

**UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA**

**DEPARTAMENT DE QUÍMICA**



**Sensores cromo-fluorogénicos para compuestos  
potencialmente peligrosos.**

**TESIS DOCTORAL**

Presentada por:

**Santiago Royo Calvo**

Dirigida por:

**Dr. Ramón Martínez Máñez**

**Dr. Félix Sancenón Galarza**

**Octubre 2011**





Instituto Interuniversitario de Reconocimiento  
Molecular y Desarrollo Tecnológico

D. RAMÓN MARTÍNEZ MÁÑEZ, Catedrático de Universidad del Departamento de Química de la Universidad Politécnica de Valencia.

D. FÉLIX SANCENÓN GALARZA, Profesor Titular del Departamento de Química de la Universidad Politécnica de Valencia.

CERTIFICAN:

Que el trabajo que presenta Santiago Royo Calvo en esta memoria, bajo el título “Sensores cromo-fluorogénicos para compuestos potencialmente peligrosos” ha sido realizado bajo nuestra dirección en el Departamento de Química de la Universidad Politécnica de Valencia”.

Y para que así conste, a efectos de su presentación para optar al grado de Doctor en Ciencias Químicas, expedimos la presente que firmamos en Valencia, a 4 de Octubre de 2011.

**Dr. Ramón Martínez Máñez**

**Dr. Félix Sancenón Galarza**



**A Dios, a mi Familia y al MaxMax**



**¿Acaso no confías en mí? Dudé antes de responder.  
Es lo que hace el diablo, pensé. Jugar con la gente.  
Con la ambición, la vanidad, la lujuria, el miedo.  
Hasta con el corazón. Está escrito: Todo será tuyo si,  
postrándote, me adoras. Un diablo inteligente ni siquiera  
necesita mentir.**

***El Caballero del Jubón Amarillo*  
Arturo Pérez-Reverte**

**La soberbia se convertía demasiado a menudo en una especie  
de masturbación del alma, en la que el pecador experimentaba  
una íntima y muy privada satisfacción a base de ir excitando  
cada vez más su egolatría para concluir estallando en un  
desmesurado orgasmo por la sencilla fórmula de convencerse a  
sí mismo de una indiscutible superioridad que le proyectaba  
muy por encima del resto de los mortales.**

***El Señor de las Tinieblas*  
Alberto Vázquez-Figueroa**

**Humillaos, pues, bajo la poderosa mano de Dios, para que Él os  
exalte cuando fuere tiempo. Sed sobrios y velad, porque  
vuestro adversario el diablo, como león rugiente, anda  
alrededor buscando a quien devorar.**

***La Biblia*  
1ª Pedro 5: 7-8**

**-Primeros principios, Clarice. Simplicidad. Lea a Marco Aurelio. De cada cosa pregúntese qué es en sí misma, cuál es su naturaleza. ¿Qué es lo que hace el hombre al que están buscando?**

**- Mata a mujeres.**

**- ¡No! Eso es circunstancial. ¿Cuál es la primera y principal cosa que hace, qué necesidad cubre matando?**

**- La ira. La aceptación social y la frustración sexual...**

**- ¡No! Clarice ¡No! La codicia. Esa es su naturaleza. Y ¿Cómo empezamos a codiciar, Clarice? ¿Buscamos cosas para codiciar? Haga un esfuerzo y conteste.**

**- No. Solamente...**

**- ¡No! Empezamos por codiciar lo que vemos cada día. ¿No siente su cuerpo recorrido por las miradas, Clarice? Y ¿no busca con su mirada las cosas que desea? Codiciamos lo que vemos cada día.**

***“El silencio de los corderos”* cuando el Doctor Hannibal Lecter (M.D.) le dice a la agente Clarice Starling cómo debe encontrar al asesino.**





## Resumen

La presente tesis doctoral titulada “Sensores cromo-fluorogénicos para compuestos potencialmente peligrosos” está centrada en el diseño y la síntesis de dosímetros químicos colorimétricos y de nanopartículas híbridas orgánico-inorgánicas para la detección visual de simulantes de agentes nerviosos y por extensión de los propios agentes nerviosos. La detección de este tipo de sustancias es muy importante debido a su elevada toxicidad y a la posibilidad de que sean utilizadas indiscriminadamente por parte de grupos terroristas. Los ejemplos de sensores químicos para este tipo de sustancias descritos en la literatura son, en su mayoría, sensores o dosímetros químicos fluorogénicos y por tanto requieren para su utilización de equipos relativamente sofisticados. Es por ello que se decidió desarrollar nuevos sistemas colorimétricos que permitieran una detección visual “a simple vista” de este tipo de sustancias químicas. Los agentes nerviosos son compuestos organofosforados que tienen carácter electrofílico y por tanto reaccionan con nucleófilos. Así, en primer lugar, se diseñaron y evaluaron con éxito tres sistemas de recepción con grupos nucleófilos que fueron incluidos en cromóforos de tipo dador-aceptor y que permitieron el desarrollo de tres nuevas familias de reactivos o sondas colorimétricas para la detección de agentes nerviosos.

Las dos primeras familias de reactivos colorimétricos desarrollada en esta tesis doctoral esta basada en colorantes de tipo azoico. En la primera de ellas el sistema de recepción esta basado en dos reacciones consecutivas, fosforilación de un alcohol alifático primario y posterior reacción de ciclación intramolecular con un amina terciaria aromática, la *N,N*-dimetilanilina, para formar una sal de amonio. En este caso, y debido al carácter electrón-dador de la *N,N*-dimetilanilina, este sistema de recepción actúa como grupo dador en el colorante azoico. Siguiendo este enfoque se consiguió sintetizar y evaluar con éxito tres reactivos colorimétricos que permitieron una detección visual de los simulantes de agentes nerviosos tanto en disolución en medio orgánico como en mezclas acetonitrilo/agua. También se comprobó que estos reactivos colorimétricos pueden ser incluidos en soportes sólidos para la preparación de sistemas de detección de agentes nerviosos en fase gas. La segunda familia de colorantes azoicos, utilizada como reactivos colorimétricos para simulantes de agentes nerviosos, esta basada en la reactividad nucleofílica del átomo de nitrógeno de la piridina. Debido al carácter electrón-aceptor de la piridina esta actúa como grupo aceptor en el colorante azoico. Haciendo uso de esta nueva aproximación se diseñaron y sintetizaron distintos colorantes azoicos con piridinas como grupos aceptores y se comprobó que eran capaces de reaccionar y por tanto detectar los simulantes de agentes nerviosos

empleados en el estudio. También se evaluó con éxito la detección en fase gas de los simulantes de agentes nerviosos empleados.

La última familia de reactivos colorimétricos esta basada en derivados de diarilmetanol y triarilmetanol, conocidos como carbinoles, y permite una detección visual de los agentes nerviosos mediante la aparición de color a partir de disoluciones incoloras. El sistema de detección es la fosforilación de un alcohol alifático, secundario o terciario, y la posterior eliminación del derivado de fosfato que se forma para generar un carbocatión. Esta secuencia de reacciones permite la aparición de una banda de transferencia de carga que cae dentro del rango visible del espectro electromagnético dado que se forma un producto coloreado.

Finalmente se describe la detección cromogénica de simulantes de agentes nerviosos mediante el control del transporte de masa a la superficie de nanopartículas de sílice bifuncionalizadas. El enfoque que se llevó a cabo para la detección cromogénica implica el uso de nanopartículas de sílice funcionalizadas con dos subunidades diferentes, grupos tiol y alcoholes alifáticos. El papel de los grupos tiol (inhibidor) es actuar como grupo reactivo frente a un colorante que actúa como indicador. Se eligió los grupos hidroxilos como responsables del control del acceso del colorante al inhibidor, ya que son capaces de reaccionar con los simulantes de agentes nerviosos produciendo esteres fosfóricos. Estos son muy voluminosos y son capaces de impedir la reacción entre el indicador y los grupos tiol permitiendo la detección de los agentes nerviosos tanto en disolución como en fase gas.

## Resum

La present tesi doctoral titulada “Sensors cromofluorogènics per a compostos potencialment perillosos” està centrada en el disseny i la síntesi de dosímetres químics colorimètrics i de nanopartícules híbrides orgànic-inorgàniques per a la detecció visual de simulants d’agents nerviosos i per extensió dels propis agents nerviosos. La detecció d’aquest tipus de substàncies es molt important degut a la seua elevada toxicitat i a la possibilitat de que siguen utilitzades indiscriminadament per part de grups terroristes. Els exemples de sensors químics per a aquest tipus de substàncies descrits en la literatura són, en majoria, sensors o dosímetres químics fluorogènics i per tant requereixen per a la seua utilització d’equips relativament sofisticats. És per això que es va decidir desenvolupar nous sistemes colorimètrics que permetren una detecció visual “a simple vista” d’aquestes substàncies químiques. Els agents nerviosos son compostos organofosforats que tenen caràcter electrofílic i per tant reaccionen amb nucleòfils. Així, en primer lloc, es varen dissenyar i avaluar amb èxit tres sistemes de recepció amb grups nucleòfils que varen ser inclosos en cromòfors de tipus donor-acceptor i que varen permetre el desenvolupament de tres noves famílies de reactius o sondes colorimètriques per a la detecció d’agents nerviosos.

Les dues primeres famílies de reactius colorimètrics desenvolupada en aquesta tesi doctoral està basada en colorants de tipus azoic. En la primera d’elles el sistema de recepció està basat en dos reaccions consecutives, fosforilació d’un alcohol alifàtic primari i posterior reacció de ciclació intramolecular amb una amina terciària aromàtica, la *N,N*-dimetilnilina, per a formar una sal d’amoni. En aquest cas, i degut al caràcter electrò-donor de la *N,N*-dimetilnilina, aquest sistema de recepció actua com a grup donor en el colorant azoic. Seguint aquest plantejament es va aconseguir sintetitzar i avaluar amb èxit tres reactius colorimètrics que varen permetre una detecció dels simulants d’agents nerviosos tant en dissolució en medi orgànic com en mescles acetonitril/aigua. També es va comprovar que aquestos reactius colorimètrics poden ser inclosos en suports per a la preparació de sistemes de detecció d’agents nerviosos en fase gas. La segona família de colorants azoics, utilitzada com a reactius colorimètrics per a simulants d’agents nerviosos, està basada en la reactivitat nucleofílica del àtom de nitrogen de la piridina. Degut al caràcter electrò-acceptor de la piridina esta actua com a grup acceptor en el colorant azoic. Fent ús d’aquesta nova aproximació es varen dissenyar i sintetitzar distints colorants azoics amb piridines com a grups acceptors i es va comprovar que eren capaços de reaccionar i, per tant detectar els simulants

d'agents nerviosos empleats en el estudi. També s'avaluà amb èxit la detecció en fase gas dels simulants d'agents nerviosos utilitzats.

L'última família de reactius colorimètrics està basada en derivats de diarilmetanol i triarilmetanol, coneguts com a carbinols, i que permeten una detecció visual dels agents de guerra química mitjançant l'aparició de color a partir de dissolucions incolores. El sistema de detecció es la fosforilació d'un alcohol alifàtic, secundari ó terciari, i la posterior eliminació del derivat de fosfat que es forma per a generar un carbocatió. Aquesta seqüència de reaccions permet l'aparició d'una banda de transferència de càrrega que cau dins del rang visible de l'espectre electromagnètic per lo que s'observa un producte colorejat.

Finalment es descriu la detecció cromogènica de simulants d'agents nerviosos mitjançant el control del transport de massa a la superfície de nanopartícules de sílice bifuncionalitzades. L'enfoc que es va dur a terme per a la detecció cromogènica implica l'ús de nanopartícules de sílice funcionalitzades amb dos subunitats diferents, grups tiol y alcohols alifàtics. El paper dels grups tiol (inhibidors) és actuar com a grups reactius front a un colorant que actua com a indicador. Es va elegir els grups hidroxils com a responsables del control de l'accés del colorant al inhibidor, ja que són capaços d'impedir la reacció entre l'indicador i els grups tiol permetin la detecció dels agents nerviosos tant en dissolució com en fase gas.

## Abstract

The present Thesis entitled “Chromo-fluorogenic sensors for the detection of potentially hazardous materials” is related to the design and synthesis of chromogenic chemodosimeters and to the preparation of organic-inorganic hybrid silica nanoparticles for the visual detection of nerve agent simulants and, by extension, for the real nerve agents. The high toxicity of the nerve agents and the fact that several terrorist groups have used them very recently in indiscriminate attacks underscores the need to detect these lethal compounds with quick, reliable procedures. In recent years, and as alternative a to the usual physical measurements employed for the detection of nerve agents, fluorescent dosimeters and sensors has been developed. However, these fluorescent sensors required the use of relatively sophisticated equipment in order to detect these lethal chemicals. Bearing in mind these facts we focused this Thesis in the preparation of highly selective and sensitive chromogenic sensors that allowed a visual detection of nerve agent simulants. Nerve agents are highly toxic organophosphorous compounds that presented an electrophilic character and are prone to react with nucleophilic species.

As a first part of this Thesis three reactive sites, bearing nucleophilic moieties, coupled with several donor-acceptor chromophores were designed, synthesized and evaluated as colorimetric probes against nerve agent simulants. The first two families of chromogenic reagents developed in this Thesis are based in azo dyes.

In the first family, the mechanism of action of the reactive site is based in two consecutive reactions; (i) a primary aliphatic alcohol phosphorylation and (ii) subsequent intramolecular cyclization with a tertiary amine (*N,N*-dimethylaniline), that yielded a quaternary ammonium salt as a final product. In this family, this reactive site the *N,N*-dimethylaniline acts as donor group in the final azo dye. When the cyclization reaction takes place the quaternary nitrogen atom changes its character to electron acceptor with a subsequent colour change. Bearing in mind these facts, we prepared three chromogenic reagents that were able to give colour changes in the presence of nerve agent simulants allowing their visual detection in organic solvents and in water-acetonitrile mixtures. Also the final chromogenic reagents were included in an inorganic support for the sensing of nerve agent simulants in the vapour phase.

The second family of chromogenic reagents is based on azo dyes containing pyridine rings. The nitrogen atom in the pyridine ring has nucleophilic character and is able to react with the nerve agent simulants giving pyridinium cations. This phosphorylation reaction changes the

electronic properties of the nitrogen atom from donor (in the pyridine form) to acceptor (in the pyridinium salt). Making use of this reactivity several azo dyes containing pyridine rings were synthesized. These receptors were able to react with nerve agent simulants leading to remarkable colour changes that allowed their colorimetric detection. Also these pyridine-based receptors were tested for the colorimetric recognition of nerve agent simulants in the vapour phase.

The last family of chromogenic reagents developed in this Thesis is based in diarylmethanol and triarylmethanol (carbinols) derivatives. This family of receptors allowed a visual detection of nerve agent simulants by the formation of a coloured product from a colourless one. The mechanism of the chromogenic response is related with the phosphorylation of a secondary or tertiary aliphatic alcohol followed by the elimination of a phosphate fragment that yielded a coloured carbocation. Both consecutive reactions induced the appearance of an absorption band in the visible zone that allowed the detection of the nerve agent simulants.

Finally, a new optical test for the detection of nerve agent simulants based on nerve agent control of mass transport to the surface of bifunctionalised silica nanoparticles was also prepared. The chromogenic paradigm involves the use of silica nanoparticles that are functionalized with two different subunits; thiol groups and aliphatic alcohols. The role of thiol moieties is to act as a reactive subunit towards a squaraine dye. The reaction of thiols with the central electron-deficient four-membered ring of the squaraine induces a loss of aromaticity, coupled with a bleaching of the blue squaraine solution. Additionally, aliphatic alcohols are known to give acylation reactions with phosphonate substrates. The sensing protocol relies on the fact that the phosphorylation reaction of the hydroxyl groups with certain nerve agent simulants would inhibit the reaction between thiols and squaraine dye, resulting in chromogenic signalling. Chromogenic detection of nerve agent simulants was achieved in solution and in vapour phase by using these bifunctionalized nanoparticles.

Los resultados de esta tesis han dado lugar, a día de hoy, a las siguientes publicaciones:

S. Royo, R. Martínez-Máñez, F. Sancenón, A. M. Costero, M. Parra and S. Gil “*Chromogenic and fluorogenic reagents for chemical warfare nerve agents’Detection*”, *Chem. Commun.*, **2007**, 4839–4847.

A. M. Costero, S. Gil, M. Parra, P. M. E. Mancini, R. Martínez-Máñez, F. Sancenón and S. Royo, “*Chromogenic detection of nerve agent mimics*”, *Chem. Commun.*, **2008**, 6002–6004.

A. M. Costero, M. Parra, S. Gil, R. Gotor, P. M. E. Mancini, R. Martínez-Máñez, F. Sancenón and S. Royo, “*Chromo-Fluorogenic Detection of Nerve-Agent Mimics Using Triggered Cyclization Reactions in Push–Pull Dyes*”, *Chem. Asian J.* **2010**, 5, 1573 – 1585.

E. Climent, A. Martí, S. Royo, R. Martínez-Máñez, M. D. Marcos, F. Sancenón, J. Soto, A. M. Costero, S. Gil and M. Parra, “*Chromogenic Detection of Nerve Agent Mimics by Mass Transport Control at the Surface of Bifunctionalized Silica Nanoparticles*”, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 49, 5945 –5948.

S. Royo, A. M. Costero, M. Parra, S. Gil, R. Martínez-Máñez and F. Sancenón, “*Chromogenic, Specific Detection of the Nerve-Agent Mimic DCNP (a Tabun Mimic)*”, *Chem. Eur. J.* **2011**, 17, 6931 – 6934.



# Índice

Capítulo 1. Introducción.....	2
1.1. Química Supramolecular.....	2
1.1.1 Reconocimiento molecular. Concepto de receptor.....	2
1.1.2 Sensores químicos moleculares.....	3
1.2. Sensores ópticos.....	5
1.2.1. Reconocimiento molecular basado en la modificación de señales ópticas.....	5
1.2.2. Definición de sensor y dosímetro químico ópticos.....	10
1.2.3. Sensores fluorogénicos.....	12
1.2.4. Sensores cromogénicos.....	15
<i>Cromóforos dador-aceptor</i> .....	16
1.2.5. Sensores ópticos para la detección de moléculas neutras.....	20
1.3. Agentes de Guerra Química.....	25
1.4. Detección cromo-fluorogénica de agentes nerviosos.....	34
1.4.1. Reactivos fluorescentes basados en procesos PET.....	35
1.4.2. Reactivos cromo-fluorogénicos con oximatos.....	41
1.4.3. Polímeros de impresión molecular.....	46
1.4.4. Otros sensores para simulantes de agentes nerviosos.....	48
Capítulo 2. Colorantes azoicos como unidades señalizadoras en sondas colorimétricas para el reconocimiento de agentes nerviosos. Sistema receptor en la parte dadora del colorante.....	54
2.1. Introducción.....	54
2.1.1. Propiedades físico-químicas de los colorantes azoicos. Relación estructura-color.....	55
2.2. Diseño de sondas colorimétricas.....	56
2.3. Síntesis, caracterización y propiedades espectroscópicas.....	58
2.4. Reactividad con simulantes de agentes nerviosos.....	64
2.5. Estudios cinéticos y límites de detección.....	72
2.6. Detección en fase gas.....	74
2.7. Procedimientos experimentales.....	76
Capítulo 3. Colorantes azoicos derivados de piridina como sondas colorimétricas para el reconocimiento de agentes nerviosos. Sistema de recepción en la parte aceptora del colorante.....	90
3.1 Introducción.....	90
3.2 Diseño de sondas colorimétricas.....	90
3.3 Síntesis, caracterización y propiedades espectroscópicas.....	92
3.4 Reactividad con simulantes de agentes nerviosos.....	97
3.4.1 Estudios con el cromoreactivo R7.....	97
3.4.2 Estudios con los cromoreactivos R8-R11.....	110
3.5 Procedimientos experimentales.....	119

Capítulo 4. Derivados de diarilmetanol y triarilmetanol (carbinoles) como dosímetros químicos para el reconocimiento de simulantes de agentes de guerra química.....	127
4.1 Introducción.....	127
4.2 Diseño de sondas colorimétricas.....	128
4.3 Síntesis, caracterización y propiedades espectroscópicas.....	129
4.4 Reactividad con simulantes de agentes nerviosos.....	136
4.5 Estudios cinéticos y límites de detección.....	145
4.6 Procedimientos experimentales.....	150
Capítulo 5. Detección cromogénica de simulantes de agentes nerviosos mediante el control del transporte de masa a la superficie de nanopartículas de sílice bifuncionalizadas.....	164
5.1 Introducción.....	164
5.1.1 Materiales híbridos orgánico-inorgánicos.....	164
5.1.2 Materiales híbridos orgánico-inorgánicos funcionales en superficies 2D.....	166
5.2 Diseño del material híbrido sensor.....	172
5.3 Síntesis y caracterización de las nanopartículas y de la escuaridina.....	174
5.4 Estudios de detección de simulantes de agentes nerviosos.....	176
5.4.1 Estudios de detección en disolución.....	176
5.4.2 Estudios de detección en fase vapor.....	181
5.5 Procedimientos experimentales.....	183
6. Conclusiones y perspectivas.....	186

## **Capítulo 1. Introducción.**

# Capítulo 1. Introducción.

## 1.1. *Química Supramolecular*

La ciencia que conocemos con el nombre de *Química* ha desarrollado, durante los últimos 200 años, una ingente cantidad de métodos muy sofisticados para la construcción de moléculas con diversos grados de complejidad mediante la formación de enlaces covalentes de una forma controlada y precisa. En contraposición a la química clásica (el reino del enlace covalente), y desde los trabajos pioneros de J.M. Lehn en los inicios de la década de los ochenta del siglo XX, se inició el desarrollo de la *Química Supramolecular*, cuyo objetivo de estudio son las supermoléculas.

Así, la *Química Supramolecular*, o química más allá de la molécula, es un campo interdisciplinar que se dedica al estudio de especies químicas, de una complejidad superior a la de la molécula, que están unidas y organizadas por medio de interacciones intermoleculares de enlace. Es interdisciplinar porque las moléculas objeto de estudio se preparan mediante conceptos de química orgánica sintética, las interacciones entre dichas moléculas están basadas en los conceptos de la química de coordinación y los complejos metálicos y, por último, el estudio experimental y teórico de las supermoléculas formadas ahonda sus raíces en la química física, la bioquímica y en la ciencia de los materiales.

Como hemos dicho más arriba, el objeto de estudio de la *Química Supramolecular* son las supermoléculas, entendidas éstas como entidades formadas por dos o más moléculas que poseen propiedades estructurales, termodinámicas y cinéticas bien definidas. Sus componentes adquieren una disposición espacial determinada por la naturaleza de los enlaces intermoleculares que los mantienen unidos. Uno de los conceptos más atractivos, dentro de esta nueva química, es el del reconocimiento molecular.

### 1.1.1 Reconocimiento molecular. Concepto de receptor

Por reconocimiento molecular se entiende la coordinación selectiva de una molécula, que se denomina receptor, con un sustrato determinado. La interacción entre el receptor y el sustrato da lugar a la formación de una supermolécula.

Así pues, el receptor es una molécula (en general de naturaleza orgánica) que ha sido diseñada y sintetizada teniendo en cuenta que tiene

que coordinar con un sustrato determinado. Para ello hay que tener en cuenta las características físicas y químicas del sustrato con el objetivo de que el receptor tenga una gran afinidad por él. Este es el concepto de *complementariedad*, que es clave en la síntesis de receptores con alta selectividad hacia un determinado sustrato.

A la hora de diseñar un receptor adecuado para un sustrato determinado tenemos que tener en cuenta una serie de características como son el tamaño, la carga, la posible formación de enlaces de hidrógeno, la geometría y el carácter hidrófilo/lipófilo de la especie a coordinar. Si el receptor está bien diseñado se consigue un alto grado de *complementariedad* similar al encontrado en receptores biológicos mucho más complejos.

Los primeros receptores sintetizados en los años sesenta del siglo pasado fueron éteres corona con capacidad para coordinar cationes alcalinos y alcalinotérreos. Desde estos trabajos pioneros de Pedersen<sup>1</sup> se han sintetizado numerosos receptores para cationes conteniendo diversos heteroátomos, de distintos tamaños y con distintas geometrías.

El campo de los receptores de aniones es más moderno y está menos desarrollado que el de los receptores para cationes. Este hecho se explica ya que los aniones, en general, tiene tamaños más grandes que los correspondientes cationes isoelectrónicos con lo que su relación carga/radio es menor. Esto hace que las interacciones electrostáticas sean menos efectivas. Además, ciertos aniones cambian su carga con el pH del medio, tienen geometrías muy variadas (esféricos, triangulares, tetraédricos, etc) y presentan energías de solvatación elevadas. Todos estos factores hacen que la síntesis de receptores selectivos para aniones sea bastante más compleja.

El mismo comentario se puede aplicar al desarrollo de receptores para moléculas neutras ya que estas solo pueden dar un número de interacciones muy limitado (enlace de hidrógeno, van der Waals, dipolo-dipolo, etc.).

### 1.1.2 Sensores químicos moleculares

Una de las aplicaciones más importantes de los receptores es su utilización en la síntesis de los denominados *sensores químicos* moleculares. Un sensor químico es una especie capaz de coordinar selectivamente a un sustrato (evento molecular) e informar de su reconocimiento emitiendo una señal fácilmente medible (evento macroscópico). Un buen sensor debe cumplir una serie de requisitos como que el reconocimiento sea selectivo, que la interacción sea reversible y que no sea lenta para poder hacer mediciones en tiempo real. Para que se cumplan todos estos requerimientos

---

<sup>1</sup> C. J. Pedersen, *J. Am. Chem. Soc.*, **1967**, 89, 7017.

las interacciones entre el sensor y el sustrato han de ser relativamente débiles.

En general, los sensores químicos se componen de dos unidades, que pueden estar enlazadas mediante un enlace covalente o mediante otro tipo de interacciones. Estas dos unidades son:

- *Unidad coordinante*: es la que se encarga de la interacción con el sustrato y se tiene que sintetizar de acuerdo con las propiedades de este último con el fin de alcanzar un alto grado de complementariedad.
- *Unidad indicadora*: es la encargada de transformar el evento microscópico de la coordinación en una señal macroscópica. En general, como señales se suelen emplear cambios en alguna propiedad óptica (color o fluorescencia) o modificación de propiedades electroquímicas (potenciales de oxidación o reducción).

Existen tres aproximaciones distintas para el diseño de sensores químicos. Cada una de ellas tiene una serie de características propias que hace que la elección de un formato u otro sea cuestión de la selectividad que se desea alcanzar y del esfuerzo sintético que se esté dispuesto a realizar en la obtención del sensor. Así las tres aproximaciones son:

- *Unidad coordinante-unidad indicadora*: En esta aproximación, ambas unidades están conectadas mediante un enlace covalente. Es la aproximación que requiere un esfuerzo sintético mayor que pocas veces es compensado con una selectividad importante. Pese a ello es la aproximación más empleada en el desarrollo de sensores para cationes y aniones.
- *Ensayos de desplazamiento*: En esta aproximación la unidad indicadora y la unidad coordinante forman un complejo supramolecular. Al adicionar el sustrato, éste coordina de forma preferente con la unidad coordinante, desplazando a la unidad indicadora del complejo. Esta aproximación ha sido muy empleada en el desarrollo de sensores para aniones.
- *Dosímetro químico*: En esta aproximación se emplean reacciones químicas, generalmente irreversibles, inducidas por el sustrato y que suelen producir un cambio en alguna de las propiedades del sensor. En general, esta aproximación ha sido empleada para desarrollar sensores para aniones y para moléculas neutras.

En la presente tesis doctoral nos vamos a centrar en el uso del color como señal para el desarrollo de sensores ópticos de moléculas neutras como son los gases nerviosos y sus simulantes. A continuación desarrollaremos un poco más extensamente el concepto de sensores ópticos y sus mecanismos de respuesta al coordinar ciertas especies iónicas y neutras.

## **1.2. Sensores ópticos**

### **1.2.1. Reconocimiento molecular basado en la modificación de señales ópticas.**

El color es una percepción visual que se genera en el cerebro al interpretar las señales nerviosas que le envían los fotorreceptores de la retina del ojo y que a su vez interpretan y distinguen las distintas longitudes de onda que captan de la parte visible del espectro electromagnético. Es un fenómeno físico-químico asociado a las innumerables combinaciones de la luz, relacionado con las diferentes longitudes de onda en la zona visible del espectro electromagnético, que perciben las personas y animales a través de los órganos de la visión, como una sensación que nos permite diferenciar los objetos con mayor precisión.

Todo cuerpo iluminado absorbe una parte de las ondas electromagnéticas y refleja las restantes. Las ondas reflejadas son captadas por el ojo e interpretadas en el cerebro como colores según las longitudes de onda correspondientes. El ojo humano sólo percibe las longitudes de onda cuando la iluminación es abundante. A diferentes longitudes de onda captadas en el ojo corresponden distintos colores en el cerebro.

Existen dos tipos de objetos visibles: los que emiten luz por sí mismos y los que la reflejan. Para estos últimos, 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>2</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

---

<sup>2</sup> R. C. Denney, R. Sinclair, Visible and Ultraviolet Spectroscopy, John Wiley & Sons Ed., 1987.

770 nm donde se localiza la región visible, que comprende del violeta al rojo.

