for upper millimolar concentrations. Although lower concentrations require longer reaction times, the latter can be satisfactorily shortened by heating.

As an example, Fig. 1 shows a photograph of solid **P1–MS** in the presence of amino acids and biogenic amines, whereas Fig. 2 shows the fluorometric sensing features that allow, using relatively simple devices, a sensitive detection even at low biogenic amine concentration when the chromo-fluorogenic reaction is only partially completed. The emission of the reaction product can be conveniently monitored in the red visible range, the relationship between analyte concentration and response is linear, and the combination of the sensory materials (here **P1–MS**) with fluorometric detection is sufficiently sensitive to yield a limit of detection of  $5 \times 10^{-4} \text{ M}$  of histamine.



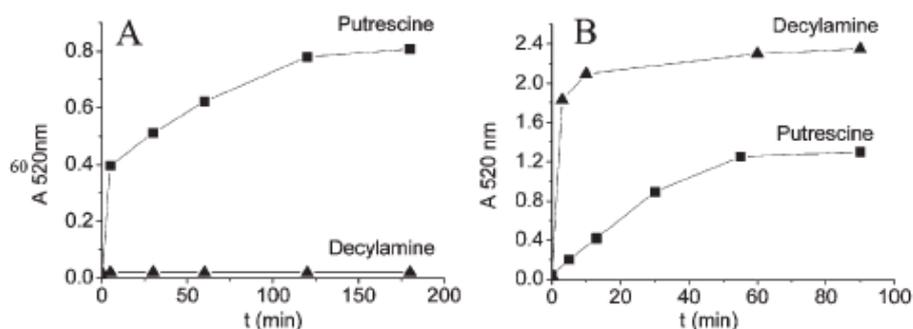
**Fig. 1.** Photograph showing the colour change in **P1–MS** in the presence of amino acids and biogenic amines. From left to right: no guest, glycine, valine, leucine, phenylalanine, proline, tyrosine, arginine, tryptophan, cysteine, lysine, histidine, histamine, putrescine and cadaverine. The final solids filtered and suspended in ethylene glycol are shown.



**Fig. 2.** (A) Emission spectrum of the **P1-MS**-histamine reaction product as measured for  $0.01 \text{ mg mL}^{-1}$  solid suspended in ethylene glycol;  $\lambda_{\text{exc}} = 490 \text{ nm}$ . (B) Corresponding calibration curve.

As it is shown exemplarily in Fig. 1, there is a remarkably selective response to biogenic amines, whereas **P1-FS**, **P1-MS** and **P1-PVC** remain completely silent even in the presence of a very large excess of amino acids. Especially the discrimination of histamine over its closely related parent amino acid histidine and other amino acids with nucleophilic residues (e.g. lysine and cysteine) is a striking feature and clearly shows the improved response of the prepared sensory materials when compared to that of **P1** in solution under similar conditions (see above). Apparently, the confinement of the probe into hydrophobic systems protects the anchored **P1** molecules from a nucleophilic attack of charged amino acids, i.e. hinders the amino acids to enter or approach the hydrophobic environments, while the neutral amines can still react.

This discrimination of biogenic amines vs. amino acids is very similar for the three sensory materials **P1-FS**, **P1-MS** and **P1-PVC**. However, they behave differently if discrimination by size and lipophilicity is considered. For instance, this differentiation is evident from a comparison of the reactivity of the solids with putrescine and a fatty amine such as *n*-decylamine. Here, **P1-PVC** reacts faster with *n*-decylamine than with putrescine, whereas in remarkable contrast the solid **P1-MS** displays a much faster reactivity for putrescine than for *n*-decylamine (similar results were obtained with histamine). This control in the selectivity can be seen in Fig. 3 that shows the colour change (absorbance at 520 nm) in the presence of 300 ppm of putrescine or *n*-decylamine in water for the sensory materials **P1-MS** and **P1-PVC**. Finally, **P1-FS** displays a rather similar reactivity for both amines (not shown).



**Fig. 3** Absorbance vs. time at 520 nm in the presence of 300 ppm of putrescine or *n*-decylamine in water at 60 °C for the sensory materials. (A) **P1-MS** and (B) **P1-PVC**.