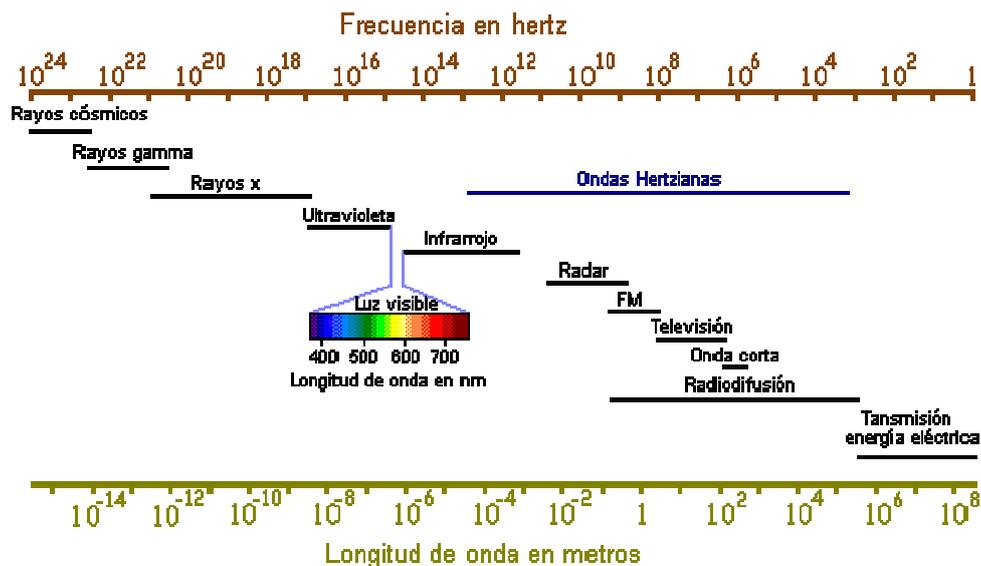


Figura 1.1 Espectro electromagnético.

La fuente más común de radiación electromagnética en la Tierra es el Sol. Él 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.

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

Tipo de radiación	Longitud de onda (nm)
Violeta	380-436
Añil(Indigo)	436-470
Azul	470-495
Verde	495-566
Amarillo	566-589
Naranja	589-627
Rojo	627-770

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 1.2** Colores complementarios correspondientes a los colores absorbidos de la radiación visible de la luz.

Color absorbido	Color complementario
Violeta	Verde amarillento
Azul	Amarillo
Azul verdoso	Naranja
Verde azulado	Rojo
Verde	Púrpura
Verde amarillento	Violeta
Amarillo	Azul
Naranja	Azul verdoso
Rojo	Verde azulado
Púrpura	Verde

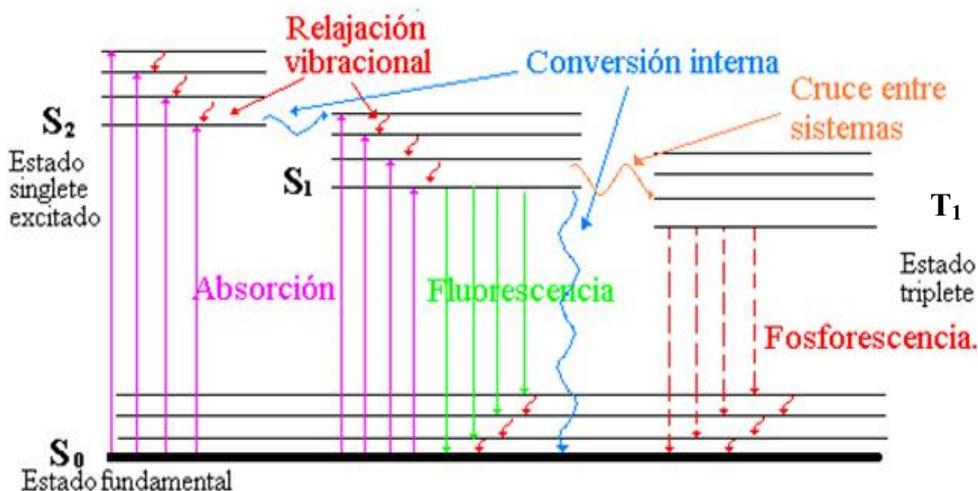
La absorción de la radiación visible o ultravioleta puede dar lugar a transiciones de electrones entre el estado fundamental y los estados excitados de los átomos y las moléculas<sup>3</sup>. Estas excitaciones electrónicas son las responsables del color de los objetos. El ojo humano ve el color complementario correspondiente al color absorbido de la radiación visible de la luz (ver **Tabla 1.2**). 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.

La disciplina que se encarga del estudio de la absorción de la radiación ultravioleta o visible es la espectroscopía electrónica. 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

---

<sup>3</sup> T. Engel, P. Reid, "Química Física", Pearson Educación S. A, (Traducción de Physical Chemistry, 1a edición), **2006**.

banda espectral de absorción se denomina cromóforo<sup>4</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.



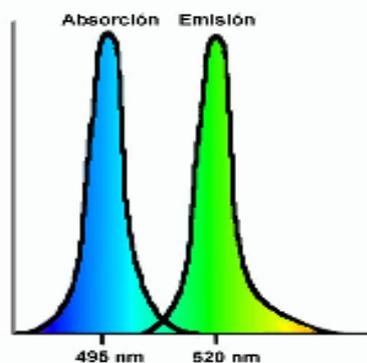
**Figura 1.2** Diagrama de Jablonski: descripción esquemática de los diferentes procesos fotofísicos que pueden tener lugar tras la excitación inicial desde el estado fundamental.

La luz absorbida por las moléculas puede ser emitida a través de dos procesos luminiscentes: la fluorescencia y la fosforescencia. También existen diversos procesos no radiativos que 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 1.2**). 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.

El fenómeno de la fluorescencia implica la emisión radiativa desde un estado excitado de igual multiplicidad que el estado inferior de la transición. Generalmente en las moléculas orgánicas, esta transición se produce desde el estado excitado singlete de menor energía, S<sub>1</sub>, hasta el estado fundamental S<sub>0</sub>, por lo que se habla de una transición S<sub>1</sub> → S<sub>0</sub>. Debido a que no se produce un cambio en la multiplicidad del estado, esta

<sup>4</sup> J. M. Costa, *Diccionario de Química Física*, Publicacions i Edicions de la Universitat de Barcelona, 2005.

transición está permitida por el espín, de forma que, en ausencia de otros factores de simetría, la emisión fluorescente esta permitida por lo que habitualmente se produce de manera rápida, en el rango de picosegundos a nanosegundos. Por el contrario, si la multiplicidad de espín del estado que emite es diferente la del estado inferior se produce la fosforescencia. De este modo, si el estado triplete de menor energía se halla poblado, a menudo por haberse producido un cruce entre sistemas desde el estado  $S_1$ , se puede observar la posterior transición  $T_1 \rightarrow S_0$  dando lugar a la fosforescencia. Las desexcitaciones no radiativas implican la conversión de un estado cuántico molecular en otro sin que se produzca una emisión de radiación. Estrictamente hablando, todas las desexcitaciones que no emiten radiación son no radiativas. Sin embargo, se acostumbra a utilizar el término no radiativo para definir un proceso intramolecular, es decir, una transición que ocurre entre estados cuánticos de una molécula individual sin necesidad de perturbaciones externas como colisiones con otras partículas. Según el diagrama de Jablonski las transiciones radiativas son verticales mientras que las transiciones no radiativas son horizontales, ya que estas últimas ocurren entre estados electrónicos que se encuentran prácticamente degenerados en energía. Igual que sucede con las desexcitaciones radiativas, se pueden identificar dos tipos diferentes de desexcitaciones no radiativas según las multiplicidades de espín de los estados implicados. La conversión interna (IC, internal conversion) supone la transferencia de población entre estados electrónicos de igual multiplicidad de espín, mientras que en el cruce entre sistemas (ISC, intersystem crossing) la transferencia de población tiene lugar entre estados electrónicos de diferente multiplicidad de espín. Igual que en la fluorescencia y la fosforescencia, el primer proceso está permitido mientras que el segundo esta prohibido, a menos que el acoplamiento espín-órbita favorezca la mezcla de los estados singlete y triplete dando como resultado que esta transición se encuentre débilmente permitida.



**Figura 1.3** Espectro de absorción y emisión de una especie fotoactiva.

Como ya se ha dicho 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, o lo que es lo mismo, a mayores longitudes de onda. 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 (**Figura 1.3**).

Para que ocurra la fluorescencia, el resto de mecanismos que compiten con ella en la relajación de la molécula deben actuar de forma ineficiente, es decir, 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 se cuantifica 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 ya que este es capaz de inducir cambios en las propiedades ópticas de los cromóforos y fluoróforos.

### **1.2.2. Definición de sensor y dosímetro químico ópticos**

Como hemos visto en la primera parte de la introducción, los sensores químicos se definen como dispositivos que informan de un proceso

químico mediante señales medibles.<sup>5</sup> El término quimiosensor, traducción libre del término ‘*chemosensor*’, ha sido definido como una 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.

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 una detección rápida y a simple vista.
- Requieren una instrumentación sencilla, asequible y económica.
- Métodos de detección no destructivos.
- Utilizan poca cantidad de muestra.
- Las medidas son llevadas a cabo en tiempo real.

Estrictamente hablando, los sensores han de ser reversibles y por ello los dosímetros químicos o sondas moleculares, que son sistemas en los que tiene lugar una reacción química altamente específica y generalmente irreversible, y que se encuentra asociada a un cambio de color o de intensidad de la emisión fluorescente, no lo son. En este proceso, la información que se produce a nivel molecular (como puede ser la presencia o no de un determinado analito) es amplificada a nivel macroscópico.

Los sistemas cromogénicos pueden ser empleados en el desarrollo de sistemas de determinación y detección rápida o en optodos, 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 presentan una elevada especificidad, pues en un sistema donde coexistan varias especies

---

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

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

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

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 media de los estados excitados.

Para el diseño de los sensores químicos se aplican los conceptos de química molecular y supramolecular, según si el proceso de reconocimiento provoca la formación de un enlace covalente o no. Como ya se ha dicho 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 debemos hablar de dosímetros químicos 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, aunque si el analito en cuestión posee propiedades peligrosas como puede ser una elevada toxicidad, lo que en principio era una desventaja se puede convertir en una óptima ventaja, ya que tras la reacción química los productos que se obtienen suelen presentar toxicidades mucho menores.

### **1.2.3. Sensores fluorogénicos.**

La fluorescencia ha sido empleada como una herramienta muy versátil en campos como la química analítica, la bioquímica y la biología celular. 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 también 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 excímeros.
- Por transferencia de energía electrónica (EET).
  - Transferencia de energía de resonancia (FRET).
- Por transferencia de protón en el estado excitado (ESPT)

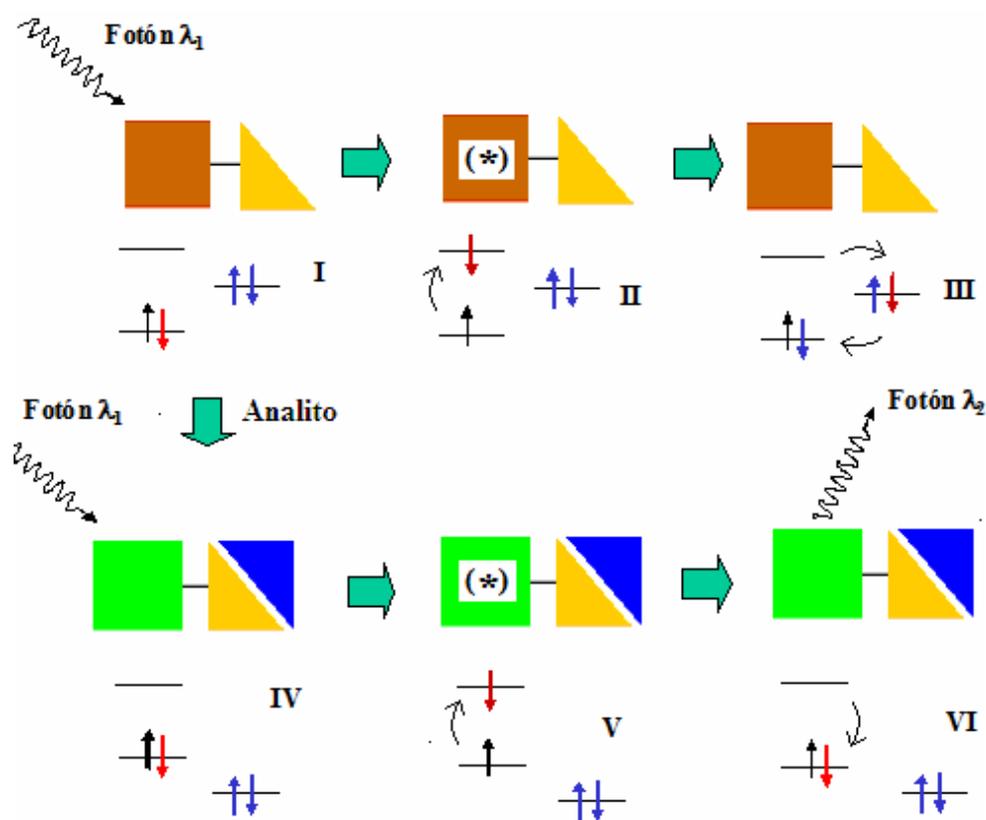
Dado que existen múltiples clasificaciones de los sistemas fluorogénicos encontramos otros autores que dividen los sensores fluorogénicos por el efecto que provoca el reconocimiento molecular del sustrato: efectos de rigidez (observable en mecanismos del tipo MLCT), desplazamiento del disolvente, efecto del átomo pesado, activación de la fluorescencia por formación de complejos (chelation-enhanced fluorescent, CHEF) o desactivación de la fluorescencia por formación de complejos (chelationenhanced quenching, CHEQ), entre otros.

De entre todos los mecanismos de transducción de señal en sensores fluorescentes el más empleado es la transferencia electrónica fotoinducida (Photoinduced Electron Transfer, PET). Se denomina de esta manera a la transferencia electrónica que resulta de un estado electrónico producido por una interacción resonante de la radiación electromagnética con la materia.<sup>9</sup>

---

<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.

<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**.



**Figura 1.4** Esquema del reconocimiento molecular mediante transferencia electrónica.

Este proceso de modulación se representa en la **Figura 1.4**. 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

En el esquema de la **Figura 1.4** 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 éste.

#### 1.2.4. Sensores cromogénicos.

Los cambios de color han sido ampliamente utilizados en procesos de detección, pues requieren el uso de equipos y técnicas sencillas y la detección puede ser realizada incluso “a simple vista”. En la literatura encontramos muchas determinaciones analíticas en donde el último paso es la formación de un compuesto coloreado que es indicativo de la presencia de un determinado analito.<sup>10</sup> Estos métodos colorimétricos han sido extensamente empleados en la detección de iones y especies neutras 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 de energías entre el HOMO y el LUMO correspondan exactamente a la zona visible del espectro, y por ello presentan color. 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 de la banda de absorción, mediante el anclaje de grupos

---

<sup>10</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**.

electrón-dadores ( $\text{NR}_2$ ,  $\text{NHR}$ ,  $\text{NH}_2$ ,  $\text{OH}$ ,  $\text{OMe}$ , etc.) o electrón-aceptores ( $\text{NO}_2$ ,  $\text{HSO}_3^-$ ,  $\text{SO}_3^-$ ,  $\text{COOH}$ ,  $\text{C}=\text{O}$ ,  $\text{CN}$ , 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 se pueden observar varios tipos de transiciones tras excitarlos con luz:

- Transiciones  $d-d$  que involucran un salto electrónico entre orbitales  $d$  del metal.
- Bandas de transferencia de carga metal-ligando (MLCT metal to ligand charge transfer) o ligando-metal (LMCT 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.

En relación a procesos de reconocimiento, la coordinación de ciertos aniones o especies neutras 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 o de la especie neutra.

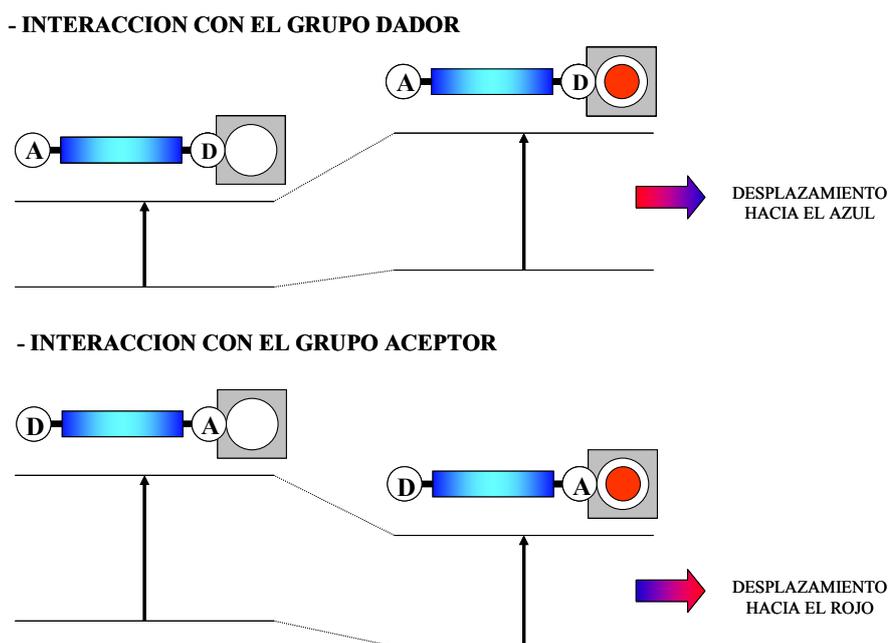
### ***Cromóforos dador-aceptor***

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 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 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.



**Figura 1.5** Desplazamientos espectrales en sensores de transferencia de carga resultantes de la interacción de un catión con un grupo electrón-dador o con un grupo electrón-aceptor.

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 éste es desestabilizado en un menor 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 1.5**).

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>11</sup> Las moléculas que contienen sistemas dador-aceptor tienen una libertad limitada para adaptarse

<sup>11</sup> Z. R. Grabowski, K. Rotkiewicz, *Chem. Rev.*, **2003**, 103, 3899.

a la distribución de densidad electrónica provocada por la transferencia de carga intramolecular.

La mayoría de los colorantes conocidos están basados en este concepto y contienen grupos electrondadores y electronaceptores unidos por puentes insaturados conjugados, que pueden ser cadenas polimetínicas acíclicas o cíclicas, aromáticas, o combinaciones de estas.<sup>12</sup> También en muchos casos encontramos el grupo aceptor y el dador unidos directamente, funcionando como puentes ellos mismos.

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. Se ha descrito, en muchos casos, que esta transición tiene carácter de transferencia de carga.

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.

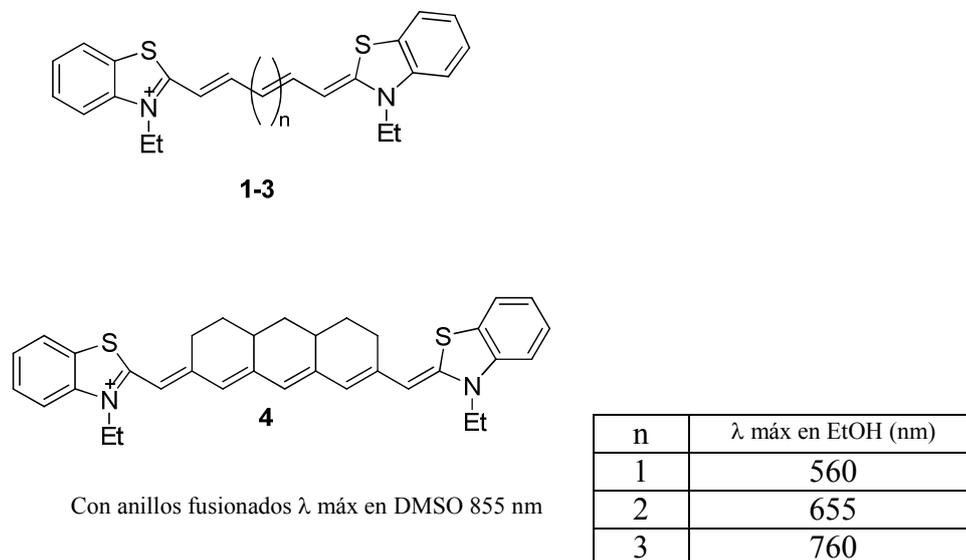
En el diseño de cromóforos dador-aceptor se pueden utilizar diferentes estrategias para optimizar el corrimiento batocrómico, o sea para lograr que la banda de absorción molecular se encuentre desplazada hacia el rojo. Con esto, se intenta asegurar que si la interacción como molécula sensora se produce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

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 átomos de carbonos) la banda de absorción comienza a ser muy ancha y baja su intensidad. Aquí se combinan varios fenómenos: aumenta la probabilidad de que ocurra isomería *cis-trans*, puede haber 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.

---

<sup>12</sup> A.T. Peters, H.S. Freeman, Advances in colour chemistry series. Vol. 3 Moderns Colorants: Synthesis and Structure, Chapman & Hall, 1995.

Una solución eficaz para aumentar la longitud del puente conjugado sin que se presenten estas desventajas es introducir ciclos carbonados, que provocan un aumento en la rigidez del sistema. En la siguiente figura se muestran moléculas (**1-4**) con similitudes estructurales, dónde sólo se han efectuado cambios en el puente conjugado.<sup>13</sup> Es de destacar que la molécula con anillos fusionados en el puente (**4**) es la que presenta la banda más desplazada hacia el rojo.

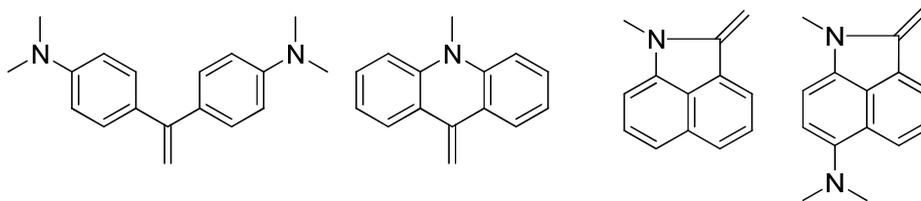


**Figura 1.6** Efecto del aumento en la longitud del puente conjugado y en su rigidez en cromóforos dador-aceptor.

Otras modificaciones estructurales en la cadena conjugada que también pueden ocasionar desplazamientos batocrómicos incluyen la introducción de grupos electrón-dadores o electrón-aceptores en ciertas posiciones. 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 insaturaciones adicionales 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 1.7**.

<sup>13</sup> G. Heilig, W. Lüttke, *Chem. Ber.*, 119, **1986**, 3102.



**Figura 1.7** Grupos con elevado carácter electrón-dador.

Idénticos resultados se pueden obtener con el incremento de la capacidad aceptora del grupo aceptor. Aunque analizando grupos que por separado tienen gran capacidad electrón-aceptora, como el nitro o el trifluorosulfónico, se observa que al ser introducidos en sistemas cromóforos dador-aceptor no producen un desplazamiento batocrómico evidente y la polisustitución con ellos es, en la mayoría de los casos, ineficaz. Por otra parte, el requerimiento estérico que presentan algunos grupos, causa una pérdida en la planaridad de las moléculas, lo que disminuye el efecto espectroscópico esperado. Un 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>14</sup> no es tan alta como la de otros grupos electronaceptores. Así, los sustituyentes neutros electronaceptores más poderosos para diseñar cromóforos dador-aceptor con absorción a altas longitudes de ondas se basan en sistemas policianínicos.

### 1.2.5. Sensores ópticos para la detección de moléculas neutras.

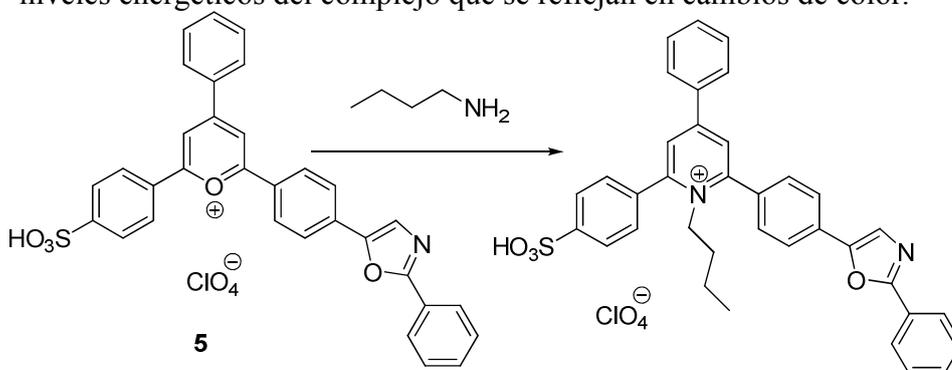
Aunque el número de sensores cromogénicos o fluorogénicos para cationes y aniones es muy abundante,<sup>15</sup> no lo es tanto el de sensores ópticos de especies neutras. Sin embargo en la naturaleza encontramos numerosas moléculas neutras que juegan un papel importante en procesos biológicos y

<sup>14</sup> La Constante de Sustitución de Hammett ( $\sigma$ ) muestra la capacidad electronadora/electronaceptora 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 electronaceptor del grupo en particular. IUPAC Compendium of Chemical Terminology. 2da Edición, **1997**.

<sup>15</sup> (a) F. P. Schmitdchen, M. Berger, *Chem. Rev.*, **1997**, 97, 1609. (b) P. D. Beer, P. A. Gale, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2001**, 40, 486. (c) Ikeda, A.; Shinkai, S. *Chem. Rev.* **1997**, 97, 1713. (d) C. Suksai, T. Tuntulani, *Chem. Soc. Rev.*, **2003**, 32, 192. (e) R. Martínez-Máñez, F. Sancenón, *Coord. Chem. Rev.*, **2006**, 250, 3081. (f) T. Gunnlaugsson, M. Glynn, G. M. Tocci, P. E. Kruger, F. M. Pfeffer, *Coord. Chem. Rev.*, **2006**, 250, 3094.

medioambientales, por ello el diseño de sensores específicos para estas también es un campo de gran interés. Además existen una gran variedad de contaminantes y productos tóxicos de origen antropogénico o natural, como son los agentes neurotóxicos, cuya detección puede ser importante ya que de esta depende la posibilidad de evitar un ataque por parte de grupos terroristas por ejemplo, o de paliar los efectos sobre las personas si se produce una liberación deliberada por parte de dichas organizaciones.

Es difícil conseguir un reconocimiento selectivo de especies neutras mediante la formación de complejos supramoleculares, es decir, sin que se produzca un enlace covalente. La mayor parte de los sensores desarrollados hasta el momento para la detección óptica de compuestos neutros 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. También se han descrito algunos sensores para moléculas neutras mediante reacciones de desplazamiento. En general, estos sensores suelen ser complejos metálicos con ligandos axiales (moléculas de disolvente) que son desplazadas al adicionar la especie neutra. Como consecuencia del desplazamiento se producen cambios en los niveles energéticos del complejo que se reflejan en cambios de color.

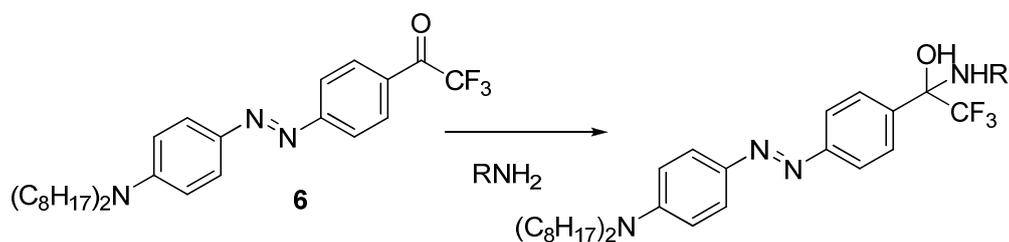


**Figura 1.8** Ejemplo de dosímetro químico cromo-fluorogénico utilizado en la detección de aminas.

Uno de los primeros trabajos publicados empleando el concepto de dosímetro químico para el reconocimiento de moléculas neutras es el de Katritzky y colaboradores en 1984.<sup>16</sup> Estos investigadores desarrollaron un derivado del perchlorato de 2,4,6-trifenilpirilio (**5**) soluble en agua que al reaccionar con la butilamina sufre un cambio en su banda de absorción (se desplaza de 330 a 314 nm). Este desplazamiento viene acompañado de una

<sup>16</sup> A.R. Katritzky, O.A. Schwarz, A.E. Abdel-Rahman, D. E. Leahy, J. Heterocycl. Chem., **1984**, 21, 1673.

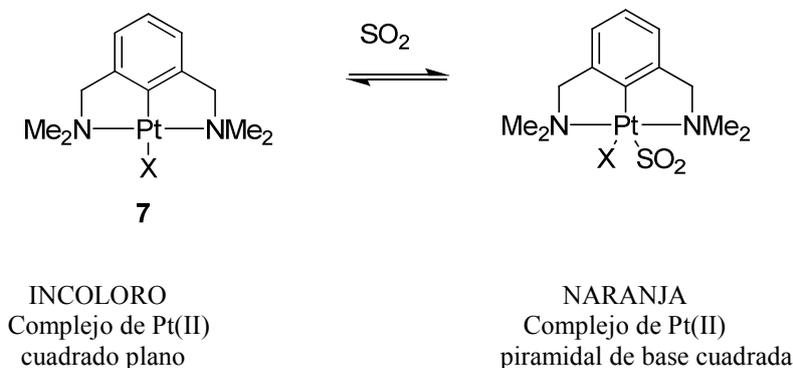
disminución de la intensidad de fluorescencia (395 nm) lo cual permite la determinación de la cantidad de amina en disolución (**Figura 1.8**).



**Figura 1.9.** Uso de derivados colorantes azoicos conteniendo el grupo trifluoracetilo en la detección de moléculas neutras.

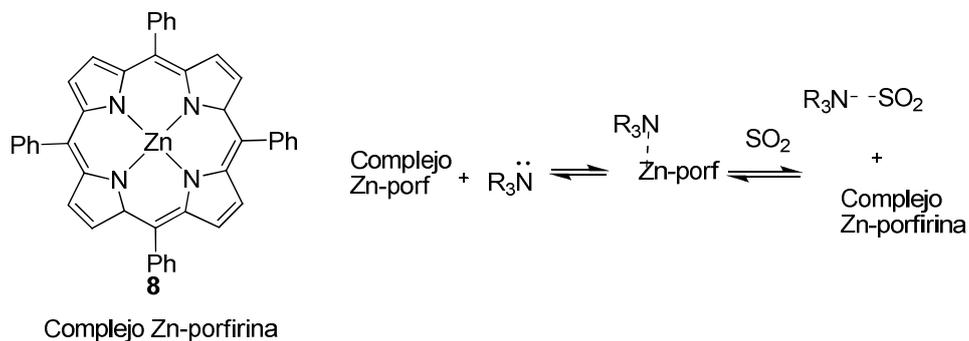
Diversos trabajos publicados por el grupo de G. J. Mohr tienen como objetivo la detección de aminas y de alcoholes.<sup>17</sup> Para ello usan derivados de estilbena y azobenceno funcionalizados con el grupo trifluoracetilo el cual reacciona con las aminas y alcoholes para dar los correspondientes hemiaminales 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 1.9**.

<sup>17</sup> (a) G.J. Mohr, F. Lehmann, U.-W. Grummt, U.E. Spichiger-Keller, *Anal. Chim. Acta*, **1997**, 344, 215. (b) G.J. Mohr, D. Citterio, U.E. Spichiger, *Sens. Actuators B*, **1998**, 49, 226. (c) G.J. Mohr, *Anal. Chim. Acta*, **2004**, 508, 233. (d) G.J. Mohr, M. Wenzel, F. Lehmann, P. Czerney, *Anal. Bioanal. Chem.* **2002**, 374, 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*, **1997**, 351, 189. (g) G.J. Mohr, U.E. Spichiger, *Mikrochim. Acta*, **1998**, 130, 29. (h) G.J. Mohr, T. Nezel, U.E. Spichiger, *Anal. Chim. Acta*, **2000**, 414, 181.



**Figura 1.10** Detección óptica de dióxido de azufre.

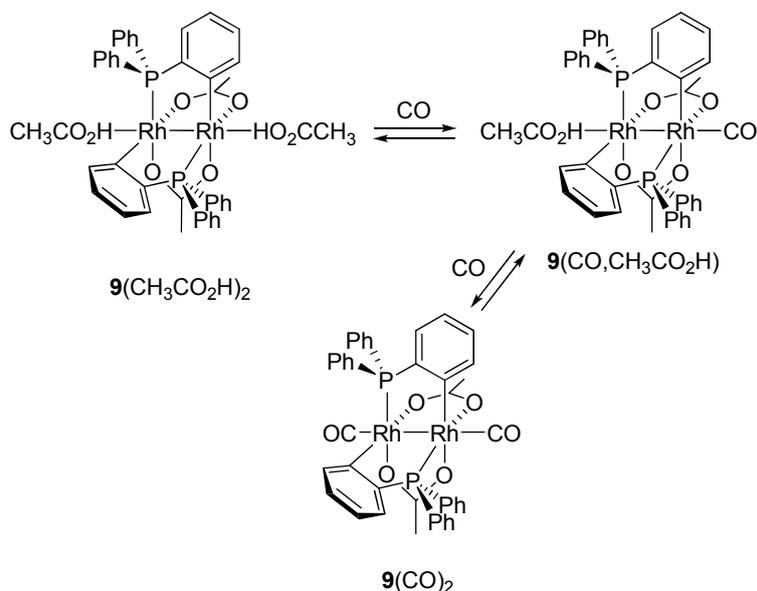
A pesar de las características de los gases que hacen difícil su reconocimiento (moléculas neutras con interacciones electrostáticas poco efectivas, pequeño tamaño, dificultades técnicas en su manejo, polarizabilidad limitada) se han desarrollado sensores ópticos para algunos de ellos. Así podríamos citar la detección de dióxido de azufre estudiada por Koten y colaboradores.<sup>18</sup> El SO<sub>2</sub> reacciona con complejos incoloros de Pt(II) como **7** para dar lugar a aductos de color naranja. La reacción es reversible y la transducción de la señal se realiza de forma instantánea (**Figura 1.10**). Una ventaja adicional de este complejo es que se puede utilizar tanto en disolventes apolares como en estado sólido, por lo que se puede emplear en el desarrollo de dispositivos optoelectrónicos para aplicaciones biomédicas y almacenamiento de SO<sub>2</sub>.



**Figura 1.11** Sensor de SO<sub>2</sub> por desplazamiento.

<sup>18</sup> (a) M. Albrecht, G. Rodríguez, J. Schoenmaker, G. van Koten, *Org. Lett.*, **2000**, *22*, 3461. (b) M. Albrecht, R. A. Gossage, M. Lutz, A. L. Spek, G. van Koten, *Chem. Eur. J.*, **2000**, *6*, 1431.

El complejo de Zn-tetrafenilporfirina (**8**) que se muestra en la **Figura 1.11** ha sido empleado en ensayos de desplazamiento, aprovechando la capacidad de éste de interactuar con aminas cambiando de color de rojo a verde.<sup>19</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 un cambio de color de verde a rojo. 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).



**Figura 1.12** Sensor de CO por desplazamiento empleando un complejo dinuclear de rodio.

Muy recientemente se ha descrito un complejo dinuclear de rodio para el reconocimiento colorimétrico de CO mediante un ensayo de desplazamiento (**Figura 1.12**).<sup>20</sup> Este complejo dinuclear de rodio está compuesto por dos fosfinas aromáticas y tiene dos moléculas de ácido acético coordinadas sobre cada átomo de rodio. Este complejo se adsorbió en un soporte silíceo y el material presentó una banda en el visible centrada a 550 nm (color morado). Al adicionar CO se sustituye una molécula de ácido acético por otra del este gas cambiando el color del sólido de morado a salmón (banda en el visible centrada a 480 nm). Un exceso de CO induce la sustitución de la segunda molécula de ácido acético y el sólido se vuelve

<sup>19</sup> A. V. Leontiev, D. M. Rudkevich, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 14126.

<sup>20</sup> J. Esteban, R. Martínez-Mañez, M. D. Marcos, M. Moragues, J. Soto, F. Sancenón, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, 49, 4934.

amarillo (banda centrada a 415 nm). La respuesta es muy selectiva por que solamente la presencia de NO<sub>2</sub> y NO (en cantidades próximas a las 2000 ppm) son capaces de dar falsos positivos.

### ***1.3. Agentes de Guerra Química***

El incremento actual de la preocupación internacional por la posibilidad de que se produzcan ataques terroristas con agentes de guerra química (Chemical Warfare Agents, CWA) ha traído consigo la necesidad de una detección fiable y asequible de estas sustancias tóxicas. Según la Organización para la Prohibición de Armas Químicas (Organization for the Prohibition of Chemical Weapons, OPCW) y la Convención sobre Armas Químicas, estas sustancias son consideradas armas químicas si, a través de un "efecto químico en los procesos biológicos, puede causar la muerte, pérdida temporal de rendimiento o lesiones permanentes a las personas o los animales".<sup>21</sup>

Estas sustancias deben ser capaces de ser almacenadas durante largos períodos de tiempo en contenedores sin degradación y sin corrosión del material de embalaje. Deben ser relativamente resistentes al agua, al aire y al calor de manera que no pierdan su capacidad cuando sean dispersadas.<sup>21</sup> Como ya se ha mencionado las armas químicas son armas que utilizan las propiedades tóxicas de sustancias químicas para matar, herir o incapacitar al enemigo.

El armamento químico se diferencia de las armas convencionales o armas nucleares porque sus efectos destructivos no se deben principalmente a una fuerza explosiva. El uso ofensivo de organismos vivos como el ántrax es considerado un arma biológica más que arma química mientras que productos tóxicos producidos por organismos vivos (Ej. toxinas como la toxina botulínica, ricina o saxitoxina) son considerados armas químicas. Según la Convención sobre Armas Químicas de 1993, se considera arma química a cualquier sustancia química tóxica, sin importar su origen, con la excepción de que sean utilizados con propósitos permitidos, como es el caso del uso de agentes lacrimógenos por parte de las fuerzas de seguridad. Las armas químicas están clasificadas como armas de destrucción masiva por la Organización de las Naciones Unidas y su producción y almacenamiento está proscrita por la ya mencionada convención de 1993. Las armas químicas han sido usadas en muchas partes del mundo durante cientos de

---

<sup>21</sup> Organization for the Prohibition of Chemical Weapons. Convention on the prohibition of the development, production, stockpiling and use of chemical weapons and on their destruction. See: [www.opcw.nl](http://www.opcw.nl).

años pero la «moderna» guerra química comenzó durante la Primera Guerra Mundial, aunque el primer país de la historia en usar masivamente estas armas contra población civil fue España en 1925 durante la guerra del Rif, empleando en sus ataques el gas mostaza, mediante proyectiles de artillería o bombardeos aéreos.

Durante la Primera Guerra Mundial inicialmente sólo se usaban productos químicos comerciales y sus variantes. Esto incluía el cloro y el gas fosgeno. Los métodos de dispersión de estos agentes durante el combate eran relativamente poco precisos e ineficientes. El primer país en utilizar las armas químicas durante esta contienda fue Francia con el empleo de granadas rellenas de gas lacrimógeno (bromuro de xililo) en agosto de 1914.

Posteriormente el Imperio alemán respondió perfeccionando la técnica, iniciando el uso a gran escala de gases letales por ambos bandos. En los comienzos simplemente se abría los recipientes de cloro a favor del viento y se dejaba que éste lo transportara hasta las filas enemigas. Poco después, los franceses modificaron su munición de artillería para contener fosgeno, un procedimiento mucho más efectivo que se convirtió en el principal método para emplear estas armas.

Desde el desarrollo de la moderna guerra química en la Primera Guerra Mundial, las naciones han investigado y desarrollado estas armas en cuatro campos principalmente: nuevos y más mortales agentes; métodos más eficientes de lanzar estos agentes hasta el objetivo (diseminación); defensas más efectivas contra las armas químicas; y medios más precisos para detectar los agentes químicos.

Un producto químico usado para la guerra se llama «agente de guerra química» (CWA), y habitualmente es gaseoso a temperatura ambiente, o puede ser un líquido que se evapora rápidamente. Estos líquidos volátiles pueden tener una alta presión de vapor. Los vapores resultantes son tóxicos, y de ahí el término «gas venenoso», empleado para describir un arma química usada en forma gaseosa. Muchos agentes químicos fueron diseñados para que en condiciones normales estuviesen en fase gas con el fin de lograr una mejor dispersión en una gran área rápidamente.

El primer objetivo de la investigación sobre agentes químicos no era la letalidad, sino el desarrollo de agentes que pudieran afectar a la piel a través de la ropa, haciendo inútiles las máscaras de gas. En julio de 1917, los alemanes emplearon por primera vez al gas mostaza, el primer agente que, a pesar de la máscara de gas, penetraba el cuero y la tela para infligir dolorosas quemaduras en la piel.

Las armas químicas se pueden clasificar de acuerdo a su persistencia, una medida del tiempo en que el agente químico permanece activo tras la diseminación. Los agentes químicos se dividen entre persistentes y no persistentes. Los agentes clasificados como no persistentes pierden

efectividad tras unos minutos u horas. Los agentes puramente gaseosos como el cloro son no persistentes, como tampoco los altamente volátiles como el sarín y muchos otros agentes nerviosos. Tácticamente, los agentes no persistentes son mucho más útiles contra objetivos que deben ser tomados y controlados en poco tiempo. En general, los agentes no persistentes presentan sólo peligro por inhalación. En contraste con los primeros, los agentes persistentes tienden a permanecer en el entorno por periodos más largos, como una semana, complicando la descontaminación. La defensa contra los agentes persistentes requiere protección para largos periodos. Los agentes líquidos no volátiles como el agente nervioso oleaginoso VX no se evaporan fácilmente, y por lo tanto, presentan gran peligro al contacto.

Existen, al menos y sin incluir las proteínas citotóxicas, seis tipos de agentes (ver **Tabla 1.3** en la página siguiente).<sup>22</sup>

\* Agentes lacrimógenos o también denominados actualmente como agentes de antidisturbios o antimotines.

\* Agentes vesicantes o que causan ampollas, tales como el gas mostaza.

\* Agentes incapacitantes, tales como BZ (bencilato de quinuclidinilo).

\* Agentes sanguíneos, tal como el ácido cianhídrico.

\* Agentes pulmonares, como el fosgeno.

\* Agentes que atacan el sistema nervioso, tales como GA (Tabún), GB (Sarín), GD (Somán), GF (Ciclosarín) y VX (O-etil S-diisopropilaminoetil metilfosfonotiolato).

La mayoría de las armas químicas reciben una designación por la OTAN que contiene de una a tres letras, además o en lugar de su nombre común. Las armas químicas binarias, en las que las sustancias precursoras de agentes de armas químicas son mezcladas automáticamente para producir el agente justo antes de su uso, son indicados con un "-2" detrás de la designación (por ejemplo, GB-2 y VX-2). Las armas binarias consisten en un par de dispositivos que se insertan dentro de un misil, llevando en ellos las materias primas para sintetizar el compuesto químico tóxico, separadas por una membrana relativamente frágil. Así, se evitan accidentes al manipular piezas de artillería llenas con el arma terminada. Al ser disparada ésta, el empuje rompe la membrana de separación permitiendo la mezcla de las materias primas, y el giro proporciona un medio de agitación. La reacción se completa en menos de un minuto, con una conversión casi siempre superior al 95% de manera que cuando el misil llega a su objetivo, el arma química está lista para actuar. Este sistema se puede utilizar con Tabún, Sarín y VX.

---

<sup>22</sup> W. S. Angerson, *Chemical and Biological Warfare Agents*, RAND Reports, 2000, vol. 5; D. R. Walt and D. R. Franz, *Anal. Chem.* 72, **2000**, 738A.

**Tabla 1.3** Clasificación de los agentes de guerra química.

Clase de agente	Ejemplos	Síntomas	Efectos	Velocidad de acción	Persistencia
<b>Agentes nerviosos</b>	Sarín, Somán, Tabún, VX	Dificultad para respirar, sudoración, convulsiones.	Inhibe la hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina. Provocan la muerte.	Vapores: De segundos a minutos	El VX es persistente y peligroso al contacto. Otros agentes no son persistentes y principalmente son peligrosos por inhalación.
<b>Agentes pulmonares</b>	Fosgeno	Dificulta la respiración; Efecto lacrimógeno.	Daña e inunda el sistema respiratorio provocando asfixia	De inmediata a 3 horas	No persistente y peligroso por inhalación.
<b>Agentes sanguíneos</b>	Ácido cianhídrico	Respiración rápida, convulsiones y coma.	Evita el uso normal de oxígeno por los tejidos corporales de manera que los órganos vitales dejan de funcionar.	Acción inmediata	No persistentes. Peligrosos por inhalación.
<b>Agentes vesicantes</b>	Gas mostaza, lewisita	Quemazón de ojos y piel	Agudo dolor de quemazón, conjuntivitis, grandes ampollas llenas de líquido en la piel	Vapores: 4 a 6 horas, los ojos y los pulmones quedan afectados más rápidamente	Persistente y peligroso por contacto. Usado para incapacitar más que para matar colapsando las instalaciones médicas
<b>Agentes discapacitantes o paralizantes</b>	BZ (bencilato de quinclidinilo)	Confusión, fabulación no voluntaria, alucinaciones.	Disminuye el efecto de la acetilcolina. Provoca efectos en el sistema nervioso periférico.	Inhalados: 30 min a 20 horas; Piel: hasta 36 horas después de la exposición de la piel al BZ.	Extremadamente persistente en suelo y agua y encima de la mayoría de las superficies; peligroso por contacto.
<b>Agentes lacrimógenos</b>	Gas pimienta, cloroacetofenona (CN), CS	Fuerte irritación de los ojos.	Provoca un dolor punzante agudo en los ojos y ceguera temporal.	Inmediata	No persistente y peligroso por inhalación.

**Tabla 1.4** Toxicidad para el ser humano de los agentes nervioso mas importantes.

<b>Agente nervioso</b>	<b>LCt50<sup>(a)</sup> Inhalación mg min/m<sup>3</sup></b>	<b>LD50<sup>(b)</sup> Piel mg/individuo</b>
<b>Tabún</b>	200	4000
<b>Sarín</b>	100	1700
<b>Somán</b>	100	300
<b>Agentes V</b>	50	10

<sup>(a)</sup> Concentración letal de una sustancia por unidad de tiempo para la mitad de un conjunto de animales de prueba.

<sup>(b)</sup> Dosis de una sustancia o radiación que resulta mortal para la mitad de un conjunto de animales de prueba

De todos los agentes de guerra química que aparecen en la **Tabla 1.3** los agentes nerviosos son los más peligrosos (véase **Tabla 1.4**).<sup>23</sup>

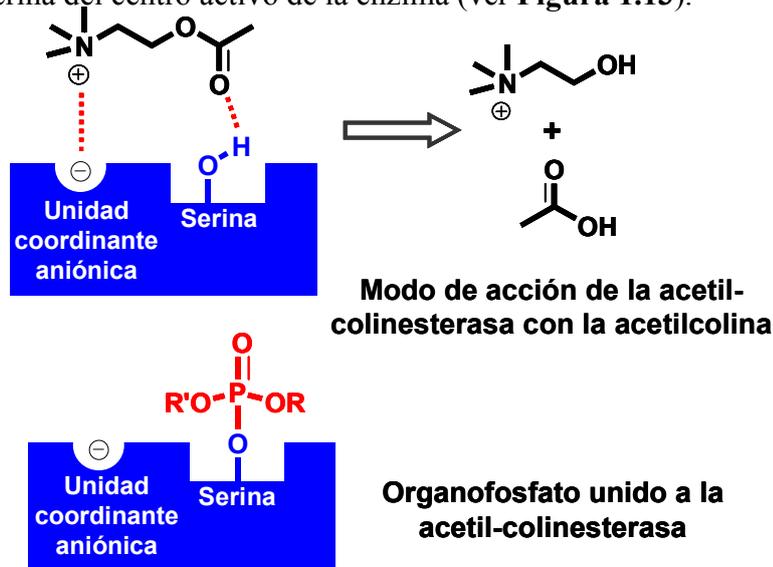
Los agentes nerviosos son una familia altamente tóxica, estructuralmente relacionada con la gran familia de los compuestos organofosforados. De hecho, el desarrollo de agentes nerviosos fue un subproducto de la investigación y el desarrollo de insecticidas. No fue hasta la década de 1930 que los químicos alemanes observaron que los compuestos organofosforados podrían ser tóxicos y la primera producción de agentes de tipo G se desarrolló durante la Segunda Guerra Mundial: Tabún (Dimetilamino-cianofosfato de etilo, GA), Sarín (Metilfluorofosfonato de isopropilo, GB), Somán (Metilfluorofosfonato de pinacolina, GD) y Ciclosarín (Metilfluorofosfonato de ciclohexilo GF). Inmediatamente después de la guerra, la investigación se centró en el descubrimiento de nuevos tipos de agentes nerviosos, es decir, los agentes de tipo V (VG, VM, VX, VE), que son aproximadamente diez veces más venenosos que el Sarín.

Los agentes nerviosos tienen efectos rápidos y severos en la salud humana y animal, ya sea en forma de gas, aerosol o líquido. Entran en el organismo por inhalación o a través de la piel. El envenenamiento también puede producirse por el consumo de líquidos o alimentos contaminados con estos agentes. Los efectos de los agentes nerviosos se deben principalmente a su capacidad de inhibir la acción de la acetilcolinesterasa, una enzima

---

<sup>23</sup> O. A. Sadik, W. H. Land, Jr. and J. Wang, *Electroanalysis*, **2003**, 15, 1149.

crítica del sistema nervioso central,<sup>24</sup> a través de la modificación del residuo de serina del centro activo de la enzima (ver **Figura 1.13**).<sup>25</sup>



**Figura 1.13** Mecanismo de inhibición de la acetilcolinesterasa por parte de los agentes neurotóxicos.

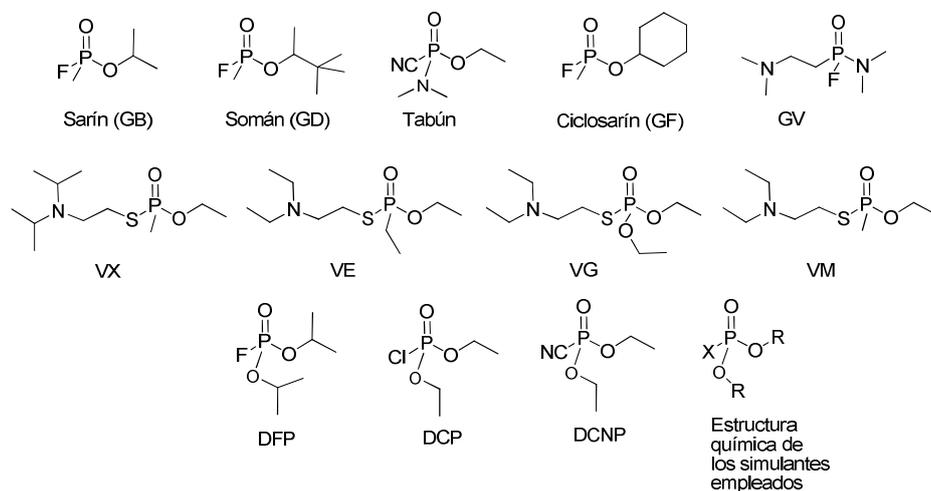
Dado que la función normal de esta enzima es hidrolizar el neurotransmisor acetilcolina cuando es liberada, su inhibición provoca un aumento excesivo de la concentración de acetilcolina y la acumulación en varios sitios de acción, como el cuerpo ciliar, el árbol bronquial, el tracto gastrointestinal, la vejiga y los vasos sanguíneos, el músculo cardíaco y las terminaciones nerviosas del sistema nervioso simpático lo que conduce a la parálisis neuromuscular y con el tiempo a la muerte.<sup>26,27</sup> La secuencia de los síntomas varía según la vía de exposición. Mientras que los síntomas respiratorios son generalmente los primeros en aparecer después de la inhalación del vapor del agente nervioso, los síntomas gastrointestinales suelen ser los primeros después de la ingestión. La inhibición de la acetilcolinesterasa es un proceso progresivo y el grado de inhibición depende no sólo de la concentración del agente nervioso, sino también del tiempo de exposición.

<sup>24</sup> S. M. Somani, *Chemical Warfare Agents*, Academic Press, San Diego, **1992**.

<sup>25</sup> M. Ehrlich, *Encyclopedia of Toxicology*, ed. P. Wexler, Academic Press, San Diego, CA, **1998**, p. 467.

<sup>26</sup> T. C. Marrs, *Pharmacol. Ther.*, **1993**, 58, 51.

<sup>27</sup> F. R. Sidell and J. Borak, *Ann. Emerg. Med.*, **1992**, 21, 865.



**Figura 1.14** Estructura química de agentes nerviosos de tipo G, de tipo V y de los simulantes mas empleados.

La principal diferencia entre los agentes de tipo G (Tabún, Sarín, Somán y Ciclosarín) y los agentes de tipo V radica en que los primeros no son persistentes mientras que los segundos sí que lo son. El término agente persistente, como ya se ha dicho con anterioridad, se refiere generalmente a los agentes que no se hidrolizan rápidamente y no son muy volátiles por lo que son capaces de permanecer en una zona durante un largo periodo de tiempo. Los compuestos relacionados diisopropilfluorofosfato (DFP), dietilclorofosfato (DCP) y dietilcianofosfonato (DCNP) han sido ampliamente utilizados como compuestos modelo o simulantes para el diseño de indicadores o sondas colorimétricas (véase la **Fig. 1.14**). Sin embargo, hay que tener en cuenta que no son viables como agentes nerviosos porque se hidrolizan rápidamente (poco persistentes).

Las reacciones químicas más importantes de los agentes nerviosos implican directamente al átomo de fósforo. El enlace P-X se rompe fácilmente y en pocos minutos por reactivos nucleófilos, como el agua o el anión hidroxilo, cuando el sustituyente X es un halógeno o CN como es el caso de los simulantes empleados o los agentes de tipo G.<sup>28</sup> En solución acuosa a pH neutro los agentes nerviosos de tipo G se descomponen lentamente, mientras que la reacción es muy rápida después de la adición de una base. El producto resultante es un fosfato no tóxico.<sup>29</sup> Por el contrario

<sup>28</sup>Yang, Y. C.; Berg, F. J.; Szafraniec, L. L.; Beaudry, W. T.; Bunton, C. A.; Kumar, A. *J.Chem. Soc., Perkin Trans.*, **1997**, 2, 607.

<sup>29</sup> Nerve Agents, A FOA Briefing Book on Chemical Weapons, 1992, (from [www.fas.org/cw/cwagents](http://www.fas.org/cw/cwagents)).

cuando X es un tiolato la reacción ocurre lentamente y es necesario utilizar aniones como el hidroperoxilo (HOO<sup>-</sup>) para su degradación.<sup>30</sup>

La facilidad de producción, la toxicidad extrema de los agentes nerviosos organofosforados, y su fácil empleo en ataques terroristas como el llevado a cabo en 1995 por el grupo Aum Shinrikyo (Verdad Suprema) liderado por Shoko Asahara en el metro de Tokio que causó miles de heridos y 12 muertes,<sup>31</sup> y los ataques acaecidos contra las comunidades kurdas en Irak,<sup>32</sup> subraya la necesidad de desarrollar sistemas precisos para detectar estas sustancias químicas. Como consecuencia de ello, se han producido intensos esfuerzos de investigación para desarrollar sistemas sensibles y selectivos para la detección de estos compuestos.<sup>33</sup> Se ha desarrollado una amplia variedad de métodos de detección de agentes de guerra química que incluyen dispositivos de ondas acústicas superficiales (SAW),<sup>34</sup> ensayos enzimáticos,<sup>35</sup> métodos electroquímicos,<sup>36</sup> interferometría,<sup>37</sup> cromatografía de gases-espectroscopía de masas,<sup>38</sup> etc. Sin embargo, todos estos métodos presentan al menos una de las siguientes limitaciones: bajas respuestas, falta de especificidad, selectividad limitada,

---

<sup>30</sup>(a) Yang, Y. C.; Szafraniec, L. L.; Beaudry, W. T.; Bunton, C. A. *J. Org. Chem.*, **1993**, 58, 6964. (b) Yang, Y. C.; Szafraniec, L. L.; Beaudry, W. T.; Rohrbaugh, D. K. *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, 112, 6621. (c) Wagner, G. W.; Yang, Y. C. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2002**, 41, 1925. (d) A. M. McAnoy, J. Williams, M. R. L. Paine, M. L. Rogers, S. J. Blanksby, *J. Org. Chem.*, **2009**, 74, 9319.

<sup>31</sup> a) E. Crodry, *Jane's Intelligence Rev.* **1995**, 7, 520. b) H. Nozaki, N. Aikawa, *Lancet* **1995**, 345, 1446. c) T. Suzuki, H. Morita, K. Ono, K. Maekawa, R. Nagai, Y. Yazaki, *Lancet* **1995**, 345, 980.

<sup>32</sup> R. M. Black, R. J. Clarke, R. W. Read, M. T. J. Reid, *J. Chromatogr. A* **1994**, 662, 301.

<sup>33</sup> H. H. Hill, Jr. and S. J. Martin, *Pure Appl. Chem.*, **2002**, 74, 2281; L. M. Eubanks, T. J. Dickerson and K. D. Janda, *Chem. Soc. Rev.*, **2007**, 36, 458.

<sup>34</sup> M. S. Nieuwenhuizen and J. L. N. Harteveld, *Sens. Actuators, B*, **1997**, 40, 167; J. Negeh-Ngwainbi, P. H. Foley, S. S. Kuan and G. G. Guilbault, *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**, 108, 5444; Y. Yang, H.-F. Hi and T. Thundat, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 1124; C. Hartmann-Thompson, J. Hu, S. N. Kaganove, S. E. Keinath, D. L. Keeley and P. R. Dvornic, *Chem. Mater.*, **2004**, 16, 5357.

<sup>35</sup> A. J. Russel, J. A. Berberich, G. F. Drevon and R. R. Koepsel, *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, **2003**, 5, 1; M. Wheelis, *Pure Appl. Chem.*, **2002**, 74, 2247.

<sup>36</sup> Y. Lin, F. Lu and J. Wang, *Electroanalysis*, **2004**, 16, 145; Y. Zhou, B. Yu, E. Shiu and K. Levon, *Anal. Chem.*, **2004**, 76, 2689; D. Yu, J. Volponi, S. Chhabra, C. J. Brinker, A. Mulchandani and A. K. Singh, *Biosens. Bioelectron.*, **2005**, 20, 1433; K. Anitha, S. V. Mohan and S. J. Reddy, *Biosens. Bioelectron.*, **2004**, 19, 848; A. L. Simonian, J. K. Grimsley, A. W. Flounders, J. S. Schoeniger, C. T. Cheng, J. J. DeFrank and J. R. Wild, *Anal. Chim. Acta*, **2001**, 442, 15; M. H. Hammond, K. J. Johnson, S. L. Rose-Pehrsson, J. Ziegler, H. Walker, K. Coudy, D. Gary and D. Tillett, *Sens. Actuators, B*, **2006**, 116, 135; J. Wang, *Anal. Chim. Acta*, **2004**, 507, 3.

<sup>37</sup> H. Sohn, S. Letant, M. J. Sailor and W. C. Troglor, *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, 122, 5399.

<sup>38</sup> W. E. Steiner, S. J. Klopsch, W. A. English, B. H. Clowers and H. H. Hill, *Anal. Chem.*, **2005**, 77, 4792.

baja sensibilidad, complejidad operacional, no son portátiles, presentan dificultades para la lectura en tiempo real y pueden dar falsos positivos.

Una alternativa a los métodos clásicos es el diseño de reactivos o sensores químicos cromogénicos o fluorogénicos. De hecho, uno de los medios más convenientes y simples de detección de sustancias químicas es la generación de una señal óptica, es decir, cambios en las bandas de absorción o de emisión en presencia de los analitos. Las señales ópticas han sido ampliamente utilizadas en los últimos años para el desarrollo de sensores químicos de iones y el reconocimiento y detección de moléculas neutras basada en conceptos de química molecular (si se forma un enlace covalente) y supramolecular (si el enlace no es covalente).<sup>39</sup> Además, la detección óptica (sobre todo la detección colorimétrica) requiere una instrumentación por lo general económica y extensamente usada y ofrece la posibilidad de detección “a simple vista” para una determinación rápida y semicuantitativa.