This behaviour is tentatively attributed to the individual features of the different solids. **P1-PVC**, a highly disordered material with a large distribution of pore sizes, is clearly preferred by the fatty amines due to the highest lipophilic character of the three hybrids. **P1-FS**, conglomerates of high-surface nanoparticles with a textural porosity, are largely indifferent toward the lipophilicity of the guest. On the other hand, the size discrimination observed for the MCM41-type **P1-MS** solid is based on the interplay between the passivated surface that tends to prefer more hydrophobic guests and the size of the ordered and rather uniform pores that tend to discriminate by size. Furthermore, during the course of an analysis, increasing reaction events will block the entrances of the channels more effectively for long-chain amines.

These trends lead to the fact that amines with a medium-sized alkylic or alkylarlic end group exhibit a much faster response than the fatty amines. The combination of molecular concepts and preorganized 3D solid state features thus display synergistic effects that allow one to modulate simple hydrophobic discrimination toward a more sophisticated differentiation by polarity and size.<sup>13</sup>

Motivated by the favourable response features of the sensory materials, we tested the potential of **P1-MS** for the determination of biogenic amines in realistic media, extracts of fish (*Sparus aurata*) spiked with increasing amounts of histamine. In a typical assay, 0.35 mL of an aqueous extract of *S. aurata* (obtained from 10 g of the fish ground up with 50 mL of water, heated and filtered or centrifuged) at pH 10 were mixed with known amounts of histamine and 1 mg of **P1-MS**. The gradual

colorimetric modulation was observed as a function of histamine concentration (Fig. 4).



**Fig. 4** Photograph of a suspension of solid **P1-MS** in contact with aqueous extracts of gilthead bream (*S. aurata*) at pH 10 with increasing amounts of histamine after 30 min of reaction at 50 °C. From left to right:  $c_{\text{histamine}} = 0, 3.75 \times 10^{-3}, 6.25 \times 10^{-3}, 1.25 \times 10^{-2}$  and  $2.50 \times 10^{-2}$  M.

This response, visible by the naked eye, from blue to red-orange in a complex realistic sample medium suggests that **P1-MS**, or similar systems, are promising optical sensors for the rapid screening of toxic biogenic amines in target foods.

In summary, we have shown the rational development of sensory materials for the chromo- and fluorogenic detection of biogenic amines in complex liquid samples. The probe molecule is a reactive pyrylium chromophore that is anchored into the inner hydrophobic pores of a mesoporous siliceous support. The solid **P1-MS** demonstrates that the combination of molecular concepts and 3D solid state preorganized features (for instance confinement in nanometric pores and hydrophobicity) might open new attractive and synergistic hetero-supramolecular routes to enhanced recognition/sensing protocols for species of interest.

We thank the Ministerio de Ciencia y Tecnología (MAT2003-08568-C03-02) for support. F.S. is thankful for a Ramón y Cajal contract. B.G.A. thanks the Generalitat Valenciana and M.C. thanks the Caja de Ahorros del Mediterráneo for a Doctoral Fellowship. A.B.D. thanks the Alexander-von-Humboldt Foundation for a Research Fellowship.

#### Notes and references.

1. C. Ruiz-Capillas and F. Jime'nez-Colmenero, *Crit. Rev. Food Sci.*, 2004, 44, 489.
2. M. Maceyka, S. G. Payne, S. Miltien and S. Spiegel, *Biochim. Biophys. Acta*, 2002, 1585, 193.
3. J. A. Finlay and M. E. Callow, *Biofouling*, 1996, 9, 257.
4. R. Martínez-Máñez and F. Sancenón, *Chem. Rev.*, 2003, 104, 4419.
5. A. I. Tolmachev, N. A. Derevyanko, E. F. Karaban and M. A. Kudinova, *Khim. Geterotsikl. Soedin.*, 1975, 612; A. R. Katritzky, *Tetrahedron*, 1980, 36, 679; A. T.