En la actualidad se utilizan varios métodos para la detección colorimétrica de agentes nerviosos (como los test M8, M9, etc utilizados por las fuerzas armadas de los Estados Unidos) tanto en fase líquida como en fase gas basados en el uso de diferentes colorantes simples y ensayos enzimáticos, junto con indicadores colorimétricos de pH. Aunque se trata de sistemas que muestran ciertas limitaciones, tales como los falsos positivos. Adicionalmente a estos sistemas, los últimos ejemplos publicados sugieren que la aplicación de conceptos cromo-fluorogénicos supramoleculares para la detección visual de agentes nerviosos es un área de interés creciente que permite el desarrollo de sistemas sensores capaces de superar alguna de las limitaciones que presentan los métodos clásicos de análisis.<sup>40</sup>

---

<sup>39</sup> R. Martínez-Máñez and F. Sancenón, *Chem. Rev.*, **2003**, 103, 4419; A. P. de Silva, H. Q. N. Gunaratne, T. Gunnlaugsson, A. J. M. Huxley, C. P. McCoy, J. T. Rademacher and T. E. Rice, *Chem. Rev.*, **1997**, 97, 1515.

<sup>40</sup> S. Royo, R. Martínez-Máñez, F. Sancenón, A. M. Costero, M. Parra and S. Gil, *Chem. Commun.*, **2007**, 4839.

#### ***1.4. Detección cromo-fluorogénica de agentes nerviosos.***

Las sondas colorimétricas para la detección de agentes nerviosos fueron descritas por primera vez por Schönemann en 1944.<sup>41</sup> El método fue estudiado con más profundidad por Gehauf y colaboradores y se basa en la oxidación de ciertas aminas para dar productos coloreados en presencia de varios compuestos organofosforados.<sup>42</sup> La adición de compuestos organofosforados a disoluciones acuosas de perborato de sodio a pH 10 que contienen una amina aromática (bencidina, *o*-toluidina, *o*-dianisidina, *o*-fenilendiamina, 4-amino-2-acetamido-*N*-dietilanilina, ácido 4-amino-2'-etoxidifenilamina-2-sulfónico, 4,4'-diaminodifenilurea y 4,4'-diaminoestilbeno) inducía la formación de colorantes de color amarillo a naranja. El mecanismo se basa en la formación de un perácido derivado de los compuestos organofosforados que induce la oxidación de la amina. La prueba se empleó para detectar pequeñas cantidades de Sarín, Tabún, DFP y otros compuestos relacionados. En 1957 los mismos autores desarrollaron un ensayo similar para la detección de agentes nerviosos (Sarín, Somán y Tabún) por medio de medidas de fluorescencia.<sup>43</sup> Una mezcla de indol y perborato de sodio (1: 2) en una mezcla de agua-acetona (1: 1, v / v) con el pH fijado a 9,5 presentó una fluorescencia significativa con un color amarillo pálido. Después de la adición de cantidades crecientes de Sarín apareció una fluorescencia verde brillante (banda de emisión centrada en el intervalo 460-490 nm), debido a la oxidación del indol a indoxilo. La intensidad de la banda de emisión se relacionó directamente con la cantidad de Sarín agregado. Así, este método puede ser utilizado para la detección y estimación de pequeñas cantidades de agentes nerviosos.

Sin embargo estos estudios son raros y el desarrollo de sensores y reactivos cromo-fluorogénicos para la detección de agentes nerviosos ha sido escaso. Sólo muy recientemente se han empezado a desarrollar sensores para una posible detección visual de los agentes nerviosos debido, principalmente, a un posible uso de estas especies químicas por organizaciones terroristas. Los sensores y reactivos químicos que se

---

<sup>41</sup> R. B. R. Schönemann, New Reaction for Detection of Metalloid–Non-metal Labile Halogen Linkages, (transl. C. L. Wheeler), Office of Publication Board, US Dept. of Commerce, PB119887, August 1944.

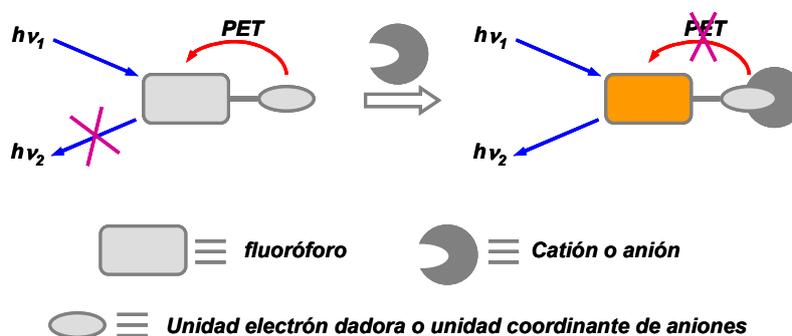
<sup>42</sup> B. Gehauf, J. Epstein, G. B. Wilson, B. Witten, S. Sass, V. E. Bauer and W. H. C. Rueggeberg, *Anal. Chem.*, **1957**, 29, 278.

<sup>43</sup> B. Gehauf and J. Goldenson, *Anal. Chem.*, **1957**, 29, 276.

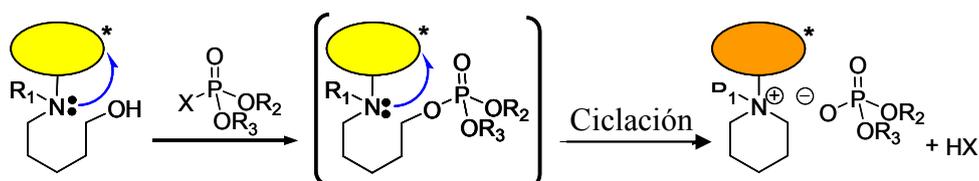
describen a continuación son conceptualmente más sofisticados que las sondas que se describieron hace ya más de cincuenta años y están, de alguna manera, inspirados en los conceptos aplicados recientemente en el desarrollo de sensores químicos cromo-fluorogénicos para distintos analitos.

#### 1.4.1. Reactivos fluorescentes basados en procesos PET

Los procesos de transferencia electrónica fotoinducida (PET) han sido ampliamente utilizados en el desarrollo de sensores químicos fluorescentes para la detección de cationes y aniones y, recientemente, los mismos principios se han aplicado a la detección de agentes nerviosos y sus simulantes. La facilidad en la modulación de la intensidad de emisión por la funcionalización de un fluoróforo con unidades coordinantes adecuadas ha dado lugar a la síntesis de muchísimos receptores durante los últimos diez años. Un esquema de cómo los procesos PET se pueden utilizar para la detección fluorogénica de distintos analitos se muestra en la **Figura 1.15**.

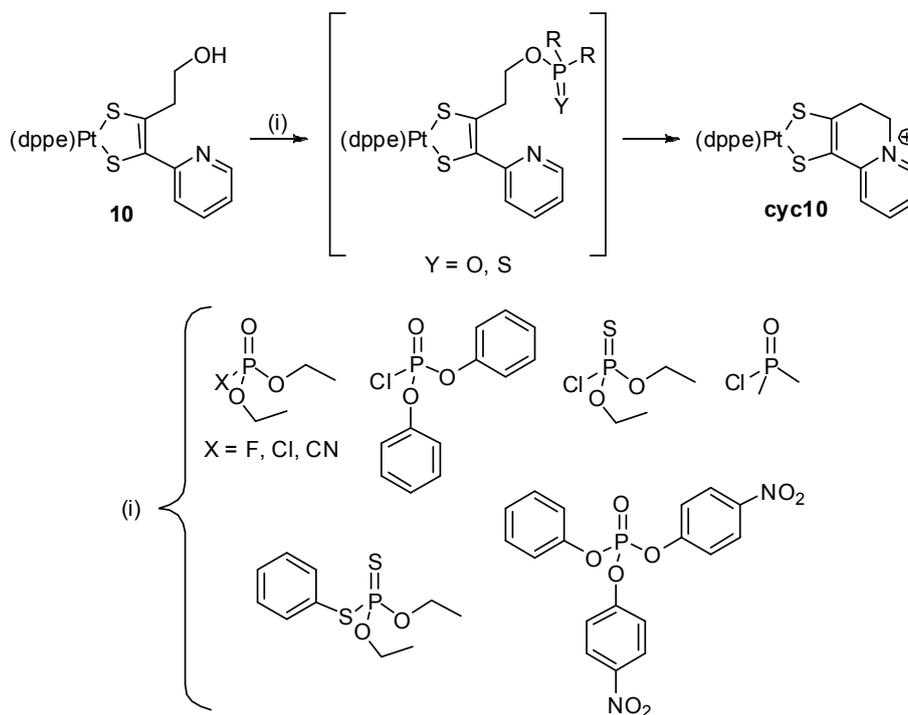


**Figura 1.15** Esquema del empleo de los procesos PET para la detección fluorogénica de analitos.



**Figura 1.16** Esquema general de una molécula indicadora para la detección fluorimétrica de agentes nerviosos basados en procesos PET.

Los procesos de transferencia electrónica fotoinducida (PET) han sido aplicados con éxito en el diseño de sensores fluorescentes para la detección de DFP, DCP y ciertos fosfatos. La estructura química de estos sensores está caracterizada por la presencia de una estructura rígida funcionalizada con dos subunidades. Una de las unidades posee un grupo nucleofílico muy reactivo (un grupo hidroxilo) frente a fosfatos o fosfonatos que contengan un buen grupo saliente, mientras que la otra unidad es una amina terciaria conectada con un fluoróforo mediante varios grupos metileno (**Figura 1.16**). Como consecuencia de este diseño la emisión del fluoróforo se desactiva, a través de un proceso PET entre el par electrónico solitario de la amina terciaria y el fluoróforo excitado. Al añadir el fosfonato o fosfato se produce una reacción de fosforilación con el alcohol. Esta fosforilación induce una N-alquilación intramolecular que da lugar a la formación de una sal de amonio cuaternario. Esta cuaternización inhibe el proceso PET restaurándose la emisión del fluoróforo.

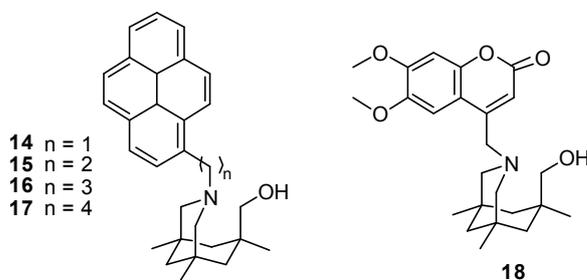


**Figura 1.17** Estructura química de un complejo de platino 1,2-enditiolato funcionalizado con un alcohol que ha sido empleado para la detección fluorescente de algunos fosfatos, tiofosfatos y ésteres de fosfinato.

El primer ejemplo de un reactivo basado en esta aproximación fue desarrollado por Pilato y colaboradores utilizando un complejo de platino



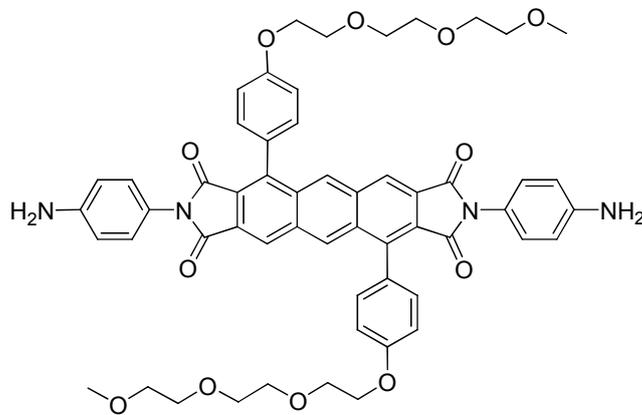
Siguiendo un enfoque similar, Zhang y Swager desarrollaron las moléculas **11-13** basadas en cromóforos débilmente conjugados con cierta flexibilidad, que después de la fosforilación y posterior ciclación, produjeron un aumento de la intensidad de emisión (**Figura 1.18**).<sup>45</sup> La respuesta de las moléculas **11-13** frente a los simulantes DCP y DFP fue muy diferente. Como se puede observar **11** reacciona con DCP y DFP para formar las especies fosforiladas correspondientes, pero éstas fueron incapaces de ciclar para dar la especie altamente fluorescente **cyc11**, derivado que se obtiene sólo forzando las condiciones de reacción (SOCl<sub>2</sub>/KI, AgClO<sub>4</sub>). El reactivo **12** posee un fenilo en lugar de un tiofenilo y mostró un comportamiento más adecuado para la detección ya que la intensidad de emisión de las disoluciones en diclorometano de **12** aumentó 5000 veces debido a la formación del producto de ciclación **cyc12** después de la reacción con un equivalente de DCP o DFP. Este aumento en la intensidad de emisión se atribuye a la eliminación de la libre rotación entre los dos anillos en **cyc12** después de la ciclación. El único inconveniente que presenta **12** en el uso como reactivo fluorogénico radica en el hecho de que la cinética de la reacción de ciclación es demasiado lenta. Con el fin de mejorar la cinética de la reacción se sintetizó y evaluó el comportamiento del compuesto **13**. Este reactivo contiene una subunidad de naftaleno rígida y con una conformación restringida que favorece la ciclación. Otro punto de interés es que **13** en su estado nativo presenta una emisión relativamente fuerte que facilita la detección a dos longitudes de onda. Se depositó **13** sobre películas delgadas de acetato de celulosa y se evaluó su respuesta frente a DFP y DCP. Después de la adición de los simulantes de agentes de guerra química sobre estas películas, la banda de emisión de la molécula libre centrada en 378 nm cambió poco a poco mientras que se obtenía una banda de emisión nueva centrada a 438 nm y que se asignó a la especie **cyc13**.



**Figura 1.19.** Estructura química de los receptores **14-18**.

<sup>45</sup> S.-W. Zhang and T. M. Swager, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 340.

Dale y Rebek han desarrollado una familia de sensores fluorescentes (ver **Figura 1.19**) para DCP que también se basan en el mecanismo de PET que se indica en la **Figura 1.16**.<sup>46</sup> Los compuestos **14-18** derivan del triácido de Kemp (como fragmento estructural rígido) funcionalizado con un alcohol primario localizado en las proximidades de una amina terciaria que lleva un pireno como fluoróforo conectado a través de espaciadores de metileno (que van desde uno a cuatro unidades). La fluorescencia de las disoluciones en metanol de **14-17** ( $\lambda_{exc} = 340$  nm) se desactivó debido a un proceso PET del par solitario de la amina al fluoróforo foto-excitado. La exposición de **14** a DCP en metanol provoca la fosforilación del alcohol primario, seguida rápidamente por una reacción de sustitución intramolecular (ver el esquema general de la **Figura 1.16**). La sal de amonio cuaternaria producida por esta reacción de ciclación ya no posee un par solitario de electrones y el proceso PET ya no es posible. Como consecuencia se observa un aumento de la intensidad de emisión de 22 veces con respecto a la del compuesto **14**. La eficiencia de la desactivación se reduce en los receptores **15-17** debido a la presencia de separadores de metileno adicionales y, en consecuencia, los aumentos en la intensidad de las emisiones observadas para **15-17** son menos significativos (por ejemplo, sólo se encontró un aumento de 1.1 veces para **17**). El diseño del sensor es modular y los autores también sintetizaron el reactivo **18** que posee como fluoróforo una molécula de 6,7-dimetoxicumarina. Una vez más se encontró un aumento de 20 veces en la intensidad de emisión con la adición de DCP a las disoluciones en metanol, debido a la fosforilación, seguida por la formación de la sal de amonio cuaternario correspondiente.

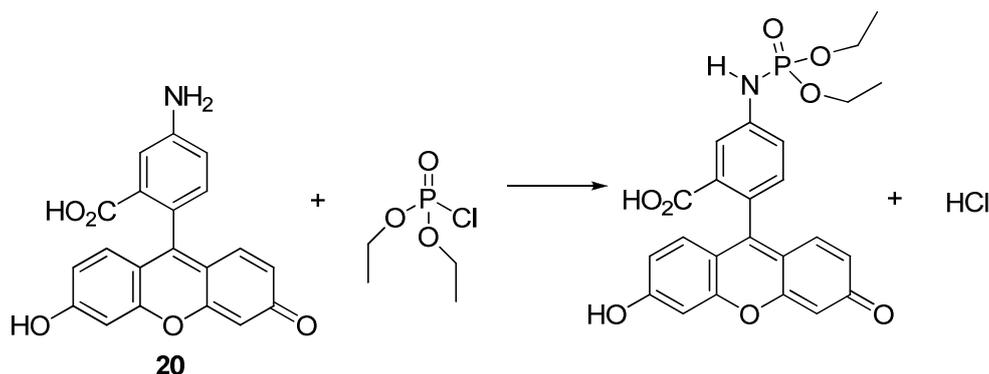


**19**

**Figura 1.20** Estructura química del compuesto **19**.

<sup>46</sup> T. J. Dale and J. Rebek, Jr., *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 4500.

Otra aproximación para el desarrollo de receptores basados en el mecanismo de PET para la detección de agentes nerviosos consiste en el uso de reacciones de fosforilación de una amina que esté dentro de la estructura del fluoróforo. Utilizando este principio, se sintetizó el receptor **19** que es una bisimida del antraceno (**Figura 1.20**) que se empleó como sensor fluorescente para cloruro de acetilo, cloruro de tionilo y productos químicos muy tóxicos como el diclorotiofosfato (DCTP), dicloruro de metilfosfonato (MPDC), cloruro de dimetilfosfinato (DMPC) y dimetilmetilfosfonato (DMMP).<sup>47</sup> Las disoluciones en DMF del receptor presentaron la banda de absorción típica del antraceno. Excitando estas disoluciones a 425 nm no se observó ninguna banda de emisión debido a un proceso PET intramolecular desde el grupo amino al antraceno excitado. La reacción del cloruro de acetilo y cloruro de tionilo (estos haluros de ácido son utilizados como simulantes de agentes nerviosos basados en organofosfonatos) provocaron un aumento de la intensidad de fluorescencia (banda centrada a 490 nm) que fue asignada a la supresión del proceso PET debido a la reacción de la amina con los haluros de ácido y la formación de la correspondiente amida. Adicionalmente, el receptor fue dispersado en un soporte de sílice mostrando el mismo comportamiento en presencia de ambos haluros de ácido. La presencia de DCTP, MPDC y DMPC en disoluciones de DMF del receptor **19** también indujeron un aumento en la intensidad de emisión. Sin embargo la adición de DMMP (un simulante del Sarín menos reactivo) produjo cambios poco significativos en la fluorescencia.



**Figura 1.21** Estructura química del compuesto **20** y su reactividad con el simulante DCP.

<sup>47</sup> F. Ilhan, D. S. Tyson and M. A. Meador, *Chem. Mater.*, **2004**, 16, 2978.

La preparación de materiales híbridos para la detección de agentes nerviosos es otra aproximación interesante. Recientemente se prepararon microesferas poliméricas con fluoresceinamina que fueron empleadas para detectar simulantes de agentes nerviosos.<sup>48</sup> Disoluciones acuosas a pH 7.5 del receptor **20** no presentan una fluorescencia significativa debido a un proceso PET desde el par electrónico solitario del N de la amina al fluoróforo fotoexcitado. Como en el ejemplo anterior, la reacción de **20** con DCP induce la fosforilación del grupo amino aromático, suprimiendo el proceso PET y aumentando la intensidad de la emisión (**Figura 1.21**). Este aumento de la intensidad de emisión es función del pH del medio presentó el valor más alto en el intervalo 7.5-11. Después de estudiar el comportamiento del receptor **20** en disolución, éste se incorporó en microesferas. Este material sensor fue preparado mediante la adsorción del receptor dentro de microesferas poliméricas funcionalizadas con grupos carboxilato y recubiertas con poli(2-vinilpiridina). Cuando las microesferas son expuestas al vapor de DCP, la conversión de la fluoresceinamina a fluoresceinfosforamida causa un rápido aumento de la intensidad de la fluorescencia igual al que se observaba en disolución. Adicionalmente, la poli(2-vinilpiridina) aporta una alta densidad de nitrógenos piridínicos aceptores de protones que neutralizan el HCl que se genera durante la reacción, permitiendo que la fluorescencia se mantenga en niveles altos después de la exposición al vapor. No se observaron respuestas significativas cuando las microesferas fueron expuestas a otros simulantes de agentes nerviosos menos reactivos como el dimetilmetilfosfonato (DMMP) y el diisopropilmetilfosfonato (DIMP), simulantes de gas mostaza (salicilato de metilo) y compuestos orgánicos volátiles (etanol, heptano y tolueno). El tamaño, selectividad y la respuesta rápida de **20** hace que sea adecuado para la detección de vapores de agentes nerviosos y para la inclusión en matrices de microesferas.

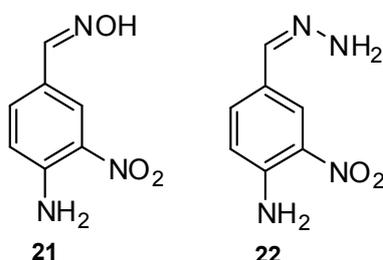
#### 1.4.2. Reactivos cromo-fluorogénicos con oximatos.

Una limitación importante de los sensores basados en procesos PET descritos en el apartado anterior es la baja velocidad de las reacciones de fosforilación y la necesidad de utilizar un instrumento relativamente sofisticado como es un fluorímetro. Para evitar estos problemas otros autores han utilizado grupos altamente nucleofílicos en combinación con un sistema colorimétrico como una estrategia alternativa para preparar sondas colorimétricas para la detección de simulantes de agentes de guerra química. Los oximatos (aniones derivados de las correspondientes oximas) y las

---

<sup>48</sup> S. Bencic-Nagale, T. Sternfeld and D. R. Walt, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 5041.

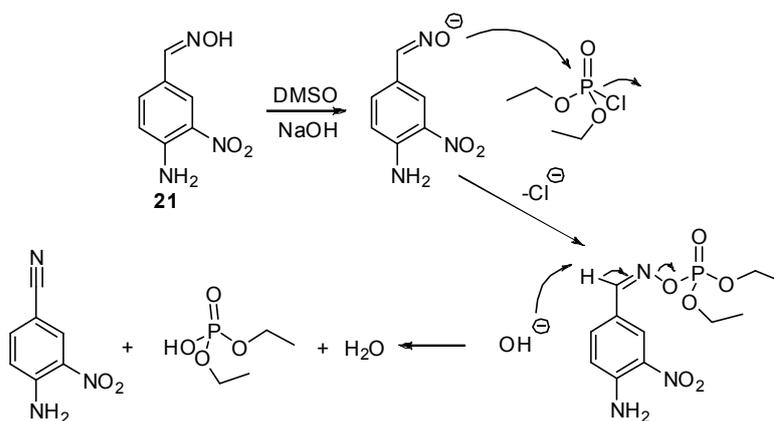
hidrazonas, que son conocidos como “supernucleófilos” porque son especies reactivas que contienen un par electrónico desapareado (en un átomo de oxígeno o nitrógeno) que es adyacente a un centro nucleofílico, se han utilizado para desarrollar este tipo de indicadores colorimétricos. Si estos nucleófilos se encuentran contenidos en una estructura orgánica con bandas de absorción centradas en la zona visible, la reacción con los átomos de fósforo de los agentes nerviosos puede inducir cambios en estas bandas que estén asociados a cambios de color y por tanto permitir el reconocimiento de estas sustancias incluso a simple vista.



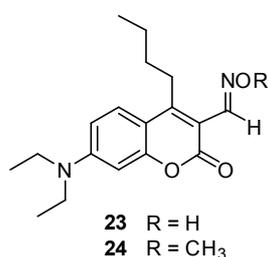
**Figura 1.22** Estructuras químicas de **21** y **22**.

Siguiendo este enfoque se sintetizaron los receptores **21** y **22**, que poseen una oxima y una hidrazona en una estructura cromogénica tipo aminonitrofenil, y se estudió su respuesta frente a los simulantes de agentes de guerra química DCP y DFP (**Figura 1.22**).<sup>49</sup> Las disoluciones de **21** ( $3.0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ) en DMSO-NaOH (1:1) presentan una banda de absorción en el espectro visible centrada a 461 nm (asignada a la transición  $n-\pi^*$ ) que se desplaza gradualmente a 410 nm tras la adición de DCP. En presencia de DFP se observó un desplazamiento hipsocrómico de la banda hasta 413 nm. Estos cambios en la banda visible de **21** se atribuyen a la formación de los correspondientes derivados oximato-DCP u oximato-DFP. Estos complejos oximato son inestables y sufren una reacción de deshidratación con el tiempo para dar 4-amino-3-nitrobenzotrilo. La reactividad de **21** en presencia de DCP se muestra en la **Figura 1.23**. Los autores repitieron el mismo experimento pero utilizando la superbases  $P_4-t\text{-Bu}$  fosfaceno y encontraron los mismos resultados, lo que confirma que los cambios en la banda visible se deben a la formación del supernucleófilo oximato y la fosforilación posterior. En claro contraste, **22** no forma el aducto hidrazona-DFP en condiciones básicas.

<sup>49</sup> K. J. Wallace, J. Morey, V. M. Lynch and E. V. Anslyn, *New J. Chem.*, **2005**, 29, 1469.



**Figura 1.23** Reactividad del receptor **21** en presencia de DCP.



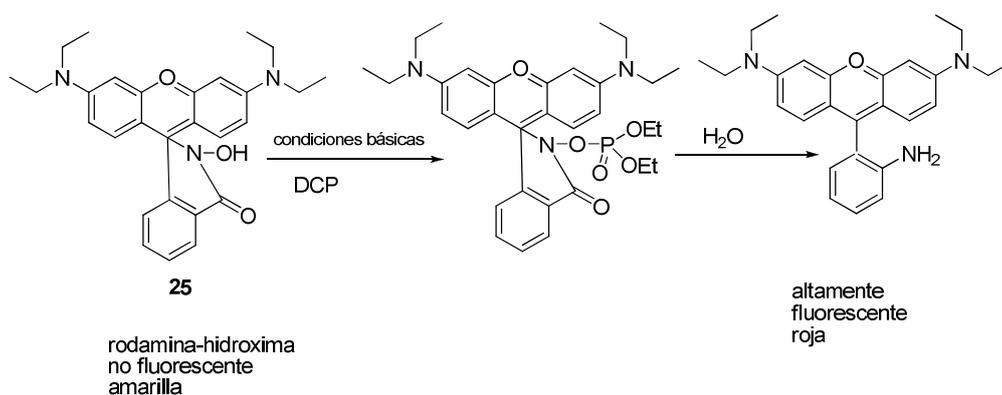
**Figura 1.24** Estructuras de los receptores **23** y **24**.

El mismo enfoque fue utilizado en la síntesis de los reactivos cromofluorogénicos **23** y **24** que poseen una estructura tipo cumarina funcionalizada con un grupo oxima (**Figura 1.24**).<sup>50</sup> Las disoluciones en DMSO de **23** muestran una banda ancha centrada a 409 nm. Después de la adición de 2 equivalentes de la base P<sub>4</sub>-*t*-Bu fosfaceno aparece una nueva banda centrada a 443 nm, que fue asignada al anión oximato formado por la desprotonación de **23**. La adición gradual de DFP induce un desplazamiento hipsocrómico apareciendo una nueva banda centrada a 409 nm. Como en el caso anterior, estos cambios en el espectro UV-visible fueron asignados a la fosforilación del anión oximato después de la adición de DFP. De nuevo el mecanismo propuesto fue confirmado mediante la adición de la base P<sub>4</sub>-*t*-Bu y el DFP a disoluciones de **24** (que no tiene la posibilidad de ser desprotonado). Estas adiciones no indujeron cambios apreciables en el

<sup>50</sup>K. J. Wallace, R. I. Fagbemi, F. J. Folmer-Andersen, J. Morey, V. M. Lynch and E. V. Anslyn, *Chem. Commun.*, **2006**, 3886.

espectro UV-visible del receptor **24**. El compuesto **23** también puede actuar como reactivo fluorogénico. Así, el anión oximato, obtenido después de la adición de la base  $P_4-t-Bu$  a las disoluciones del receptor **23**, es débilmente fluorescente (excitación a 410 nm y emisión a 450 nm) debido a la desactivación de la emisión mediante un proceso PET inducido por la elevada energía del par solitario del anión oximato. Después de la adición de DFP y la consiguiente fosforilación, la energía del orbital del oximato desciende y provoca la aparición de fluorescencia debido a la inhibición del PET.

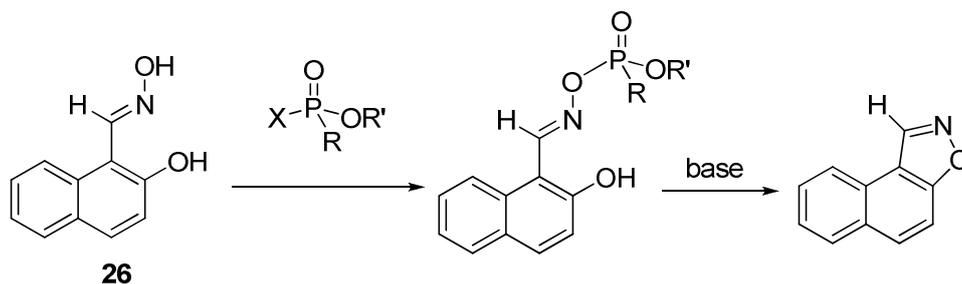
Trabajos recientes en el campo de los oximatos incluyen varios estudios relacionados con su basicidad y reactividad frente a compuestos organofosforados. Terrier y colaboradores determinaron los valores de  $pK_a$  de un amplio conjunto de oximatos y las constantes de velocidad de segundo orden de estas especies con dos compuestos organofosforados modelo, el bis(4-nitrofenil)fenilfosfonato (BNPPP) y el bis(4-nitrofenil)metilfosfonato (BNPMP), y tres compuestos tóxicos (Sarín, Somán y DFP) en agua y en mezclas agua-DMSO 30:70 (v/v) mediante procedimientos potenciométricos.<sup>51</sup> Una de las conclusiones más relevante fue que la reactividad de los oximatos mostró una clara tendencia a la saturación al aumentar su basicidad ya que el carácter nucleofílico disminuye regularmente al aumentar el  $pK_a$  en la serie. Los autores sugieren que la existencia de un fuerte requerimiento de desolvatación de los oximatos antes del ataque nucleofílico (que es tanto más difícil cuanto mayor es la basicidad del oximato) es la explicación de esta saturación.



**Figura 1.25** Reacción cromo-fluorogénica de la rodamina-hidroximato con dietilclorofosfato.

<sup>51</sup>F. Terrier, P. Rodríguez-Dafonte, E. Le Guével and G. Moutiers, *Org. Biomol. Chem.*, **2006**, 4, 4352.

Recientemente se ha desarrollado un reactivo cromo-fluorogénico basado en un derivado del colorante comercial Rodamina B funcionalizado con una hidroxima.<sup>52</sup> Éste fluoróforo y su hidroximato pueden presentar dos formas tautómeras, una de ellas abierta altamente fluorescente y otra cerrada en forma de espirolactama. Cuando el hidroximato (1 mg mL<sup>-1</sup>) generado por desprotonación de la hidroxima **25** con trietilamina al 3 % en DMF reacciona con el DCP se forma una especie reactiva que sufre una transposición de Lossen para formar un isocianato. Este isocianato se hidroliza y descarboxila para formar una amina en presencia de un 5 % de agua (**Figura 1.25**). Esta reacción permite la formación de un derivado de la rodamina en su forma abierta y por tanto se produce un cambio de color, de amarillo a rojo, y la aparición de fluorescencia con un máximo de emisión centrado a 590 nm. Con este reactivo se han conseguido detectar 25 ppm de DCP con un tiempo de incubación de 20 minutos.



**Figura 1.26** Secuencia de detección empleando  $\beta$ -hidroxioximas.

Dale y Rebek desarrollaron una nueva familia de sensores fluorescentes para agentes nerviosos basados en la reacción de  $\beta$ -hidroxioximas con el DCP y el DFP para dar isoxazoles.<sup>53</sup> Como se puede ver en la **Figura 1.26** la reacción entre el hidroxilo de la oxima **26** y el simulante empleado da lugar a la formación de una especie reactiva que, en presencia de una base, sufre una ciclación intramolecular para formar un isoxazol. Debido al aumento de la conjugación, ya que se forma un nuevo anillo aromático, se produce un aumento de la fluorescencia que es empleado como señal para detectar estos analitos. Además permite detectar los simulantes en medio acuoso lo que es muy importante de cara a una posible aplicación en muestras reales.

<sup>52</sup> S. Han, Z. Xue, Z. Wang and T. B. Wen, *Chem. Commun.*, **2010**, 46, 8413.

<sup>53</sup> T. J. Dale and J. Rebek, Jr., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 7850.

### 1.4.3. Polímeros de impresión molecular.

Otro método utilizado en el desarrollo de sensores ópticos para agentes nerviosos se basa en el uso de polímeros de impresión molecular (Molecular Imprinted Polymers, MIPs). Los polímeros de impresión molecular son materiales sintéticos que pueden mimetizar ciertos receptores biológicos sin sus problemas de estabilidad. Generalmente los sensores para agentes nerviosos basados en MIPs suelen incorporar un complejo de europio luminescente que actúa como unidad indicadora. Los lantánidos como el europio poseen picos de excitación y emisión muy estrechos que permiten un análisis altamente sensible y selectivo. La detección del analito se basa en los cambios en la intensidad de emisión del europio al coordinar éste con el agente nervioso.

Haciendo uso de esta técnica se preparó un polímero sensor en agua para fosfonato de metilpinacolilo (PMP, que es el producto de hidrólisis del Somán).<sup>54</sup> El complejo  $\text{Eu}(\text{DVMB})_3(\text{PMP})(\text{NO}_3)_2$  (DVMB = benzoato de divinilmetilo) se sintetizó y se utilizó para preparar el MIP. Después de la excitación a 465.8 nm (con un láser de argón) de disoluciones acuosas del complejo  $\text{Eu}(\text{DVMB})_3(\text{PMP})(\text{NO}_3)_2$  se observaron dos bandas de emisión a 610 y 613 nm. La banda a 610 nm fue asignada al producto de adición del PMP al  $\text{Eu}^{+3}$  mientras que la banda a 613 nm se propuso que era debida a la emisión del  $\text{Eu}^{+3}$ . En otros estudios los autores recubrieron el extremo distal de una fibra óptica con el MIP y midieron el contenido de PMP de disoluciones acuosas a pH 13. La respuesta del sensor a concentraciones crecientes de PMP mostraba un aumento en la intensidad de emisión de las dos bandas centradas a 610 y 613 nm. Este aumento en la intensidad fue atribuido a la interacción del PMP con el  $\text{Eu}^{+3}$  y la consiguiente exclusión de las moléculas de agua que formaban parte de la esfera de coordinación del metal. Se probaron algunos pesticidas y herbicidas como posibles interferentes y ninguno de ellos provocó la aparición de la banda centrada a 610 nm pero sí que indujeron distintos grados de aumento en la emisión en el intervalo de 612-620 nm.

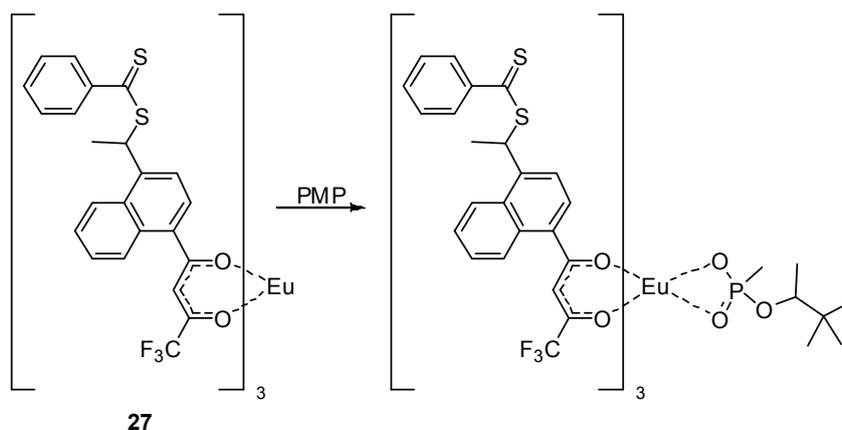
Más recientemente se preparó un nuevo MIP a partir de benzoato de vinilo y divinilbenceno como agente entrecruzante,  $\text{Eu}(\text{NO}_3)_3$  como fuente de  $\text{Eu}^{+3}$  y el correspondiente agente nervioso.<sup>55</sup> Después de la preparación del MIP el agente nervioso se eliminó lavando con  $\text{HNO}_3$  1M. Utilizando este procedimiento se prepararon MIPs para Sarín, Somán y VX. Se recubrieron distintas fibras ópticas con los MIPs y se utilizaron para la

---

<sup>54</sup> A. L. Jenkins, O. M. Uy and G. M. Murray, *Anal. Commun.*, **1997**, 34, 221; A. L. Jenkins, O. M. Uy and G. M. Murray, *Anal. Chem.*, **1999**, 71, 373.

<sup>55</sup> A. L. Jenkins and S. Y. Bae, *Anal. Chim. Acta*, **2005**, 542, 32.

detección de los correspondientes agentes nerviosos en disoluciones acuosas a pH 9.5. Para todos los sensores se encontró que un incremento en las concentraciones del agente nervioso inducía un aumento en la emisión del lantánido (al excitar a 468 nm aparece una banda de emisión ancha en el intervalo entre 610 y 630 nm) provocada por la coordinación con el lantánido y consiguiente exclusión de las moléculas de agua.



**Figura 1.27** Estructura química del polímero 27 y de su complejo con PMP.

En otro trabajo se ha preparado un MIP basado en un ditiobenzoato sustituido con un complejo tris( $\beta$ -acetilacetato) de europio (III) mediante polimerización RAFT (reversible addition fragmentation chain transfer). Este MIP se utilizó como sensor luminiscente para PMP (**Figura 1.27**).<sup>56</sup> Así, se sintetizó la molécula **27** y se preparó su complejo con PMP. El polímero se preparó con el complejo **27**-PMP y una matriz de etilenglicol/dimetilmetacrilato/metilmetacrilato. La eliminación del PMP (mediante una extracción Soxhlet con isopropanol) permitió la obtención de un material polimérico con capacidad sensora. Después de la adición de cantidades crecientes de PMP al material sensor en disoluciones acuosas se observó un aumento en la banda de luminiscencia centrada a 612 nm. Como en los casos anteriores, este aumento fue atribuido a la formación del complejo de PMP con el centro metálico. Se obtuvieron muy buenos resultados en cuanto a la sensibilidad (con límites de detección en el rango de las ppb) y selectividad con este MIP.

<sup>56</sup> G. E. Southard, K. A. Van Houten, E. W. Ott, Jr. and G. M. Murray, *Anal. Chim. Acta*, **2007**, 581, 202.

#### 1.4.4. Otros sensores para simulantes de agentes nerviosos.

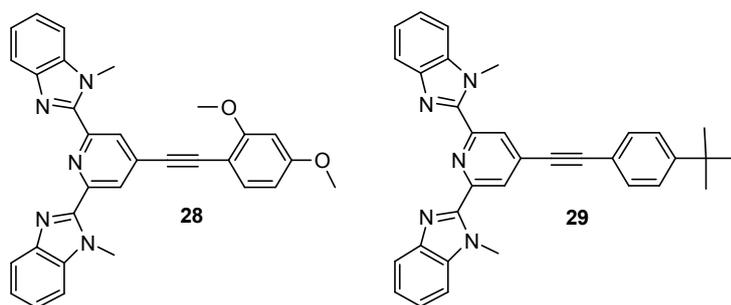
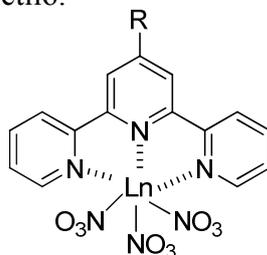


Figura 1.28 Estructuras de los receptores **28** y **29**.

Los receptores **28** y **29**, basados en la molécula 2,6-bis(metilbenzimidazolil)piridina, han sido empleados en ensayos de desplazamiento con  $\text{La}^{+3}$ ,  $\text{Eu}^{+3}$  y  $\text{Zn}^{+2}$  para la detección fluorogénica de los simulantes de agentes neurotóxicos fosfato de trietilo y fosfato tri-*o*-toluilo (**Figura 1.28**).<sup>57</sup> Las disoluciones de **28** y **29** en  $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{CN}$  (9:1 v/v) son muy fluorescentes, mostrando bandas de emisión a 420 y 375 nm, respectivamente. La adición del catión  $\text{La}^{+3}$  a las disoluciones de **28** y **29** inducen un desplazamiento batocrómico en el espectro de emisión (73 y 38 nm para **28** y **29**, respectivamente) junto con una disminución de la intensidad de emisión, asociada a la formación de los complejos [**28**· $\text{La}^{+3}$ ] y [**29**· $\text{La}^{+3}$ ]. La adición de fosfato de trietilo a las disoluciones de ambos complejos induce instantáneamente un desplazamiento hacia el azul de la banda de emisión y un aumento de la intensidad de emisión, lo que señala la liberación del indicador del correspondiente complejo ya que el fosfato se une al catión  $\text{La}^{+3}$ . Por otra parte, la adición de fosfato de tri-*o*-toluilo a las disoluciones de [**28**· $\text{La}^{+3}$ ] sólo produce una respuesta muy pequeña, incluso a altas concentraciones del fosfato aromático, lo que indica una excelente selectividad para la detección de los fosfatos alquílicos frente a fosfatos aromáticos mucho más voluminosos. Con el fin de explorar la influencia de diferentes iones metálicos en la respuesta como sensores de los complejos metálicos, se prepararon las disoluciones de [**28**· $\text{Eu}^{+3}$ ] y [**28**· $\text{Zn}^{+2}$ ] y se valoraron con fosfato de trietilo. El complejo [**28**· $\text{Eu}^{+3}$ ] mostró un comportamiento muy similar al presentado por [**28**· $\text{La}^{+3}$ ]. En claro contraste, el complejo [**28**· $\text{Zn}^{+2}$ ] no mostró un aumento de la fluorescencia

<sup>57</sup> D. Knapton, M. Burnworth, S. J. Rowan and C. Weder, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2006**, 45, 5825.

del ligando libre incluso tras añadir grandes cantidades de fosfato de trietilo. Esta ausencia de respuesta fue atribuida al hecho de que el  $\text{Zn}^{+2}$  se une a **28** mucho más fuertemente que los cationes  $\text{La}^{+3}$  y  $\text{Eu}^{+3}$ , impidiendo la reacción de desplazamiento. El mismo comportamiento se observó para los complejos  $[\mathbf{29}\cdot\text{Eu}^{+3}]$  y  $[\mathbf{29}\cdot\text{Zn}^{+2}]$ , es decir, hay respuesta a fosfato de trietilo con  $[\mathbf{29}\cdot\text{Eu}^{+3}]$  y no hay respuesta con el complejo  $[\mathbf{29}\cdot\text{Zn}^{+2}]$ . Con el fin de facilitar la aplicación de estos complejos en dispositivos se adsorbió el complejo  $[\mathbf{29}\cdot\text{Eu}^{+3}]$  sobre partículas hidrofóbicas obteniendo así un material sólido que cambia su fluorescencia (de rosa a azul) después de la exposición a vapores de fosfato de trietilo.



**30 a-c**

**30a:** R = H; **30b:** R =  $\text{O}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$ ;

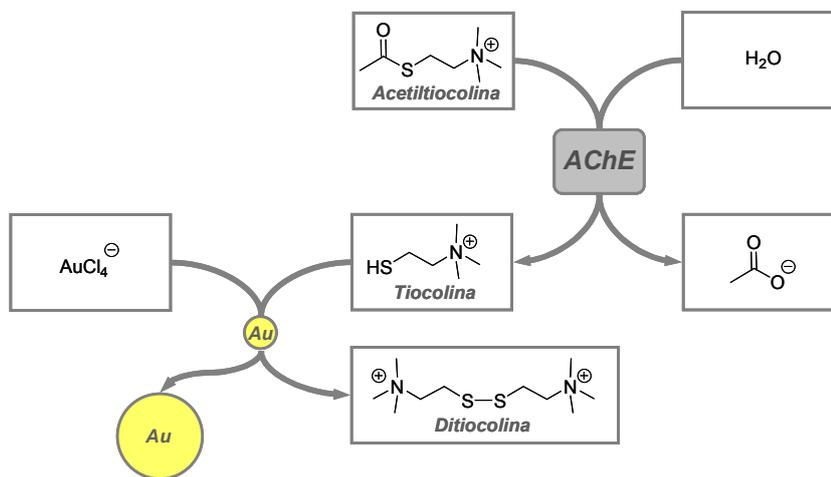
**30c:** R = polímero basado en MMA (metilmetacrilato)

Ln =  $\text{Eu}^{3+}$ ,  $\text{Tb}^{3+}$ ,  $\text{Dy}^{3+}$

**Figura 1.29.** Diferentes complejos metálicos con terpiridinas utilizados para la detección fluorogénica de DCP y DFP.

Otra aproximación utilizada recientemente para la detección de los simulantes de agentes neurotóxicos DCP y DFP consiste en la inhibición de la fluorescencia de complejos metálicos con lantánidos y terpiridinas.<sup>58</sup> El mecanismo de detección consiste en el desplazamiento del lantánido debido a la reacción de fosforilación que tiene lugar entre la piridina y el halofosfato. Se sintetizaron y evaluaron con éxito distintos complejos con los lantánidos  $\text{Eu}(\text{III})$ ,  $\text{Tb}(\text{III})$  y  $\text{Dy}(\text{III})$  (**Figura 1.29**) alcanzando límites de detección de 75 ppb para el DCP y 6 ppb para el DFP. Los autores realizaron pruebas con varios posibles interferentes, incluyendo muchos fosfatos y otras especies de fósforo, además de los ácidos  $\text{HCl}$  y  $\text{HF}$  que se generan por hidrólisis de el DCP y el DFP, y comprobaron que la inhibición de la fluorescencia no era debida a la interacción del metal con el oxígeno del fosfato sino a la reacción de los simulantes empleados con el N de la terpiridina.

<sup>58</sup> R. Shunmugam and G. N. Tew, *Chem. Eur. J.* **2008**, 14, 5409.

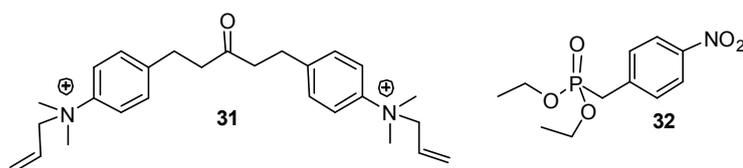


**Figura 1.30.** Sistema de detección basado en el uso de nanopartículas de oro.

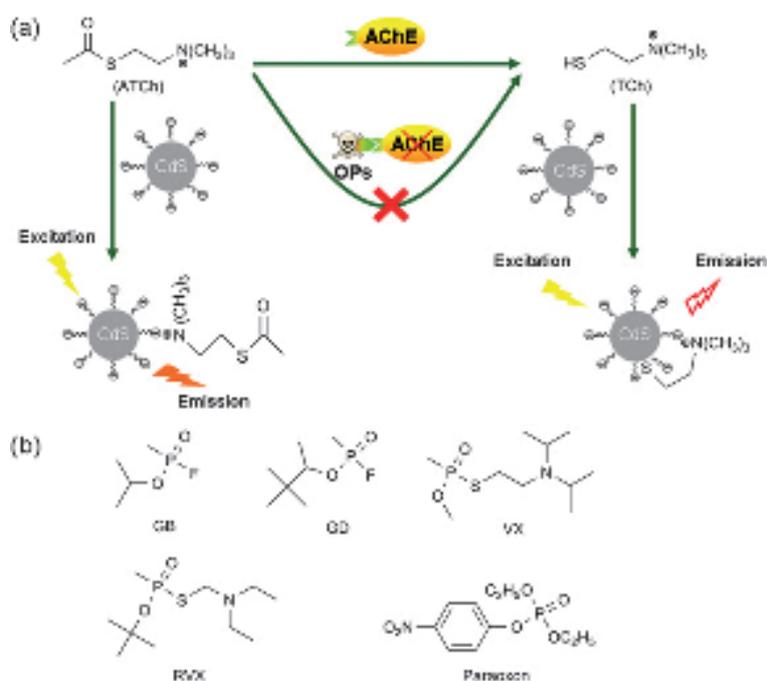
Otro enfoque interesante para el diseño de sondas cromofluorogénicas para la detección de agentes nerviosos propone el uso de nanopartículas de oro, como subunidades de señalización, junto con un ensayo enzimático. El sistema de detección consiste en una mezcla de la enzima acetilcolinesterasa (AChE),  $\text{HAuCl}_4$ , nanopartículas de oro de muy pequeño tamaño (2-3 nm y que actúan como semillas para el crecimiento de nanopartículas de mayor tamaño) y la acetiltiocolina (**Figura 1.30**).<sup>59</sup> En este sistema, con una concentración de enzima fijada en  $0.13 \text{ unidades mL}^{-1}$ , la banda de absorbancia plasmónica de las nanopartículas aumenta en intensidad, se vuelve más ancha y se desplaza hacia el azul después de la adición de cantidades crecientes de acetiltiocolina. Los análisis TEM mostraron que al aumentar la concentración de acetiltiocolina se formaban partículas de mayor tamaño (alcanzando un diámetro de 300-500 nm). Esto se explica de la siguiente manera: (i) al adicionar cantidades crecientes de acetiltiocolina aumenta la cantidad de su producto de hidrólisis tiocolina (ii) la tiocolina actúa como agente reductor del precursor  $\text{HAuCl}_4$  a oro metálico que se deposita sobre las semillas de nanopartículas, (iii) como aumenta la cantidad de reductor, se forman partículas más grandes debido al incremento de la deposición de oro sobre la superficie, dando lugar a mayores absorbancias de la banda de plasmón. Este aumento catalítico del tamaño de las nanopartículas se ha utilizado para la detección de dos inhibidores de la acetilcolinesterasa como son el dibromuro de 1,5-bis(4-alildimetilamoniofenil)pentano-3-ona (**31**) y el fosfato de dietil-*p*-nitrofenilo (paraoxon, **32**) (**Figura 1.31**). Ambos compuestos inhiben la acción de la

<sup>59</sup> V. Pavlov, Y. Xiao and I. Willner, *Nano Lett.*, **2005**, 5, 649; A. Virel, L. Saa, V. Pavlov, *Anal.Chem.*, **2009**, 81, 268.

enzima ya que reaccionan con el hidroxilo del centro activo de la proteína y por ello se emplean como simulantes de agentes neurotóxicos. A medida que aumenta la concentración de los simulantes la absorbancia de las nanopartículas de oro disminuye ya que el crecimiento biocatalítico de las nanopartículas se inhibe. Se construyó un dispositivo en el que se inmovilizaron las nanopartículas de oro semilla sobre la superficie de una placa de vidrio. Después de la adición de acetilcolinesterasa y acetiltiocolina, la superficie se vuelve de color azul ( $\lambda = 570 \text{ nm}$ ) debido a la banda de plasmón de las nanopartículas de oro. La adición de los simulantes de agentes nerviosos provoca que esta banda de plasmón disminuya y que el color cambie a rosa.



**Figura 1.31.** Estructura de los simulantes 31 y 32.



**Figura 1.32** (a) Esquema que ilustra la estrategia de detección de agentes neurotóxicos empleando nanocristales de CdS. (b) Estructura química de las especies organofosforadas empleadas en el estudio.

El empleo de las propiedades fotoluminiscentes de los nanocristales (NCs) de CdS también ha sido utilizado para la detección fluorogénica de agentes de guerra química.<sup>60</sup> Como se puede observar en la **Figura 1.32** se emplea la acetiltiocolina (ATCh), que posee una carga positiva, como sustrato para la hidrólisis por parte de la acetilcolinesterasa (AChE), para generar tiocolina (TCh), otra especie con carga positiva que posee un grupo tiol adicional. Tanto la ATCh como la TCh prefieren adsorberse sobre la superficie cargada negativamente de los nanocristales de CdS funcionalizados con la base conjugada del ácido tioglicólico (TGA-CdS NCs) a través de interacciones electrostáticas y formación de enlaces de hidrógeno. Sin embargo, la tiocolina es capaz de cubrir una mayor parte de la superficie de los nanocristales gracias a la conocida afección del grupo tiol por la superficie de los mencionados NCs. Por tanto, si comparamos la reactividad y los efectos que se derivan de esta de acetiltiocolina y tiocolina, se establece una diferencia en la cantidad de vacantes en la superficie de los NCs cuando hay ATCh ó TCh, dando lugar a un cambio en la fotoluminiscencia y por tanto permitiendo la detección y cuantificación de las especies que inhiben la AChE.

---

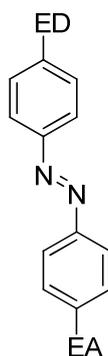
<sup>60</sup> T. Yu, J.-S. Shen, H.-H. Bai, L. Guo, J.-J. Tang, Y.-B. Jiang and J.-W. Xie., *Analyst*, **2009**, 134, 2153.

**Capítulo 2. Colorantes azoicos como unidades señaladoras en sondas colorimétricas para el reconocimiento de agentes nerviosos. Sistema receptor en la parte dadora del colorante.**

## Capítulo 2. Colorantes azoicos como unidades señaladoras en sondas colorimétricas para el reconocimiento de agentes nerviosos. Sistema receptor en la parte dadora del colorante.

### 2.1. Introducción

En este capítulo se expondrán los resultados obtenidos en la utilización de derivados de colorantes azoicos funcionalizados con un sistema receptor en la parte dadora, como sondas colorimétricas para la detección de simulantes de agentes de guerra química y por extensión de los propios agentes nerviosos.



**Figura 2.1** Estructura general de un colorante azoico (donde ED es un grupo electrodador y EA un grupo electronceptor)

Los receptores funcionalizados con diversos colorantes son conocidos desde hace mucho tiempo, ya que los primeros compuestos de este tipo fueron empleados por M. Takagi<sup>61</sup> en el año 1977. El empleo de colorantes azoicos como unidad indicadora fue introducido por F. Vögtle<sup>62</sup> al año siguiente. Además hay que destacar que los colorantes azoicos ya se utilizaban como indicadores ácido-base un siglo antes, siendo el primero el naranja de metilo (propuesto por Lunge en 1878). El segundo indicador ácido-base de este tipo en ser empleado fue el rojo Congo, descubierto por Böttiger en 1884. En los últimos 35 años se han desarrollado numerosos receptores con unidades coordinantes de distintos tipos unidas covalentemente a colorantes,<sup>63</sup> principalmente para el reconocimiento de

<sup>61</sup> M. Takagi, H. Nakamura, K. Ueno, *Anal. Lett.*, **1977**, 10, 1115.

<sup>62</sup> J. P. Dix, F. Vögtle, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1978**, 17, 857.

<sup>63</sup> M. Inouye, *Color Non-text. Appl.*, **2000**, 239.

cationes y aniones y últimamente también, como ya se comentó en el **Capítulo 1** para especies neutras. Estos receptores son muy atractivos ya que pueden señalar la presencia o no de un determinado huésped mediante un cambio de posición de las bandas del espectro de absorción del colorante. Este desplazamiento de las bandas puede producir cambios de color en las disoluciones de los receptores pudiendo ser detectada la presencia o no del huésped a simple vista.

En el caso concreto de los colorantes azoicos estos han sido extensamente usados para el diseño de receptores de cationes,<sup>64</sup> aniones<sup>65</sup> y moléculas neutras<sup>16</sup> y existían precedentes de su uso en nuestro grupo de investigación tanto para el reconocimiento de cationes<sup>66</sup> como de aniones<sup>67,68</sup> y por ello decidimos utilizarlos como unidades de señalización para la detección de simulantes de agentes nerviosos.

### **2.1.1. Propiedades físico-químicas de los colorantes azoicos. Relación estructura-color.**

El término colorante azoico se aplica al grupo de colorantes que tienen un grupo azo (-N=N-) en su estructura molecular funcionalizado con anillos aromáticos en ambos lados. Este grupo puede dividirse en subgrupos de colorantes monoazoicos, diazoicos y triazoicos según el número de grupos azo que posea la molécula. El cromóforo fundamental de este tipo de colorantes es el grupo azo (-N=N-) con 6 electrones “móviles”, que conecta los anillos aromáticos. En la molécula se introducen otros grupos llamados auxocrómicos o auxocromos, que cuando son donantes de electrones aumentan la resonancia, intensificando la absorción de la luz y desplazando el máximo de absorción del espectro a longitudes de onda más largas y el color a tonos azulados y verdes. Estos grupos, que se llaman batocrómicos son: NR<sub>2</sub>, NHR, NH<sub>2</sub>, OH, OMe, etc. Los grupos que atraen electrones o electrón-aceptores (NO<sub>2</sub>, HSO<sub>3</sub><sup>-</sup>, SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, COOH, C=O, CN, etc.) desplazan el

---

<sup>64</sup> Sensores de cationes recientes funcionalizados con colorantes azoicos: (a) E. Kim, H. E. Kim, S. J. Lee, S. S. Lee, M. L. Seo, J. H. Jung, *Chem. Commun.*, **2008**, 3921. (b) Y. -J. Chen, W. -S. Chung, *Eur. J. Org. Chem.*, **2009**, 4770. (c) I. -T. Ho, G. -H. Lee, W. -S. Chung, *J. Org. Chem.*, **2007**, 72, 2434. (d) H. Lee, S. S. Lee, *Org. Lett.*, **2009**, 11, 1393.

<sup>65</sup> (a) Zollinger, H. *Color Chemistry*; VCH: Weinheim, **1991**. (b) Lee, K. H.; Lee, H.-Y.; Lee, D. H.; Hong, J.-I. *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 5447. (c) Lee, D. H.; Lee, K. H.; Hong, J.-I. *Org. Lett.* **2001**, 3, 5. (d) D. H. Lee, H. Y. Lee, K. H. Lee, J. I. Hong, *Chem. Commun.* **2001**, 1188. (e) C. Lee, D. H. Lee, J. I. Hong, *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 8665.

<sup>66</sup> F. Sancenón, R. Martínez-Mañez, J. Soto, *Tet. Letters*, **2001**, 42, 4321.

<sup>67</sup> F. Sancenón, R. Martínez-Mañez, J. Soto, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, 41, No. 8

<sup>68</sup> J. V. Ros-Lis, R. Martínez-Mañez, F. Sancenón, J. Soto, K. Rurack, and H. Weißhoff, *Eur. J. Org. Chem.*, **2007**, 2449.

máximo de absorción a longitudes de onda más cortas y el color a tonos amarillos y anaranjados y se llaman hipsocrómicos. La presencia de grupos auxocromos y la extensión del sistema resonante definen conjuntamente el color.

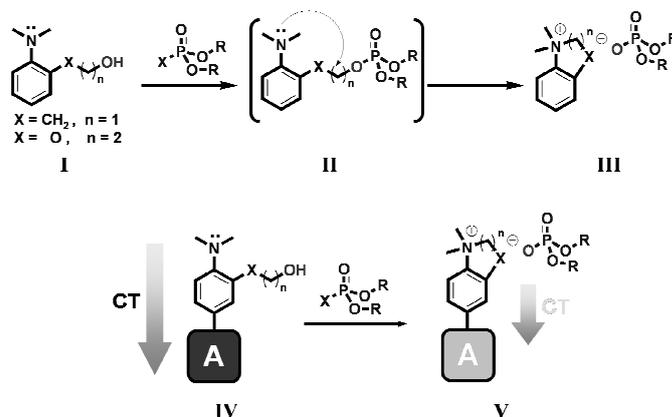
La presencia, en una misma molécula, de un grupo dador de electrones y otro aceptor de electrones induce la aparición de bandas de absorción de transferencia de carga en la zona visible del espectro electromagnético. Esta característica es típica de muchas familias de colorantes y, en especial, de los azoicos.