- Balaban, A. Dinculescu, G. N. Dorofeenko, G. W. Fischer, A. V. Koblik, V. V. Mezheritskii and W. Schroth, *Adv. Heterocycl. Chem*, 1982, Suppl. 2, pp. 1–404.
6. J. L. Bricks, J. L. Slominskii, M. A. Kudinova, A. I. Tolmachev, K. Rurack, U. Resch-Genger and W. Rettig, *J. Photochem. Photobiol.*, A, 2000, 132, 193.
7. For general synthesis details see: ref 6; M. Szczepan, W. Rettig, A. I. Tolmachev and V. V. Kurdyukov, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2001, 3, 3555; R. Wizinger and P. Ulrich, *Helv. Chim. Acta*, 1956, 39, 207; M. A. Kudinova, V. V. Kurdyukov and A. D. Kachkovskii, *Khim. Geterotsikl. Soedin.*, 1998, 494. Additionally compound P6 was prepared by reaction of 2-methyl-4,6-diphenylpyrylium tetrafluoroborate and 5-dimethylamino-1-indanone (cf. A. T. Brown, G. Hallas and R. Lawson, *Chem. Ind.*, 1981, 7, 248) in acetic anhydride at 125–130 °C for 1 h.
8. M. Szczepan, W. Rettig and A. I. Tolmachev, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2003, 2, 1264.
- 9 A. B. Descalzo, K. Rurack, H. Weisshoff, R. Martínez-Mañez, M. D. Marcos, P. Amorós, K. Hoffman and J. Soto, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, 127, 184; M. Comes, G. Rodríguez-López, M. D. Marcos, R. Martínez-Mañez, F. Sancenón, J. Soto, L. A. Villaescusa, P. Amorós and D. Beltrán, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2005, 44, 2918; D. R. Radu, C.-Y. Lai, J. W. Wiench, M. Pruski and V. S.-Y. Lin, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, 126, 1640; V. S.-Y. Lin, C.-Y. Lai, J. Huang, S.-A. Song and S. Xu, *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, 123, 11510; M. Comes, M. D. Marcos, R. Martínez-Mañez, F. Sancenón, J. Soto, L. A. Villaescusa, P. Amorós and D. Beltrán, *Adv. Mater.*, 2004, 16, 1783.
10. J. El Haskouri, D. Ortíz de Zárate, C. Guillém, J. Latorre, M. Caldés, A. Beltrán, D. Beltrán, A. B. Descalzo, G. Rodríguez-López, R. Martínez-Mañez, M. D. Marcos and P. Amorós, *Chem. Commun.*, 2002, 330.
11. **P1-MS** and **P1-FS** possess a hydrophobic surface with a molar ratio of CH<sub>3</sub>/SiO<sub>2</sub> = 0.33 and 0.25, respectively, and **P1** is incorporated with a molar ratio of pyrylium/SiO<sub>2</sub> = 6.38 × 10<sup>-4</sup> and 2.28 × 10<sup>-4</sup> into **P1-MS** and **P1-FS**, respectively. Additional characterization for **P1-MS**: powder X-ray patterns show the presence of a disordered MCM-41 phase indicating that nothing changed after the functionalization process. IR spectra of P1-MS showed silanol bands at 1080 cm<sup>-1</sup> and stretching C–H vibrations (from CH<sub>3</sub> groups) at 2964 cm<sup>-1</sup> and bands in the 850–600 cm<sup>-1</sup> range due to stretching vibrations of Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> moieties. Due to its low relative amount in the final solid, bands of the pyrylium group were not detected. N<sub>2</sub> adsorption–desorption isotherms showed characteristic behaviour for

a mesoporous material with a specific surface (BET model) of  $753 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ , a volume of  $0.56 \text{ cc g}^{-1}$  and a pore diameter (BJH method) of 2.51 nm.

12. **P1-PVC** was prepared by mixing **P1** (2%wt.), poly(vinyl chloride) (49%wt.) and nitrophenyl octyl ether (49%wt.) in 5 mL of THF. The solvent was evaporated to give a blue-greenish membrane.

13. In preliminary studies we have observed that the sensory materials **P1-FS**, **P1-MS** and **P1-PVC** can in part be regenerated after their use by treatment with an acidic aqueous solution that partially liberates the original blue pyrylium probe. We will address this reactivity in the future, based on the detailed reaction mechanisms of pyrylium–pyridinium interconversion [see for instance ref. 5: A. T. Balaban et al. pp. 114–115]. This reversible process points towards the possibility of using the sensory materials for repetitive cycles for qualitative purposes.