## 2.2. Diseño de sondas colorimétricas.

Aunque la secuencia de reacciones que se muestra a continuación (fosforilación de un alcohol primario y posterior reacción de *N*-alquilación intramolecular, ver **Figura 2.2**) había sido previamente utilizada, como se vió en el Capítulo 1, en el diseño de sondas fluorogénicas para la detección de agentes nerviosos, no había ejemplos en la bibliografía de sondas colorimétricas siguiendo este enfoque. Por ello se decidió el diseño de un receptor análogo que pudiera ser integrado en la estructura de un colorante, con el objetivo de conseguir una detección visual de agentes nerviosos.

El desarrollo de sondas colorimétricas depende normalmente del diseño avanzado de dos aspectos o componentes:

- (i) un sitio reactivo o receptor y
- (ii) un evento colorimétrico.

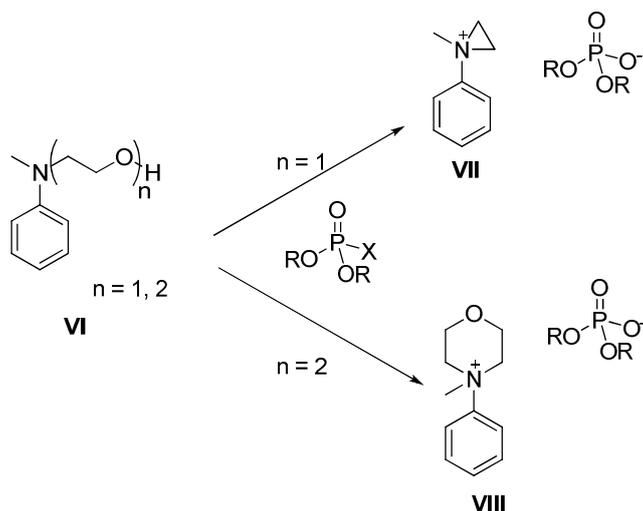


**Figura 2.2** Protocolo de reconocimiento colorimétrico.

El reconocimiento colorimétrico de los simulantes de agentes nerviosos que se describe en la **Figura 2.2** se basa en el uso de la

reactividad de la estructura **I** como receptor. Esta estructura contiene un nucleófilo, el grupo hidroxilo, que da reacciones de fosforilación con fosfonatos o fosfatos que contengan un buen grupo saliente para formar el intermedio **II**. Por otra parte, es conocido que **II** puede sufrir una *N*-alquilación intramolecular rápida para obtener la sal de amonio cuaternario **III**. Siguiendo este protocolo de reconocimiento, que prevé el uso del fragmento **I** como grupo dador y su acoplamiento con un grupo aceptor (A) dando lugar al sistema cromogénico de tipo azoico, se estableció un procedimiento adecuado para el desarrollo de sondas colorimétricas para la detección de agentes nerviosos. Así, la conversión de la correspondiente amina terciaria **IV** en la sal de amonio cuaternaria **V** después de la reacción con ciertos sustratos organofosforados (OP) induce un cambio en la capacidad dadora del átomo de N que se va a reflejar en un cambio apreciable en la posición de la banda de transferencia de carga lo que se traduce en un cambio de color.

Como fragmentos reactivos, se seleccionaron dos: el 2-(2-(dimetilamino)feniletanol) y el 2-[2-(*N,N*-dimetilamino)fenoxi]etanol. Estos fragmentos se incluyeron en la estructura de un colorante azoico para obtener los receptores cromogénicos finales que tendrían capacidad de detectar y cuantificar agentes nerviosos mediante significativos cambios de color.



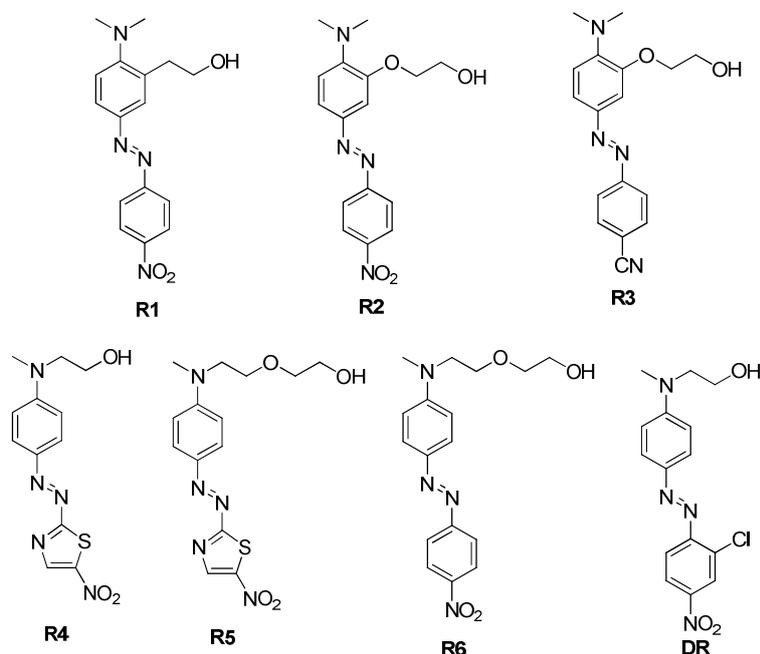
**Figura 2.3** Protocolo de reconocimiento colorimétrico basado en el empleo de 2-(metil(fenil)amino)etanol y 2-(2-(metil(fenil)amino)epoxi)etanol.

Con el objetivo de preparar otra familia diferente de receptores cromogénicos para gases nerviosos y teniendo en cuenta la reactividad de

los derivados organofosforados descrita en la literatura,<sup>69</sup> se decidió explorar el uso de los fragmentos 2-(metil(fenil)amino)etanol y 2-(2-(metil(fenil)amino)epoxi)etanol como unidades reactivas. Estos fragmentos se insertaron en la estructura de un colorante azoico y se evaluó su respuesta en presencia de simulantes de gases nerviosos. El mecanismo de la respuesta era el mismo que para el fragmento **I**: (i) fosforilación del grupo hidroxilo y (ii) posterior ciclación intramolecular para dar los cationes aziridinio (**VII**) y morfolinio (**VIII**) correspondientes.

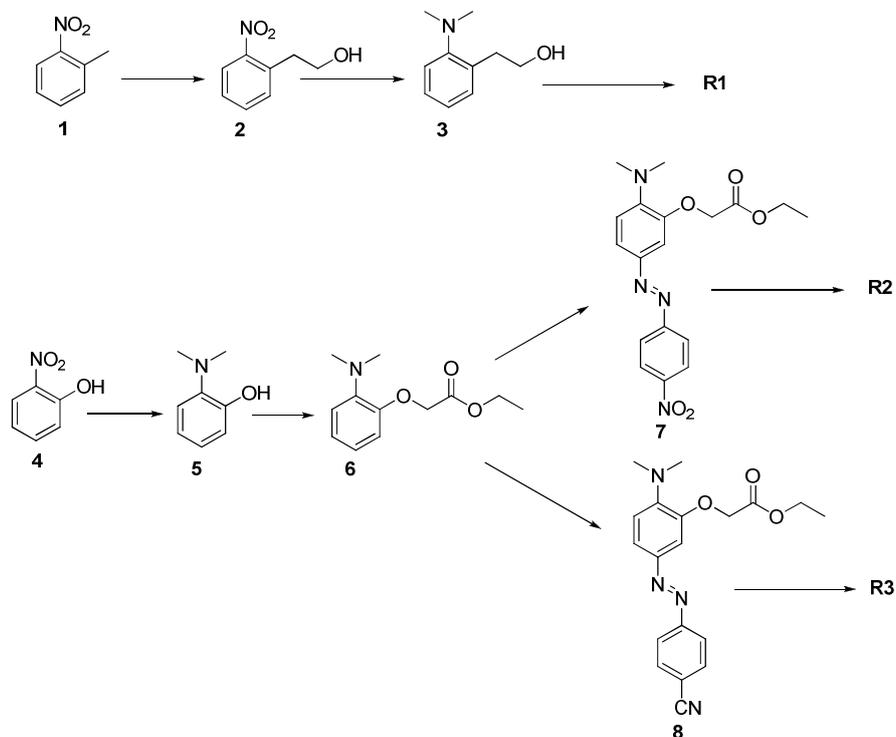
### 2.3. Síntesis, caracterización y propiedades espectroscópicas.

En la **Figura 2.4** se muestran las estructuras de los reactivos cromogénicos **R1-R6** que se han sintetizado y la del producto comercial disperse red 13 (**DR**). Como se puede observar los reactivos **R1-R3** llevan la cadena alquílica con el grupo hidroxilo incorporada en un anillo aromático mientras que los receptores **R4-R6** y el **DR** la llevan localizada sobre el átomo de nitrógeno del fragmento anilina.



**Figura 2.4** Reactivos cromogénicos **R1-R6** y **DR**.

<sup>69</sup> R. S. Edmurson, *Comprehensive Organic Chemistry*. 6v. Pergamon, Oxford, **1979**, Vol 2, Cap 10.3, pp 1189.



**Figura 2.5** Rutas sintéticas seguidas para la obtención de los cromoreactivos **R1-R3**.

El reactivo cromogénico **R1** se preparó mediante una reacción de copolimerización entre el 2-(2-(*N,N*-dimetilamino)fenil)etanol (**3**) con la sal de diazonio de la 4-nitroanilina utilizando un procedimiento clásico para la preparación de colorantes azoicos (**Figura 2.5**).<sup>70</sup>

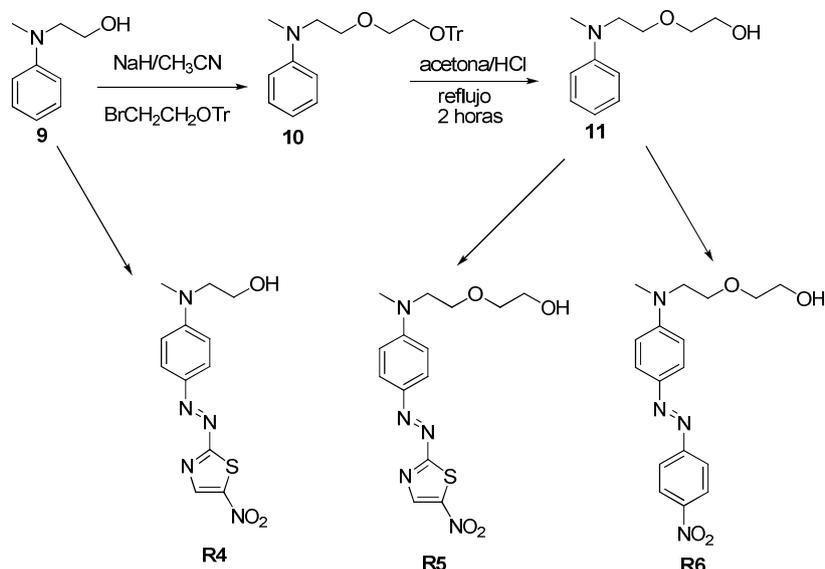
El producto **3** se sintetizó siguiendo un procedimiento descrito en la literatura.<sup>71</sup> En primer lugar se transformó el 2-nitrotolueno (**1**) en 2-(2-nitrofenil)etanol (**2**) desprotonando el metilo con fenóxido sódico y condensando con paraformaldehído en DMSO. Posteriormente se llevó a cabo la reducción catalítica, con hidrógeno y Pd/C, en presencia de formaldehído obteniendo el 2-(2-(*N,N*-dimetilamino)fenil)etanol (**3**).<sup>72</sup> Los reactivos cromogénicos **R2** y **R3** se prepararon a partir del 2-nitrofenol (**4**), que primero se transformó en 2-(*N,N*-dimetilamino)fenol (**5**) por reducción catalítica del grupo nitro en presencia de formaldehído y posteriormente se

<sup>70</sup> a) T. Gunnlaugsson, J. P. Leonard, N. S. Murray, *Org. Lett.* **2004**, 6, 1557; b) B. C. McKusick, R. E. Heckert, T. L. Cairns, A. A. Coffman, H. F. Mower, *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, 80, 2806.

<sup>71</sup> P. L. Minin, J. C. Waltou, *J. Org. Chem.* **2003**, 68, 2960.

<sup>72</sup> I. O. Kady, B. Tan, *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 4031.

O-alkiló con bromoacetato de etilo para dar lugar al 2-(2-dimetilaminofenoxi) acetato de etilo (**6**). El producto **6** se copuló con las sales de diazonio de la 4-nitroanilina y del 4-aminobenzonitrilo dando lugar a los compuestos **7** y **8** respectivamente. Finalmente, la reducción del grupo éster a alcohol con hidruro de aluminio y litio de los compuestos **7** y **8** dió lugar a los receptores finales **R2** y **R3**.



**Figura 2.6** Rutas sintéticas seguidas para la obtención de los cromoreactivos **R4-R6**.

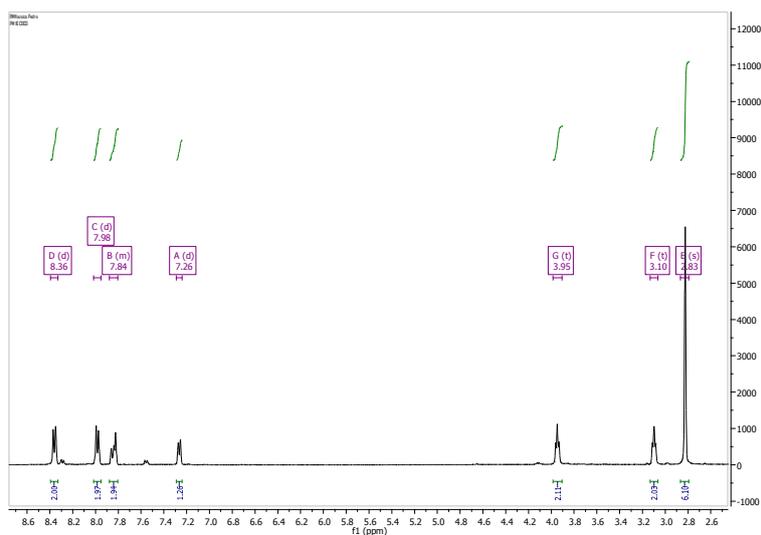
Para la obtención de los reactivos cromogénicos **R4-R6** mostrados en la **Figura 2.6** se partió 2-(2-(*N*-metil-*N*-fenil)etanol (**9**). La copulación directa de **9** con la sal de diazonio del 2-amino-5-nitrotiazol haciendo uso de los procedimientos descritos en la bibliografía<sup>73</sup> dió lugar a la formación del receptor **R4**, con buen rendimiento. Para la obtención de los reactivos **R5** y **R6** también se partió del compuesto 2-(metil(fenil)amino)etanol (**9**). Así, **9** se hizo reaccionar con el éter de tritilo del bromoetanol (obtenido mediante reacción de alquilación entre el bromoetóxido y cloruro de tritilo) dando lugar al compuesto **10**. El grupo protector tritilo del compuesto **10** se eliminó por tratamiento con ácido clorhídrico en acetona obteniéndose el alcohol **11**. Finalmente, la copulación de **11** con las sales de diazonio del 2-amino-5-nitrotiazol y de la 4-nitroanilina dió lugar a los reactivos cromogénicos **R5** y **R6** (para mas detalles sobre la síntesis de los productos descritos ver los procedimientos experimentales al final del capítulo).

Todos los reactivos cromogénicos sintetizados, así como sus precursores, fueron caracterizados por técnicas de resonancia magnética

<sup>73</sup> Y. Qian, G. Xiao, G. Wang, B. Lin, Y. Cui, Y. Sun, *Dyes and Pigments*, **2007**, 75, 218.

nuclear de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ . Además se realizaron análisis de espectrometría de masas de alta resolución (HRMS) de los productos finales, antes de su evaluación como posibles sondas colorimétricas para los simulantes de agentes de guerra química. A continuación y a título indicativo se explica con detalle la caracterización, por resonancia magnética nuclear de protón y de carbono-13, del reactivo cromogénico **R1** que nos permite confirmar la estructura química de la sonda colorimétrica sintetizada.

El espectro de  $^1\text{H}$ -RMN, realizado en  $\text{CDCl}_3$ , del reactivo cromogénico **R1** se muestra en la **Figura 2.7**. La señal de los metilos situados sobre el átomo de nitrógeno de la anilina aparecen a 2.83 ppm como un singlete que integra 6 protones, mientras que los metilenos de la cadena etanólica del receptor aparecen a 3.10 ppm (tripleto,  $J=5.8$  Hz dos hidrógenos, del metileno enlazado al anillo aromático) y 3.95 ppm (tripleto,  $J=5.7$  Hz dos hidrógenos, del metileno unido al grupo hidroxilo). En cuanto a la parte aromática, en la zona de campo bajo, se pueden apreciar la señal del protón aromático situado en orto al grupo *N,N*-dimetilamino a 7.26 ppm (doblete,  $J=8$  Hz) mientras que los dos hidrógenos del anillo de *N,N*-dimetilanilina más próximos al grupo azo aparecen como un multiplete a 7.84 ppm. Los hidrógenos del anillo nitrobencénico aparecen a 7.98 ppm (doblete,  $J=8.6$  Hz, dos hidrógenos) los que están mas próximos al grupo azo y a 8.36 ppm (doblete,  $J=8.6$  Hz, dos hidrógenos) los que se encuentran en orto al grupo nitro.



**Figura 2.7.** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del cromoreactivo **R1** ( $\text{CDCl}_3$ ).

En la **Figura 2.8** se observa el espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN del reactivo cromogénico **R1** realizado en  $\text{CDCl}_3$ . En la zona de campo alto se observan

señales centradas a 35.95 (carbono del metileno enlazado al anillo aromático), 44.73 (metilos situados sobre el átomo de nitrógeno de la anilina) y a 63.96 ppm (carbono metilénico enlazado al oxígeno del alcohol). En la parte aromática, en la zona de campos más bajos, se observan las señales de los cinco carbonos cuaternarios que existen en la molécula. La señal que aparece a 156.86 ppm se asigna al carbono que soporta el dimetilamino. A 156.13 ppm se ve la señal del carbono cuaternario del anillo nitrobenzénico enlazado al grupo azo. Las señales situadas a 148.93 ppm y 148.52 ppm fueron asignadas a los carbonos que están enlazados al grupo nitro y al carbono del anillo de anilina enlazado al grupo azo, respectivamente. Las señales de los CH aromáticos se asignaron de la siguiente manera: existen dos pares de CH en el anillo nitrobenzénico que son magnéticamente equivalentes y por tanto corresponden a las señales más intensas. La señal situada a 124.86 ppm fue asignada a los CH más próximos al grupo nitro mientras que la situada a 123.33 corresponde a los CH del anillo nitrobenzénico cercanos al grupo azo. La señal a 125.56 ppm es del carbono situado entre los cuaternarios de la cadena etanólica y el grupo azo. Los dos CH restantes aparecen a 120.06 ppm el más próximo al dimetilamino y a 124.07 ppm el carbono vecinal a este. Esta asignación se ha llevado a cabo en base a los experimentos de correlación a larga distancia  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (HMBC).

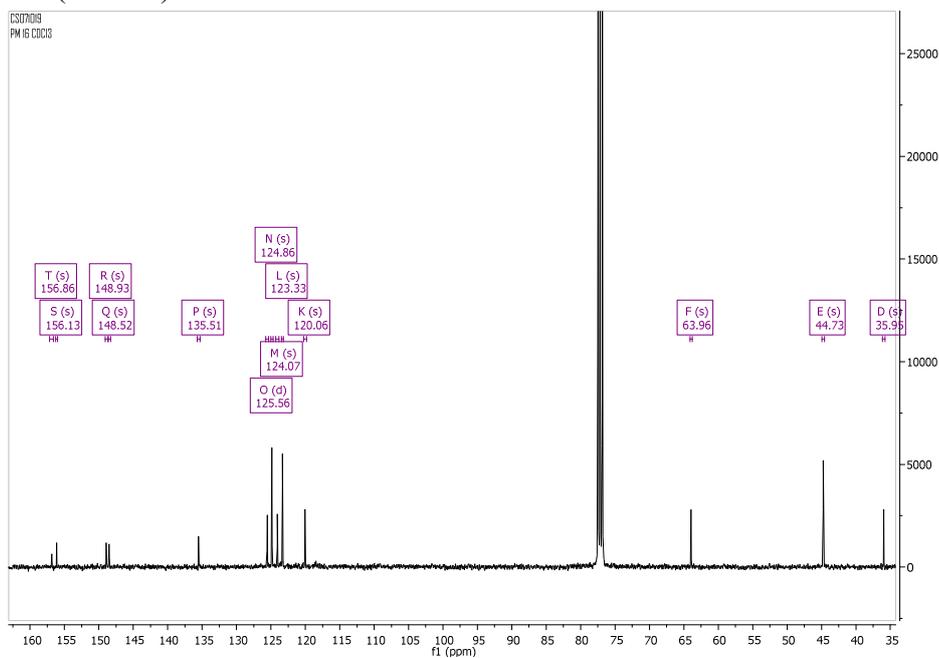


Figura 2.8. Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN del cromoreactivo R1 ( $\text{CDCl}_3$ ).

**Tabla 2.1.** Absorciones UV de los ligandos **R1-R6** y **DR** ( $1.0 \times 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup>) en agua/acetonitrilo (3:1 v/v, MES  $1 \times 10^{-1}$  mol dm<sup>-3</sup>).

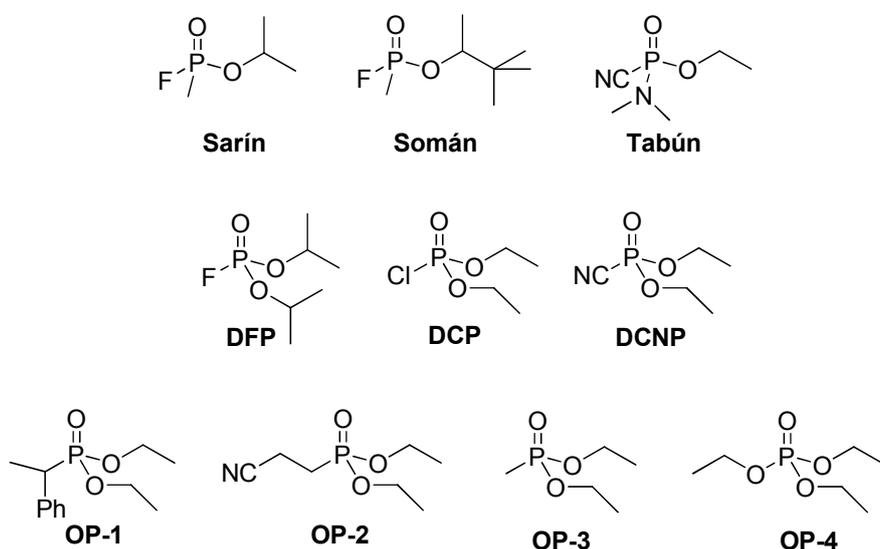
Receptor	$\lambda_{\max}$ (nm)	Log $\epsilon$ (M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )	Color
<b>R1</b>	407	3.9	Amarillo
<b>R2</b>	428	4.1	Amarillo
<b>R3</b>	412	4.1	Amarillo
<b>R4</b>	602	4.7	Azul
<b>R5</b>	602	4.7	Azul
<b>R6</b>	499	4.5	Rojo
<b>DR</b>	518	4.5	Rojo

Las propiedades espectroscópicas UV-Vis de los colorantes azoicos **R1-R6** y **DR** se muestran en la **Tabla 2.1**. Como se puede apreciar, estos reactivos colorimétricos ( $1.0 \times 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup>) en agua/acetonitrilo (3:1 v/v, MES  $1 \times 10^{-1}$  mol dm<sup>-3</sup>) presentan bandas de absorción intensas ( $\log \epsilon > 4$ ) en la región visible del espectro electromagnético. Los reactivos **R1-R3** muestran sus bandas de absorción UV-Vis centradas alrededor de 410 nm aproximadamente. Esta banda tiene un carácter de transferencia de carga debido a la presencia de un grupo dimetilamino con carácter electrón-dador y un grupo nitrofenilo (para **R1** y **R2**) o benzonitrilo (para **R3**) con capacidad electrón-aceptora. Como consecuencia de esta banda de absorción las disoluciones de los tres receptores cromogénicos son amarillas. La influencia de las distintas propiedades electrónicas de los sustituyentes en el sistema conjugado se hace patente en los valores recogidos en la tabla. Así, si comparamos los receptores **R1** y **R2** podemos observar que el incremento de la capacidad dadora del grupo situado en la posición orto al grupo dimetilamino (la cadena alquílica en **R1** ha sido sustituida por un éter con mayor capacidad electrón-dadora en el receptor **R2**) provoca un desplazamiento batocrómico de la banda de transferencia de carga de 21 nm. El efecto del cambio en la capacidad aceptora del grupo electrón-atrayente es también un desplazamiento batocrómico (16 nm) de la banda de transferencia de carga desde 412 nm para el receptor cromogénico **R3** (funcionalizado con un grupo ciano) hasta 428 nm para el receptor cromogénico **R2** (funcionalizado con un grupo nitro). Si comparamos los reactivos **R5** y **R6** también podemos apreciar que el anillo de 5-nitrotiazol posee una mayor capacidad electrón-aceptora que el anillo de nitrofenilo y esto induce un desplazamiento batocrómico de la banda de 103 nm que se traduce en un cambio de color de sus disoluciones de rojo en **R6** a azul en **R5**. El mismo razonamiento es aplicable para **R4** y **DR** aunque en este caso

el desplazamiento batocrómico de la banda para **R4** si lo comparamos con **DR** es menor, de 84 nm, ya que la presencia del átomo de cloro en el anillo electrón-aceptor también provoca un desplazamiento batocrómico al aumentar la capacidad electrón-aceptora de dicho anillo.

## 2.4. Reactividad con simulantes de agentes nerviosos.

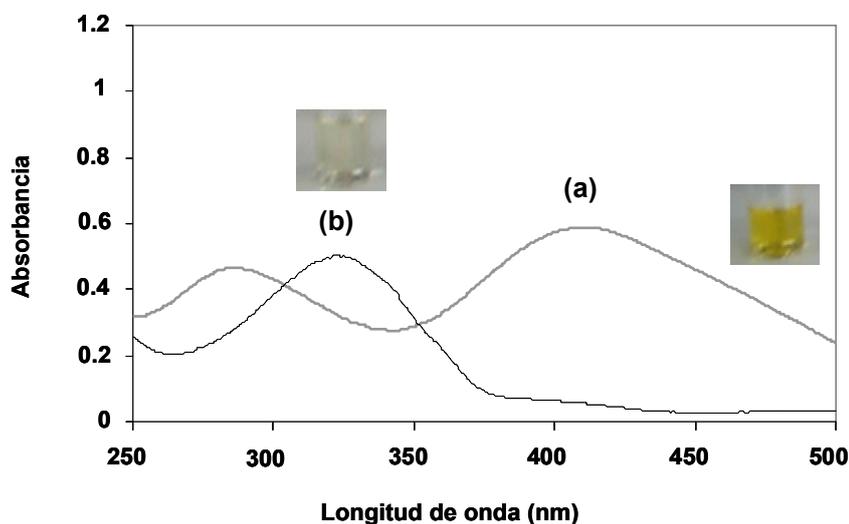
En primer lugar, se evaluó la reactividad de los reactivos cromogénicos preparados con clorofosfato de dietilo (DCP), fluorofosfato de diisopropilo (DFP) y cianofosfonato de dietilo (DCNP) en acetonitrilo (**Figura 2.9**). Debido a la alta toxicidad de los agentes nerviosos sarín, somán y tabún, los compuestos relacionados DCP, DFP y DCNP se utilizan como modelos o simulantes para el diseño de indicadores y sistemas de detección, debido a su estructura química similar, análoga reactividad y a la menor toxicidad que presentan por ser menos persistentes.



**Figura 2.9** Estructura química de diferentes compuestos organofosforados.

En primer lugar se realizó un estudio del comportamiento de los receptores cromogénicos **R1-R3** en acetonitrilo. Así, la disolución en acetonitrilo del receptor **R1** ( $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) presenta una banda de absorción intensa centrada a 412 nm (la disolución es de color amarillo) que se puede asignar a un colorante azoico con una transferencia de carga moderada. También aparece, en la zona UV, una banda a 280 nm típica de

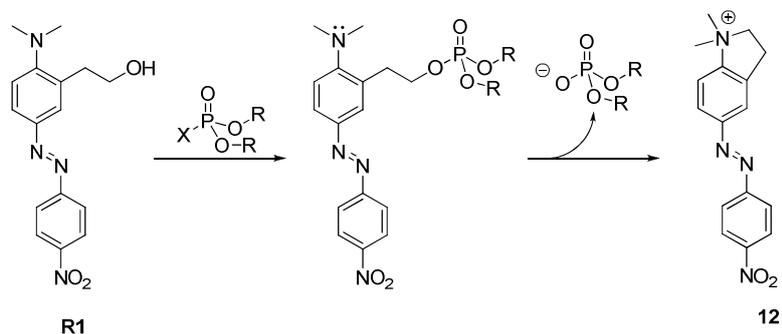
una transición electrónica localizada en uno de los anillos aromáticos del receptor **R1** (**Figura 2.10**). A continuación se estudió el efecto de la adición de 100 equivalentes de DCP sobre una disolución del receptor **R1** en acetonitrilo. Al adicionar este simulante se observó un desplazamiento hipsocrómico de 85 nm (la nueva banda se sitúa a 325 nm) asociado a una decoloración completa. Se observaron los mismos resultados, desplazamiento hipsocrómico de 85 nm y decoloración, al añadir 100 equivalentes de DFP y DCNP sobre disoluciones del receptor **R1** en acetonitrilo.



**Figura 2.10** Espectro de absorción UV-vis de: (a) receptor cromogénico **R1** (acetonitrilo,  $1 \times 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup>), (b) **R1** con 100 equivalentes de DCP.

El hecho de que la adición de los tres simulantes de gases nerviosos de lugar a la misma banda centrada a 325 nm es indicativo de que el producto final de la reacción del DCP, DFP y DCNP con **R1** es el mismo. Además, el desplazamiento de la banda hacia longitudes de onda menores es consistente con el mecanismo que se muestra en la **Figura 2.11**. El grupo hidroxilo del receptor **R1** sufre una reacción de fosforilación dando lugar a un fosfato que, posteriormente, sufre una reacción de ciclación intramolecular, inducida por el átomo de nitrógeno de la agrupación *N,N*-dimetilnilina. Como consecuencia de esta reacción de ciclación intramolecular se forma una sal de amonio cuaternario con la consiguiente pérdida del carácter dador del átomo de nitrógeno. Este proceso de ciclación es el responsable de la decoloración observada y la sal de amonio cuaternaria formada es la misma independientemente del simulante

empleado. Idénticos resultados se obtuvieron con los reactivos cromogénicos **R2** y **R3** (desplazamiento hipsocrómico y decoloración).



**Figura 2.11** Mecanismo implicado en la respuesta cromogénica observada con el reactivo cromogénico **R1**.

Posteriormente se estudió la selectividad de los receptores **R1-R3** frente a otros derivados organofosforados como son los productos OP1-OP4 (ver estructuras en la **Figura 2.9**). Ninguno de los tres receptores fue capaz de dar algún tipo de interacción con estos simulantes ya que no se observaron cambios en los espectros UV-Vis de las disoluciones en acetonitrilo ( $1.0 \times 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup>). Estos resultados indican que es muy importante que el derivado organofosforado posea, en su estructura, un buen grupo saliente para que pueda tener lugar la reacción de fosforilación del alcohol e inducir así la ciclación y el cambio de color de los receptores **R1-R3**.



**Figura 2.12** Cambios de color observados para **R1** (izquierda) y **R3** (derecha) ( $1.0 \times 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup>) en agua/acetonitrilo (3:1 v/v) tamponada a pH 5.6 con MES ( $1.0 \times 10^{-1}$  mol dm<sup>-3</sup>) después de la adición de los simulantes de agentes nerviosos DCP, DFP y DCNP.

Motivados por los resultados favorables obtenidos en acetonitrilo y para confirmar que los cambios de color observados se debían exclusivamente a la reacción de detección de los simulantes y no a

reacciones de tipo ácido-base con los productos de una posible hidrólisis parcial de los simulantes (que inducirían cambios de color muy similares) y también para asegurar una posible aplicación del cromoreactivo en la detección de agentes de guerra en muestras reales acuosas se realizaron experimentos con **R1-R3** en mezclas acetonitrilo-agua 25:75 v/v tamponadas a pH 5.6 con MES (Ácido MorfolinEtilSulfónico) ( $1.0 \times 10^{-1} \text{ mol dm}^{-3}$ ). En estas condiciones, las disoluciones acuosas del receptor **R1** ( $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) presentan la banda de transferencia de carga centrada a 407 nm que sufre un desplazamiento hipsocrómico de 125 nm al añadir 100 equivalentes de una disolución de los simulantes DCP, DFP y DCNP (**Figura 2.10**). Idénticos resultados se obtuvieron con los reactivos cromogénicos **R2** y **R3** (desplazamiento hipsocrómico y decoloración) en mezclas agua/acetonitrilo 3:1 v/v tamponadas a pH 5.6 (MES,  $1.0 \times 10^{-1} \text{ mol dm}^{-3}$ ). Los desplazamientos de las bandas al adicionar DCP a disoluciones acuosas de los receptores **R1-R3** se pueden observar en la **Tabla 2.2**.

**Tabla 2.2.** Absorciones UV-Visible de los receptores **R1-R3** puros ( $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) en agua/acetonitrilo (3:1 v/v, MES  $1.0 \times 10^{-1} \text{ mol dm}^{-3}$ ) y en presencia de DCP.

Receptor	$\lambda_{\text{max}}(\text{nm})$	$\text{Log } \epsilon(\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1})$	Receptor + DCP	$\lambda_{\text{max}}(\text{nm})$	$\text{Log } \epsilon(\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1})$
<b>R1</b>	407	3.9	<b>R1</b> <sup>(a)</sup>	282	4.0
<b>R2</b>	428	4.1	<b>R2</b> <sup>(b)</sup>	314	4.4
<b>R3</b>	412	4.1	<b>R3</b> <sup>(c)</sup>	314	4.3

(a) Se utilizaron 10 equivalentes de DCP. (b) Se utilizaron 700 equivalentes de DCP. (c) Se utilizaron 100 equivalentes de DCP.

Como se muestra en la **Tabla 2.2** el desplazamiento hipsocrómico en la banda de transferencia de carga para los dosímetros **R1-R3** en presencia del simulante DCP es apreciable ( $\Delta\lambda$  de 125, 114 y 98 nm para **R1**, **R2** y **R3** respectivamente). Este desplazamiento hipsocrómico, después de la adición de los simulantes de agentes de guerra química, está de acuerdo con el mecanismo propuesto en el que la amina aromática con carácter electrón-dador, en el colorante de transferencia de carga dador-aceptor, se transforma en una sal de amonio cuaternario y produce un desplazamiento hacia el azul de la banda de absorción debido a la modulación de los momentos dipolares del estado fundamental y de los estados excitados y, por lo tanto, produce un cambio en la energía relativa del HOMO y el LUMO.

También se realizaron estudios de selectividad con los reactivos cromogénicos **R1-R3** en mezclas agua/acetonitrilo 3:1 v/v tamponadas a pH 5.6 (MES,  $1.0 \times 10^{-1} \text{ mol dm}^{-3}$ ). De esta forma se observó que la adición de los compuestos organofosforados OP1-OP4 (ver **Figura 2.9** para sus

estructuras) no fue capaz de inducir ningún cambio apreciable en el espectro UV-visible de los receptores cromogénicos. La selectividad observada es debida al hecho de que OP1-OP4 no poseen, en su estructura, un buen grupo saliente para que puedan tener lugar las reacciones de fosforilación y posterior ciclación e inducir así el cambio de color de los receptores.

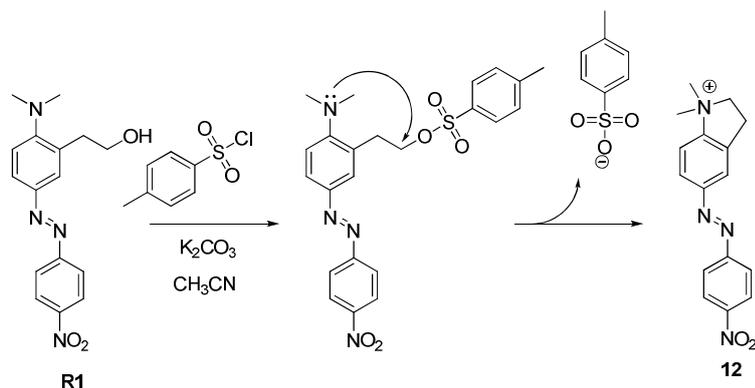


Figura 2.13 Ruta sintética empleada para la obtención de **12**.

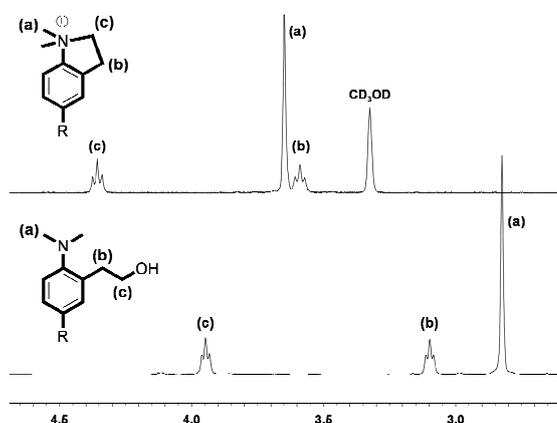
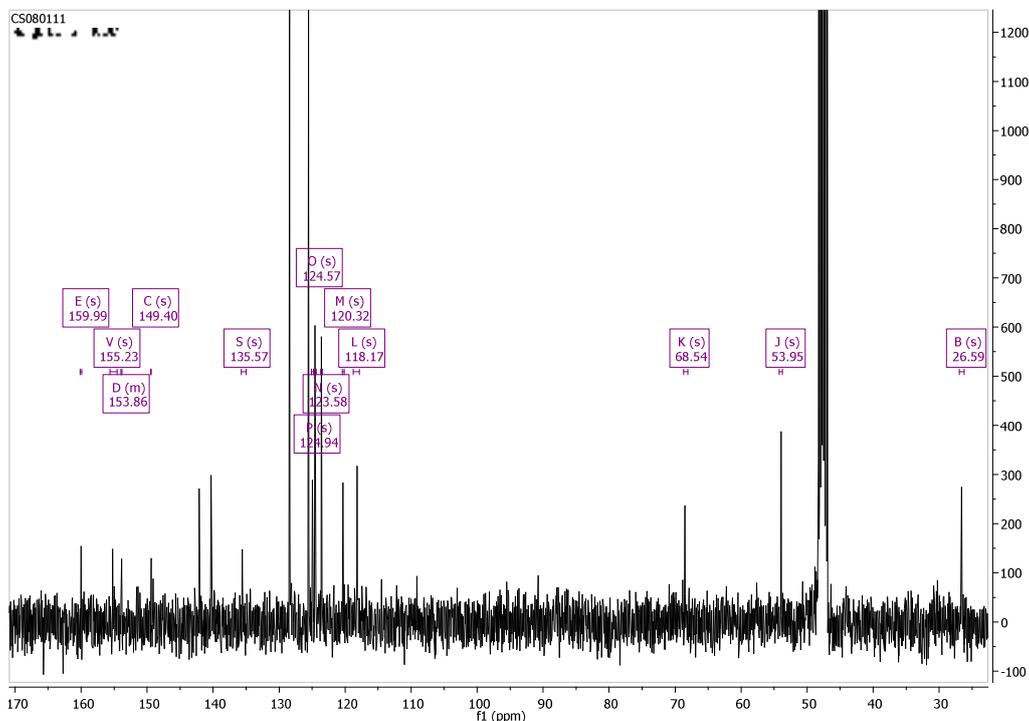


Figura 2.14 Espectros de  $^1\text{H}$ -RMN (zona alifática) de los compuestos **R1** (abajo) y **12** (arriba) en MeOD.

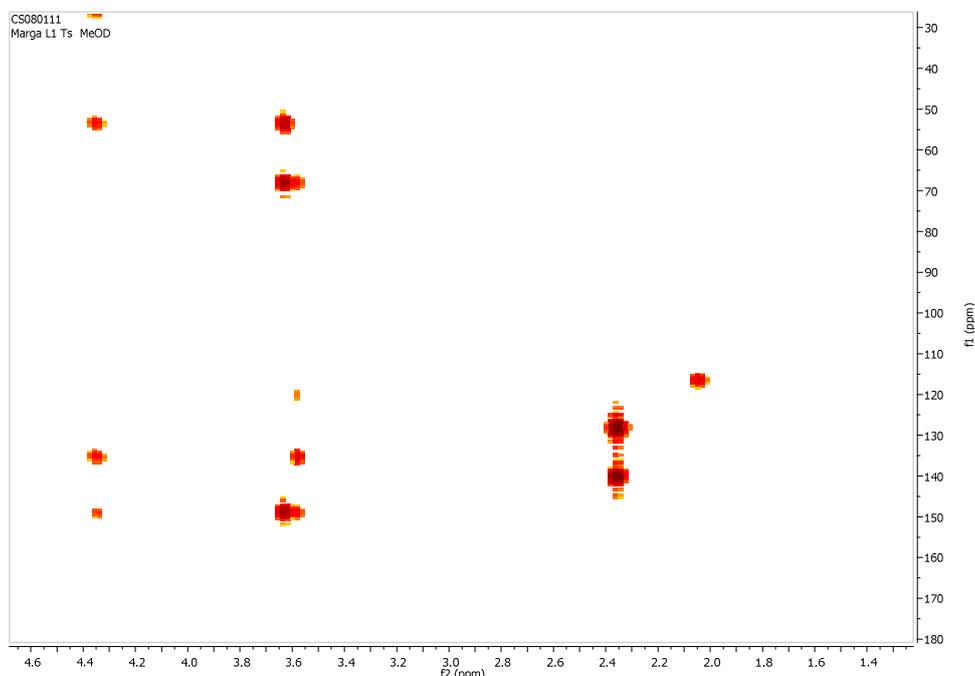
Como una prueba adicional para comprobar el mecanismo implicado en la respuesta cromogénica observada, se preparó el compuesto **12** a través de la ruta sintética que se muestra en la **Figura 2.13**. Así, se llevó a cabo la reacción de tosilación del reactivo cromogénico **R1** con cloruro de *p*-toluensulfonilo en presencia de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  en acetonitrilo. De esta forma se obtuvo el correspondiente derivado tosilado que sufrió una ciclación

espontánea dando lugar al producto **12**. La formación del producto **12** se detecta fácilmente en el espectro  $^1\text{H}$ -RMN como se puede ver en la **Figura 2.14**. Se puede observar un triplete centrado a 4.36 ppm que se puede asignar a un metileno contiguo a un átomo de nitrógeno cargado de una sal de amonio cuaternario. Además también se observa que la señal de los metilos situados sobre el átomo de nitrógeno se ha desplazado hasta 3.65 ppm corroborando la formación de dicha sal.



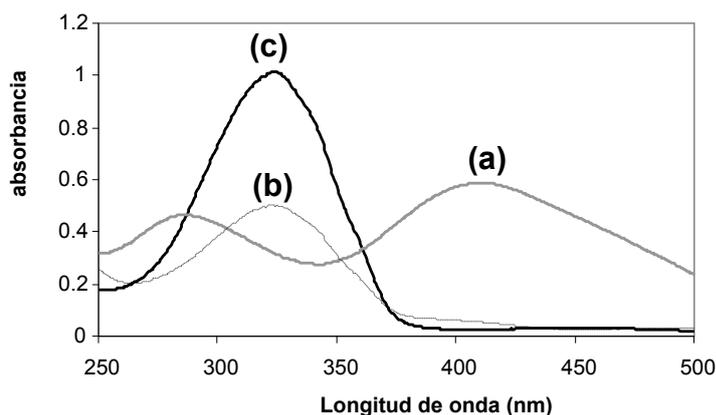
**Figura 2.15** Espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN del compuestos **12** en MeOD.

En la **Figura 2.15** se muestra el espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN del producto ciclado **12** en forma de paratoluensulfonato (las señales aromáticas de este anión son las que no están marcadas). De todas las señales de los carbonos de la molécula las más interesantes para poder explicar la formación del ciclo de 5 miembros son la que aparece a 54.0 ppm que corresponde a los metilos situados sobre el N de amonio y la que aparece a 149.4 ppm y que corresponde al carbono aromático enlazado al N anteriormente mencionado.



**Figura 2.16** Espectro HMBC-RMN del producto **12**.

La formación del producto ciclado **12** se puede confirmar sin ambigüedad tras analizar los espectros de correlación  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (COSY) y  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (HSQC y HMBC) de los cuales se extrae la asignación de señales de  $^1\text{H}$  y de  $^{13}\text{C}$  (no se muestran todos estos espectros por no ser prolijo). En concreto cabe destacar las correlaciones  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a larga distancia que se muestran en la ampliación del espectro HMBC (Heronuclear Multiple Bond Coherence). Como se observa en la parte izquierda de la **Figura 2.16**, aparecen las señales correspondientes a los acoplamientos entre los hidrógenos situados a 4.36 ppm del metileno enlazado directamente al átomo de nitrógeno de la sal de amonio cuaternaria y las señales de  $^{13}\text{C}$  correspondientes a los metilos (54 ppm) situados sobre dicho N (correlación a 3 enlaces) y al carbono aromático (149 ppm) enlazado directamente con el mencionado N cuaternario (correlación a 3 enlaces). El producto **12** obtenido por reacción entre el cromoreactivo **R1** y el simulante DCP mostró el mismo patrón de señales, confirmando por tanto el mecanismo implicado en la respuesta cromogénica observada. Además, los datos de espectroscopía UV-Visible que se muestran en la **Figura 2.17** confirman que el producto obtenido a través de la tosiliación presenta la misma banda de absorción que las observadas al hacer reaccionar el reactivo cromogénico **R1** con los correspondientes simulantes de agentes nerviosos.

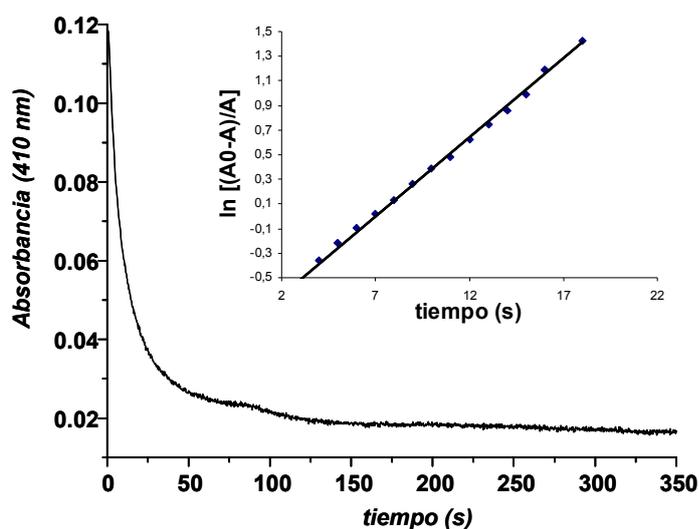


**Figura 2.17** Espectro de absorción de: (a) reactivo cromogénico **R1**(acetonitrilo,  $1.0 \times 10^{-5}$  mol  $\text{dm}^{-3}$ ), (b) **R1** con 100 equivalentes de DCP y (c) producto **12**.

En claro contraste con los resultados expuestos arriba, los espectros UV-visible de los receptores **R4**, **R5**, **R6** y **DR** no mostraron ningún cambio significativo al añadir 100 equivalentes de los simulantes DCP, DFP y DCNP tanto en acetonitrilo como en mezclas agua/acetonitrilo 3:1 v/v tamponadas a pH 5.6 (MES,  $1.0 \times 10^{-1}$  mol  $\text{dm}^{-3}$ ). Esta ausencia de respuesta cromogénica se atribuyó a la mayor facilidad de ciclación por parte de los derivados fosforilados de **R1-R3**, debido a la conformación restringida que presentan, cuando se comparan con los receptores **R4-R6** y **DR**. Así, en los receptores **R1-R3** el átomo de nitrógeno nucleofílico y el hidroxilo fosforilado están conectados mediante dos átomos de carbono aromáticos situados en un plano. Esta planaridad impone una conformación restringida de la cadena de etilos que contiene el fosfato y favorece la ciclación intramolecular. Por el contrario, en los receptores **R4-R6** y **DR** la cadena que contiene el grupo hidroxilo esta conectada directamente sobre el átomo de nitrógeno que tiene que inducir la ciclación. La ausencia de carbonos  $\text{sp}^2$ , entre el átomo de nitrógeno nucleofílico y el hidroxilo fosforilado, induce una libertad conformacional mayor que hace que no se produzca la ciclación intramolecular responsable de la respuesta cromogénica observada en los receptores **R1-R3**.

## 2.5. Estudios cinéticos y límites de detección.

La respuesta cromogénica observada con los receptores **R1-R3** está basada en dos reacciones consecutivas, una fosforilación de un hidroxilo alifático y una posterior ciclación intramolecular que da lugar a la formación de una sal de amonio cuaternario. Para comprender mejor la aportación de cada una de las reacciones individuales al mecanismo de la respuesta cromogénica se estudió el proceso global bajo condiciones de una cinética de pseudo primer orden con un exceso de simulante. Para ello se emplearon disoluciones de los reactivos cromogénicos **R1-R3** en agua-acetonitrilo (3:1 v/v) tamponadas con MES a pH 5.6 a las que se adicionaron los simulantes DCP, DFP y DCNP (10, 100 y 10 equivalentes respectivamente para **R1**). Siguiendo los cambios en la intensidad de absorbancia de la banda de transferencia de carga y representando  $\ln [(A_0 - A) / A]$  frente al tiempo (donde  $A_0$  es la absorbancia final y  $A$  es la absorbancia en un momento dado) nos permitió la determinación de las constantes de velocidad ( $k$ ) y los tiempos de vida media ( $t_{1/2} = \ln 2/k$ ) para la reacción entre los simulantes de agentes nerviosos y los reactivos cromogénicos **R1-R3**.



**Figura 2.21.** Cambios en la intensidad de la banda de absorción centrada a 410 nm después de la reacción del reactivo cromogénico **R1** con DCP. La gráfica interior indica una cinética de primer orden.

La **Figura 2.21** muestra la disminución de absorbancia de la banda de transferencia de carga centrada a 410 nm del reactivo cromogénico **R1** después de la reacción con el DCP. Con todos los simulantes empleados, la reacción es relativamente rápida y los cambios en el espectro UV-Visible se observan después de pocos segundos. Como se ha sugerido en reacciones similares, la reacción del alcohol con los derivados de fosfato para formar el éster de fosfato intermedio es lenta en relación con la ciclación intramolecular. Sin embargo, para un determinado simulante, como se puede observar en la **Tabla 2.3**, las constantes de velocidad son distintas dependiendo del reactivo cromogénico empleado. Este hecho sugiere que la reacción de ciclación también juega un papel no despreciable en la constante de velocidad global de la reacción, pese a que sea el paso supuestamente más rápido.

**Tabla 2.3.** Límites de detección y datos cinéticos para los reactivos cromogénicos **R1-R3**.

<i>Cromoreactivo</i>	<b>R1</b>			<b>R2</b>			<b>R3</b>		
	<i>Simulante</i>	DFP	DCP	DCNP	DFP	DCP	DCNP	DFP	DCP
<i>Límite de detección <math>\times 10^3</math> (mol dm<sup>-3</sup>)</i>	1.0	0.1	0.1	10	4.5	8.1	7	1.8	4.1
<i>k (s<sup>-1</sup>)</i>	0.20	0.13	0.061	0.38	0.22	5.11	0.86	0.52	1.35
<i>t<sub>1/2</sub> (s)</i>	3.5	5.3	11.4	1.8	3.1	0.1	0.8	1.3	0.5

En la **Tabla 2.3** también se incluyen los límites de detección medidos para los tres reactivos cromogénicos con los tres simulantes de gases nerviosos empleados. Como se puede observar los límites de detección más bajos se alcanzan con el reactivo cromogénico **R1** ( $1.0 \times 10^{-4}$  mol dm<sup>-3</sup> para DCP y DCNP y  $1.0 \times 10^{-3}$  mol dm<sup>-3</sup> para DFP). Los valores de los límites de detección medidos para el receptor **R1** en presencia de DCP y DCNP son del mismo orden de magnitud que los determinados para otros receptores cromogénicos de simulantes de gases nerviosos descritos en la bibliografía.<sup>52</sup> Por el contrario, los límites de detección obtenidos para los reactivos cromogénicos **R2** y **R3** con los tres simulantes son muy superiores a los medidos para el receptor **R1**. Esto puede ser debido a que los reactivos cromogénicos **R2** y **R3** están funcionalizados con un grupo 2-[2-(*N,N*-dimetilamino)fenoxi] etanol, que posee un átomo de oxígeno adicional, cuando se compara con el 2-(2-(dimetilamino)feniletanol), que es el grupo utilizado en el reactivo **R1**. La presencia de este átomo de oxígeno extra, en los receptores **R2** y **R3**, implica que el ciclo que se forma en el proceso de

reconocimiento es de 6 miembros. Por el contrario, el ciclo que se forma en el caso del reactivo cromogénico **R1** es de 5 miembros, de los cuales 4 están en el mismo plano, dando lugar a una conformación restringida que permite que los grupos a reaccionar se encuentren mas cerca. Esta conformación restringida junto con la mayor proximidad de los grupos reactivos sería la causante de la mayor facilidad y velocidad de formación del producto de ciclación así como de la mayor sensibilidad (menores límites de detección) del reactivo cromogénico **R1**.

## 2.6. Detección en fase gas.

Motivados por los buenos resultados obtenidos con el reactivo cromogénico **R1** en disolución, tanto en acetonitrilo como en fase acuosa, nos planteamos la posibilidad de llevar a cabo una detección de los simulantes de agentes neurotóxicos en fase gas. La detección en fase gaseosa puede ser importante debido a la forma en la que se llevan a cabo los ataques con este tipo de armas.

Para tal fin, se adsorbió el reactivo cromogénico **R1** en sílice (500 mg). Para ello se empaquetó la sílice en un tubo de vidrio y, después, se hizo pasar una disolución (2 mL) en agua/acetonitrilo (3/1 v/v) tamponada a pH 5.6 con MES ( $1 \times 10^{-1} \text{ mol dm}^{-3}$ ) del reactivo cromogénico **R1** a través del sólido. Tras secar parcialmente con aire se obtiene un sólido ligeramente humedecido de color naranja.



**Figura 2.22** Izquierda: tubo de vidrio con el reactivo cromogénico **R1** adsorbido sobre sílice. Derecha: silica gel con el reactivo cromogénico **R1** adsorbido después de haber pasado 1 mL de una disolución de DCP en acetonitrilo ( $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ ).

En una primera experiencia se comprobó que la sonda colorimétrica adsorbida sobre la sílice seguía dando la misma respuesta frente a simulantes de agentes nerviosos que la observada en disolución. Para ello se hizo pasar una disolución de DCP en acetonitrilo ( $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ ) y se observó que se producía una decoloración rápida en pocos segundos. Esta

decoloración es una consecuencia directa de la reacción de ciclación intramolecular que sufría el reactivo **R1** en presencia del DCP.

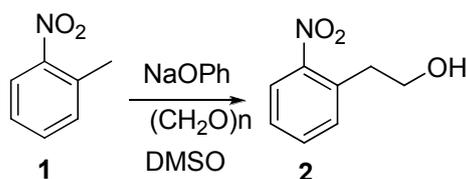


**Figura 2.23** Izquierda: tubo de vidrio con el reactivo cromogénico **R1** adsorbido sobre sílice. Derecha: sílica gel con el reactivo cromogénico **R1** adsorbido después de haber pasado 1 litro de aire con una concentración de DCP de 5 ppm

Finalmente se evaluó la capacidad de detección de simulantes de agentes neurotóxicos de la sonda colorimétrica **R1** en fase gas. Para ello se vaporizó DCP en un matraz de un litro de volumen consiguiendo aire con una concentración de 5 ppm en el simulante y se hizo pasar a través del material con el reactivo cromogénico adsorbido. Se observó la decoloración de la sílice en pocos segundos. Los mismos resultados se obtuvieron cuando se emplearon DCNP y DFP en fase gas. Así, el material híbrido obtenido mediante la absorción del reactivo cromogénico **R1** en sílice es adecuado para la detección de los simulantes de gases nerviosos DCP, DFP y DCNP en fase gas. Podemos suponer que este material podría servir como sistema de alarma para la detección de los mismos gases nerviosos ya que su reactividad es análoga a la de los simulantes empleados en este estudio.

## 2.7. Procedimientos experimentales

### Síntesis de 2-(2-nitrofenil)etanol (**2**)<sup>74</sup>



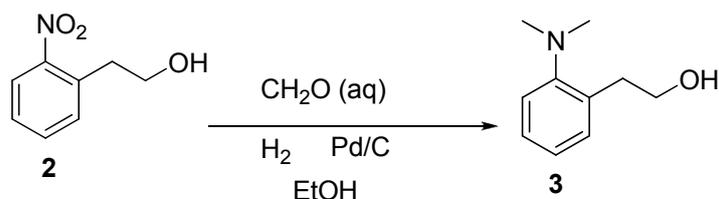
En un matraz de 100 mL provisto de agitación magnética se disuelve el 2-nitrotolueno (**1**) (9.2 g, 6.7 mmol) en 20 mL de DMSO y se añade fenóxido sódico (0.06 g, 0.56 mmol) y paraformaldehído (95%) (0.9 g, 2.5 mmol). La mezcla de reacción se calienta durante 1 hora a 60-70 °C. Transcurrido este tiempo se deja enfriar y se vierte sobre 20 mL de agua. Se extrae con éter dietílico (3 × 15 mL) y la reunión de extractos se lava con salmuera (10 mL) y se seca con MgSO<sub>4</sub> anhidro. El disolvente se elimina en el rotavapor y el residuo que se obtiene se purifica por destilación a presión reducida en horno de bolas (Kugelrohr, 160 °C, 0.2 mmHg) obteniéndose 4.3 g (37%) de 2-(2-nitrofenil)etanol (**2**) en forma de aceite amarillo.

<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.89 (dd, *J* = 8.1, 1.3 Hz, 1H), 7.56 – 7.50 (m, 1H), 7.43 – 7.33 (m, 2H), 3.88 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 3.12 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H).

<sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 150.08, 134.15, 133.40, 133.19, 127.92, 125.13, 62.92, 36.44.

<sup>74</sup>P. L. Minin and J. C. Walton, *J. Org. Chem.*, **2003**, 68, 2960.

### Síntesis de 2-(2-*N,N*-dimetilamino)fenil)etanol (**3**)<sup>75</sup>

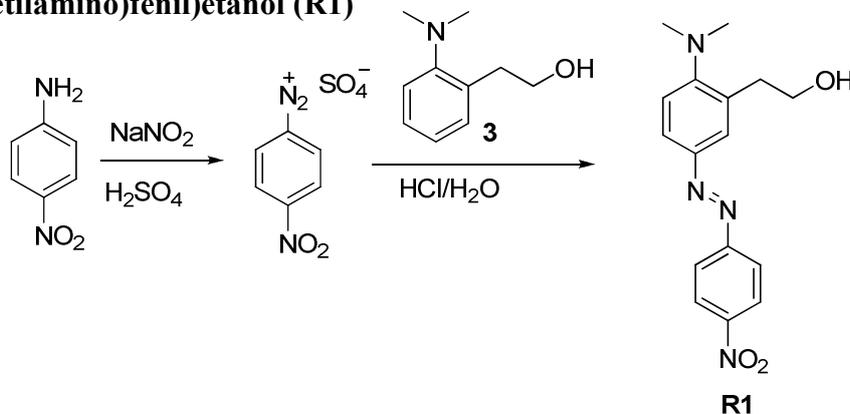


En un frasco de hidrogenación se disuelve 2-(2-nitrofenil)etanol (**2**) (3.3 g, 19.67 mmol) en etanol absoluto (200 mL) y se añade formaldehído (37%) (4.83 mL, 32.3 mmol) y Pd/C (10%) (480 mg). Se mantiene hidrogenando hasta verificar el cese del consumo de hidrógeno. Se filtra a través de Celite y el disolvente se elimina en el rotavapor. El residuo se disuelve en cloroformo y se extrae con una disolución acuosa de HCl (1M, 2 × 50 mL). La fase acuosa se basifica cuidadosamente con una disolución saturada de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y se extrae con cloroformo. Se seca con MgSO<sub>4</sub> anhidro, se filtra y se concentra en el rotavapor. El producto se aísla en forma de aceite amarillo (2.85 g, 84%).

<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.19 – 6.95 (m, 4H), 3.76 (t, J= 5.8 Hz, 2H), 2.91 (t, J= 5.7 Hz, 2H), 2.62 (s, 6H).

<sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 152.55, 136.49, 131.53, 128.04, 125.39, 120.42, 64.67, 45.37, 36.46.

### Síntesis de 2-((*E*)-5-(2-(4-nitrofenil)diazenil)-2-(dimetilamino)fenil)etanol (**R1**)<sup>76</sup>



<sup>75</sup> I. O. Kady and B. Tan, *Tetrahedron Lett.*, **1995**, 36, 4031.

<sup>76</sup> T. Gunnlaugsson, J. P. Leonard and N. S. Murray, *Org. Lett.*, **2004**, 6, 1557; B. C. McKusick, R. E. Heckert, T. L. Cairns, D. D. Coffman and H. F. Mower, *J. Am. Chem. Soc.*, **1958**, 80, 2806.

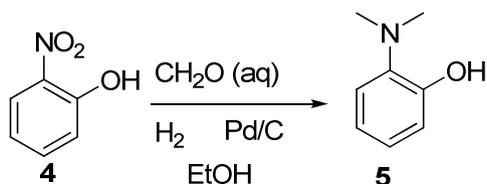
En un matraz de fondo redondo de 100 mL provisto de agitación magnética se añade 4-nitroanilina (0.836 g, 6.05 mmol) y se suspende en 10 mL de agua. Se añade ácido sulfúrico concentrado (1.25 mL, 23 mmol) y se calienta suavemente hasta disolución. La mezcla se sumerge en un baño de agua-hielo (0-5 °C) y se deja durante 5 minutos para que se enfríe. A continuación se añade gota a gota una disolución de NaNO<sub>2</sub> (0.418 g, 6.05 mmol) en 4 mL de agua y se agita durante 10 minutos a 0 °C para garantizar la formación cuantitativa de la sal de diazonio. Transcurrido este tiempo se adiciona gota a gota y durante 15 minutos una disolución de 2-(2-*N,N*-dimetilamino)fenil)etanol (**3**) (1.0 g, 6.05 mmol) en una mezcla de agua (4 mL) y HCl concentrado (1.3 mL, 15.1 mmol). La disolución de color naranja resultante se agita durante 15 minutos a 0 °C y durante 15 minutos más a temperatura ambiente, después se neutraliza con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. La mezcla de reacción (fase acuosa) se extrae con diclorometano (3 × 20 mL) y la reunión de fases orgánicas se seca con sulfato magnésico anhidro. Se filtra para eliminar el MgSO<sub>4</sub> y se concentra en el rotavapor obteniendo un aceite de color rojo oscuro. Se disuelve con la mínima cantidad de AcOEt y se precipita con hexano obteniéndose el producto (1.2 g, 63 %) en forma de sólido de color rojo oscuro.

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.36 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.98 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.88 – 7.80 (m, 2H), 7.26 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 3.95 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H), 3.10 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H), 2.83 (s, 6H).

<sup>13</sup>C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 156.86, 156.13, 148.93, 148.52, 135.51, 125.56, 124.86, 124.07, 123.33, 120.06, 63.96, 44.73, 35.95.

HRMS (EI): *m/z* calculada para C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>: 314.1379 [M]<sup>+</sup> encontrada: 314.1371

#### Síntesis de 2-(*N,N*-dimetilamino)fenol (**5**)



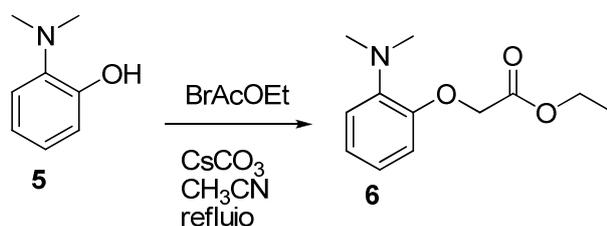
En un frasco de hidrogenación se disuelve 2-nitrofenol (**4**) (2.68 g, 19.3 mmol) en etanol absoluto (34 mL). Se añade el formaldehído en disolución acuosa (36 %) (3.54 mL, 42.46 mmol) y Pd/C (10%) (480 mg) y

se coloca bajo atmósfera de H<sub>2</sub> a 50 psi. Se agita hasta que la presión de hidrógeno deja de disminuir. Transcurrido este tiempo (24 horas aproximadamente) se filtra a través de celite para eliminar el catalizador y se elimina el disolvente destilando a presión reducida en el rotavapor. El producto se purifica por sublimación a 155 °C obteniéndose 1.81 g (69 %) como sólido de color blanco.

<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.10 (dd, *J* = 7.8, 1.5 Hz, 1H), 6.99 (ddd, *J* = 8.0, 7.4, 1.6 Hz, 1H), 6.88 (dd, *J* = 8.0, 1.5 Hz, 1H), 6.83 – 6.76 (m, 1H), 6.58 (s, 1H), 2.59 (s, 6H).

<sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 151.46, 140.58, 125.96, 120.64, 120.02, 114.14, 45.07.

### Síntesis de 2-(2-dimetilaminofenoxi) acetato de etilo (6)

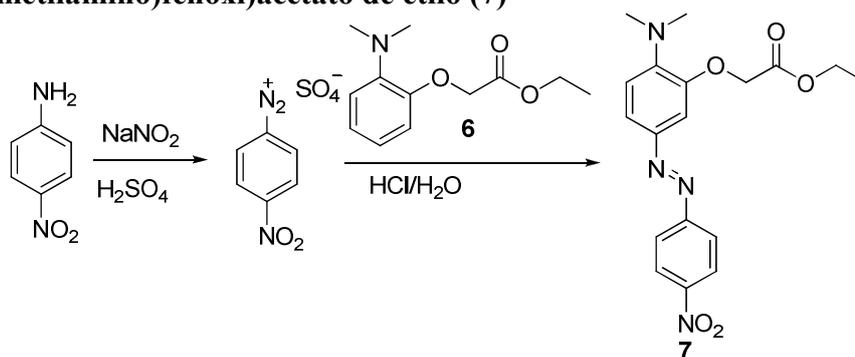


En un matraz de fondo redondo de 250 mL provisto de agitación magnética, atmósfera inerte y refrigerante, se disuelve 2-(*N,N*-dimetilamino)fenol (1.81 g, 13.2 mmol) en 100 mL de acetonitrilo anhidro, se añade carbonato de cesio (12.9 g, 39.6 mmol) y bromoacetato de etilo (98%) (1.50 mL, 13.2 mmol) y se calienta a reflujo durante toda la noche. Se elimina el disolvente en el rotavapor y el residuo que se obtiene se reparte entre agua (100 mL) y acetato de etilo (100 mL). La fase orgánica se separa y la fase acuosa se extrae con acetato de etilo (3 × 30 mL). La reunión de fases orgánicas se secan con sulfato de magnesio anhidro, se filtra y se concentra en el rotavapor obteniéndose 2.54 g (86 %) del producto en forma de aceite de color marrón.

<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 6.90 – 6.79 (m, 3H), 6.70 – 6.66 (m, 1H), 4.61 (s, 2H), 4.17 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.75 (s, 6H), 1.20 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

<sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 169.07, 150.37, 142.87, 122.51, 122.15, 118.49, 113.08, 65.51, 61.19, 43.19, 14.13.

**Síntesis de 2-((E)-5-(2-(4-nitrofenil)diazenil)-2-(dimetilamino)fenoxi)acetato de etilo (7)**

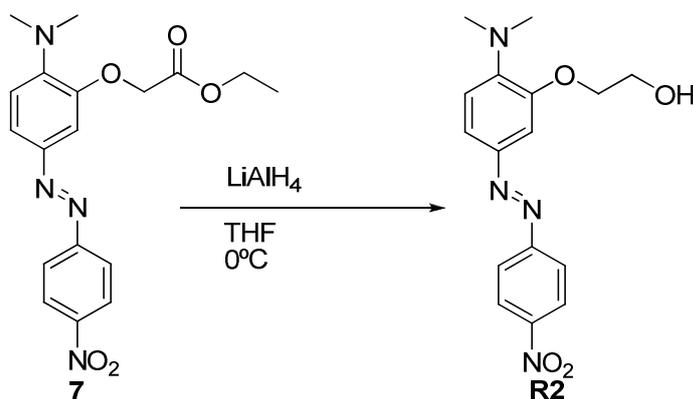


En un matraz de fondo redondo de 100 mL provisto de agitación magnética se añade 4-nitroanilina (182 mg, 1.29 mmol) y se suspende con 10 mL de agua. Se añade ácido sulfúrico concentrado (0.5 mL, 9.2 mmol) y se calienta suavemente hasta disolución. La mezcla se sumerge en un baño de agua-hielo (0-5 °C) y se deja durante 5 minutos para que se enfríe. A continuación se añade gota a gota una disolución de NaNO<sub>2</sub> (89 mg, 1.29 mmol) en 5 mL de agua y se agita durante 10 minutos a 0 °C para garantizar la formación cuantitativa de la sal de diazonio. Transcurrido este tiempo se adiciona gota a gota y durante 30 minutos una disolución del 2-(2-dimetilaminofenoxi) acetato de etilo (**6**) (287 mg, 1.29 mmol) en etanol (30 mL). La disolución de color naranja resultante se agita durante 30 minutos a 0 °C y durante 30 minutos más a temperatura ambiente, después se neutraliza con una disolución acuosa saturada de acetato potásico (30 mL) y parte del producto precipita y se aísla por filtración. La mezcla de reacción (fase acuosa) se extrae con diclorometano (3 × 20 mL) y la reunión de fases orgánicas se seca con sulfato magnésico anhidro. Se filtra para eliminar el desecante y se concentra en el rotavapor obteniendo un aceite de color rojo. El producto, tanto el precipitado como el extraído, se purifica por cromatografía en columna utilizando sílice como fase estacionaria y una mezcla de hexano/acetato de etilo (9/1, v/v) como fase móvil. Se obtienen 280 mg (58 %) del producto puro en forma de sólido de color rojo oscuro.

<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.24 (d, *J* = 9.1 Hz, 2H), 7.85 (d, *J* = 9.1 Hz, 2H), 7.58 (dd, *J* = 8.5, 2.1 Hz, 1H), 7.30 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 6.90 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 4.67 (s, 2H), 4.20 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.96 (s, 6H), 1.22 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

<sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 168.77, 156.58, 150.04, 148.31, 148.04, 147.42, 125.12, 124.12, 123.34, 117.27, 103.87, 65.90, 61.89, 43.25, 14.60.

**Síntesis de 2-((E)-5-(2-(4-nitrofenil)diazenil)-2-(dimetilamino)fenoxi)etanol (R2)**



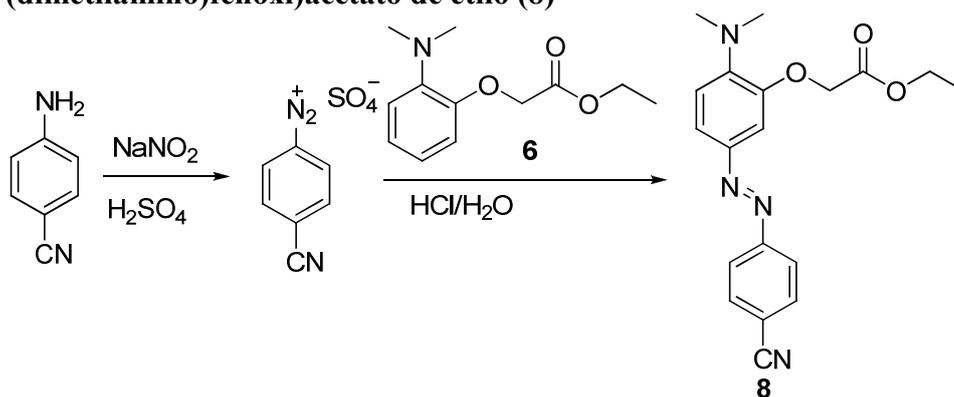
En un matraz de fondo redondo de 100 mL provisto de agitación magnética y atmósfera inerte se disuelve 2-((E)-5-(2-(4-nitrofenil)diazenil)-2-(dimetilamino)fenoxi)acetato de etilo (**7**) (50 mg, 0.1344 mmol) en 20 mL de THF y se pone en un baño de agua-hielo a 0 °C. Sobre esta disolución se añade en pequeñas porciones el LiAlH<sub>4</sub> (0.27 mmol) y se agita durante 1 hora manteniendo la temperatura a 0 °C. Se deja que la temperatura suba hasta alcanzar la temperatura ambiente y se agita durante 1 hora más. Se añade cuidadosamente 1 mL de agua y se agita durante 2 horas. El precipitado se elimina por filtración en embudo cónico con filtro de pliegues y se lava con 40 mL de THF. La reunión de fases orgánicas se seca con MgSO<sub>4</sub> anhidro, se filtra y se concentra en el rotavapor. El producto se purifica por cromatografía en columna empleando alúmina como fase estacionaria y diclorometano como fase móvil. El producto se obtiene en forma de sólido de color rojo oscuro (42 mg, 95 %).

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, MeOD) δ 8.40 (d, *J* = 9.1 Hz, 2H), 8.03 (d, *J* = 9.1 Hz, 2H), 7.68 (dd, *J* = 8.5, 2.2 Hz, 1H), 7.57 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 7.09 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 4.21 – 4.18 (m, 2H), 4.00 – 3.96 (m, 2H), 3.01 (s, 6H).

<sup>13</sup>C RMN (100 MHz, MeOD) δ 157.66, 152.59, 149.48, 148.58, 148.54, 125.78, 124.03, 123.92, 117.99, 104.75, 71.51, 61.65, 43.29.

**HRMS (EI):** *m/z* (%) calculada para C<sub>16</sub>H<sub>19</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>: 331.1406 [M + H]<sup>+</sup>  
encontrada: 331.1396

**Síntesis de 2-((E)-5-(2-(4-cianofenil)diazenil)-2-(dimetilamino)fenoxi)acetato de etilo (8)**

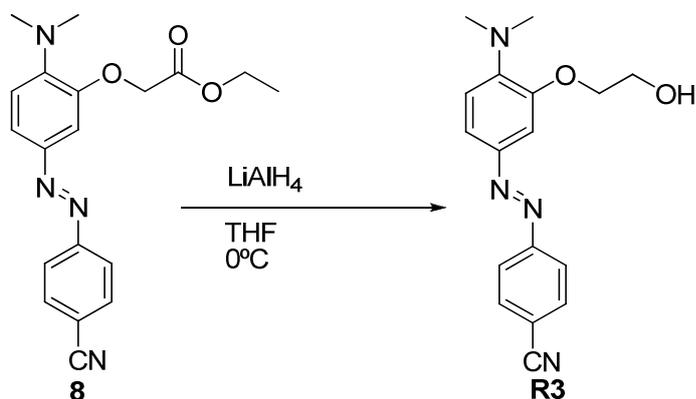


En un matraz de fondo redondo de 100 mL provisto de agitación magnética se añade 4-aminobenzonitrilo (230 mg, 1.91 mmol) y se suspende con 10 mL de agua. Se añade ácido sulfúrico concentrado (0.5 mL, 9.2 mmol) y se calienta suavemente hasta disolución. La mezcla se sumerge en un baño de agua-hielo (0-5 °C) y se deja durante 5 minutos para que se enfríe. A continuación se añade gota a gota una disolución de NaNO<sub>2</sub> (132 mg, 1.91 mmol) en 5 mL de agua y se agita durante 10 minutos a 0 °C para garantizar la formación cuantitativa de la sal de diazonio. Transcurrido este tiempo se adiciona gota a gota y durante 30 minutos una disolución del 2-(2-(dimetilaminofenoxi) acetato de etilo (6) (425 mg, 1.91 mmol) en etanol (20 mL). La disolución de color rojo resultante se agita durante 30 minutos a 0 °C y durante 30 minutos mas a temperatura ambiente, después se neutraliza con una disolución acuosa saturada de acetato potásico (30 mL). La mezcla de reacción (fase acuosa) se extrae con diclorometano (3 × 20 mL) y la reunión de fases orgánicas se seca con sulfato magnésico anhidro. Se filtra para eliminar el desecante y se concentra en el rotavapor obteniendo un aceite de color rojo. El producto se purifica por cromatografía en columna utilizando sílice como fase estacionaria y una mezcla de hexano/acetato de etilo (8/2, v/v) como fase móvil. Se obtienen 190 mg (27 %) del producto puro en forma de sólido de color naranja.

<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.82 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.68 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.58 (dd, *J* = 8.5, 2.1 Hz, 1H), 7.30 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 6.89 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 4.68 (s, *J* = 6.9 Hz, 2H), 4.22 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.96 (s, 6H), 1.24 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

<sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 168.80 , 155.30 , 150.04 , 147.21 , 146.88 , 133.51 , 123.74 , 123.34 , 119.15 , 117.23 , 113.09 , 103.96 , 65.91 , 61.83 , 43.20 , 14.59.

Síntesis de 2-((E)-5-(2-(4-cianofenil)diazenil)-2-(dimetilamino)fenoxi)etanol (R3)



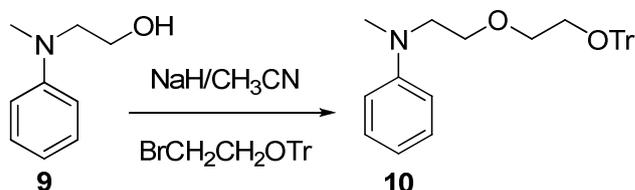
En un matraz de fondo redondo de 100 mL provisto de agitación magnética y atmósfera inerte se disuelve 2-((E)-5-(2-(4-cianofenil)diazenil)-2-(dimetilamino)fenoxi)acetato de etilo (**8**) (64 mg, 0.182 mmol) en 20 mL de THF y se pone en un baño de agua-hielo a 0 °C. Sobre esta disolución se inyectan 155  $\mu$ L de LiAlH<sub>4</sub> 2M en THF (0.31 mmol) y se agita durante 1 hora manteniendo la temperatura a 0 °C. Se deja que la temperatura suba hasta alcanzar la temperatura ambiente y se agita durante 1 hora más. Se añade cuidadosamente 1 mL de agua y se agita durante 2 horas. El precipitado se elimina por filtración y se lava con 40 mL de THF. La reunión de fases orgánicas se seca con MgSO<sub>4</sub> anhidro, se filtra y se concentra en el rotavapor. El producto se purifica por cromatografía en columna empleando alúmina como fase estacionaria y diclorometano como fase móvil. El producto se obtiene en forma de sólido de color naranja (44 mg, 79 %).

<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.85 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 2H), 7.70 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 2H), 7.59 (dd,  $J$  = 8.5, 2.2 Hz, 1H), 7.44 (d,  $J$  = 2.2 Hz, 1H), 6.95 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 1H), 4.20 – 4.15 (m, 2H), 3.92 – 3.86 (m, 2H), 2.89 (s, 6H).

<sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  155.25 , 151.64 , 147.95 , 147.57 , 133.54 , 123.42 , 123.08 , 119.09 , 117.7 , 113.35 , 106.14 , 71.99 , 61.52 , 43.54.

HRMS (EI):  $m/z$  (%) calculada para C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>: 311.1508 [M + H]<sup>+</sup>  
encontrada: 311.1511

### Síntesis de N-metil-N-(2-(2-(tritoloxi)etoxi)etil)anilina (10)

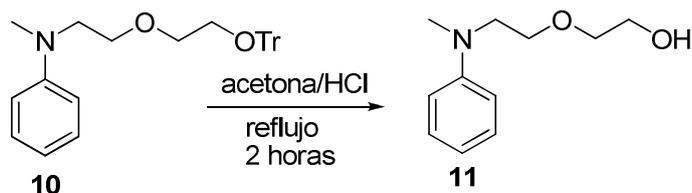


En un matraz de fondo redondo de 500 mL de tres bocas provisto de embudo de adición de presión compensada, agitación magnética, atmósfera inerte y refrigerante, se disuelve 2-(metilfenilamino)etanol (98%) (1.56 g, 10.1 mmol) en 100 mL de CH<sub>3</sub>CN seco, se adiciona el NaH (288 mg, 12 mmol) en pequeñas porciones y se calienta a 50 °C durante 30 minutos. Sobre la mezcla se añade desde el embudo de adición gota a gota bromoetanol protegido en forma de tritilo (3.71 g, 10.1 mmol) disuelto en 150 mL de acetonitrilo seco. La mezcla de reacción se calienta a reflujo durante 24 horas. Una vez fría, se filtra por gravedad, se lava con acetonitrilo y se concentra. El producto se purifica por cromatografía en columna empleando sílice y una mezcla de hexano/acetato de etilo (9/1 v/v) como fase móvil. Se obtienen 1.916 g (45 %) del producto en forma de aceite transparente de color amarillo.

<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.42 – 7.34 (m, 7H), 7.23 – 7.09 (m, 10H), 6.68 – 6.57 (m, 3H), 3.60 (dd, *J* = 9.1, 3.2 Hz, 2H), 3.55 – 3.50 (m, 2H), 3.47 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H), 3.16 – 3.10 (m, 2H), 2.91 (s, 3H).

<sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 149.35, 143.18, 129.37, 129.19, 128.16, 126.35, 116.61, 112.42, 94.45, 72.41, 68.55, 61.71, 52.53, 38.86.

## Síntesis de 2-(2-(metil(fenil)amino)etoxi)etanol (11)

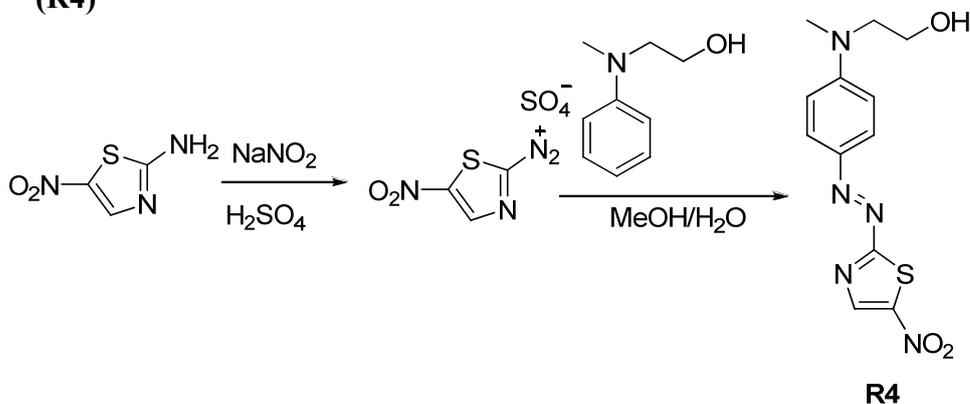


En un matraz de fondo redondo de 250 mL provisto de agitación magnética y refrigerante se disuelve el producto **10** (1.91g, 4.49 mmol) en 50 mL de acetona. Se añaden 50 mL de HCl 2 M y se calienta a reflujo durante 6 horas. Se deja enfriar y el sólido que aparece se elimina por filtración. La fase acuosa se neutraliza con NaHCO<sub>3</sub> y se extrae con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 × 30 mL). La reunión de fases orgánicas se seca con MgSO<sub>4</sub> anhidro y tras filtrar para eliminar el desecante, se concentra en el rotavapor obteniéndose un aceite de color amarillo. Se purifica por cromatografía en columna empleando sílice como fase estacionaria y una mezcla de hexano/acetato de etilo (8/2, v/v) como fase móvil. Se obtienen 537 mg (61 %) del producto en forma de aceite amarillo.

<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.13 (dd, *J* = 8.9, 7.2 Hz, 2H), 6.68 – 6.58 (m, 3H), 3.60 – 3.52 (m, 4H), 3.46 – 3.39 (m, 4H), 2.86 (s, 3H).

<sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 149.32, 129.17, 116.61, 112.42, 72.41, 68.55, 61.71, 52.53, 38.86.

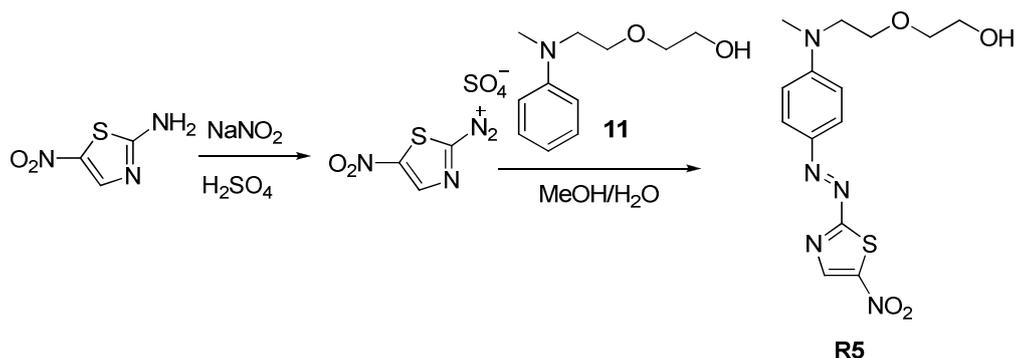
## Síntesis de (E)-2-(metil(4-((5-nitrotiazol-2-il)diazenil)fenil)amino)etanol (R4)



En un matraz de 100 mL provisto de agitación magnética se disuelve 2-amino-5-nitrotiazol (97%) (1.45 g, 10 mmol) con 18 mL de una mezcla de ácido fórmico, ácido propiónico, ácido fosfórico y ácido acético (1:1:2:3) y se enfría a 0-5 °C con un baño de agua-hielo. Sobre esta disolución se añade la disolución del catión nitrosilo, generado añadiendo el NaNO<sub>2</sub> (690 mg, 10 mmol) en pequeñas porciones sobre 5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> bajo agitación y a 0 °C. Después de agitar durante 1 hora en el baño de hielo se añade 2-(metilfenilamino)etanol (98%) (1.54 g, 10 mmol) disuelto en 30 mL de una mezcla MeOH/H<sub>2</sub>O (2/1, v/v) y se agita durante 1 hora a baja temperatura (0-5 °C). Se neutraliza con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (pH 5-6) y se agita durante 2 horas más. El precipitado que se forma se filtra y se lava con abundante agua. La fase acuosa se extrae con diclorometano y se seca con MgSO<sub>4</sub> anhidro. Se purifica por cromatografía en columna utilizando sílice y hexano/acetato de etilo (1/1, v/v). Se obtienen 614 mg (20 %) del producto **R4** en forma de sólido de color azul.

<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.54 (s, 1H), 7.89 (d, *J* = 9.4 Hz, 2H), 6.78 (d, *J* = 9.5 Hz, 2H), 3.89 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H), 3.67 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H), 3.19 (s, 3H).

**Síntesis de (E)-2-(2-(metil(4-((5-nitrotiazol-2-il)diazenil)fenil)amino)etoxi)etanol (R5)**

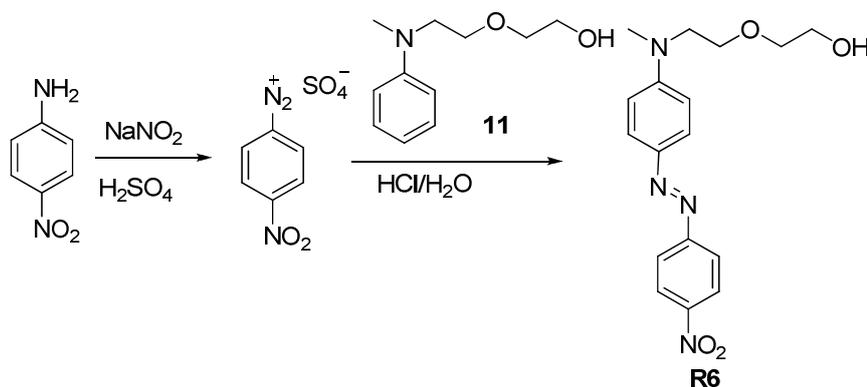


En un matraz de 100 mL provisto de agitación magnética se disuelve el 2-amino-5-nitrotiazol (97%) (166 mg, 1.11 mmol) con 2 mL de una mezcla de ácido fórmico, ácido propiónico, ácido fosfórico y ácido acético (1:1:2:3) y se enfría a 0-5 °C con un baño de agua-hielo. Sobre esta disolución se añade la disolución del catión nitrosilo, generado añadiendo el NaNO<sub>2</sub> (77 mg, 1.11 mmol) en pequeñas porciones sobre 1 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> bajo agitación y a 0 °C. Después de agitar durante 1 hora en el baño de hielo se añade el 2-(2-(metil(fenil)amino)etoxi)etanol (**11**) (217 mg, 1.11 mmol)

disuelto en 10 mL de una mezcla MeOH/H<sub>2</sub>O (2/1, v/v) y se agita durante 1 hora a baja temperatura (0-5 °C). Se neutraliza con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (pH 5-6) y se agita durante 2 horas mas. El precipitado que se forma se filtra y se lava con abundante agua. La fase acuosa se extrae con diclorometano. Se purifica por cromatografía en columna utilizando sílice y hexano/acetato de etilo (1/1, v/v). Se obtienen 99 mg (25 %) del producto **R5** en forma de sólido de color azul.

<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.54 (s, 1H), 7.89 (d, *J* = 9.4 Hz, 2H), 6.76 (d, *J* = 9.4 Hz, 2H), 3.69 (m, 4H), 3.69 – 3.64 (m, 2H), 3.55 – 3.49 (m, 2H), 3.17 (s, 3H).

**Síntesis de (E)-2-(2-(metil(4-((4-nitrofenil)diazenil)fenil)amino)etoxi)etanol (R6)**

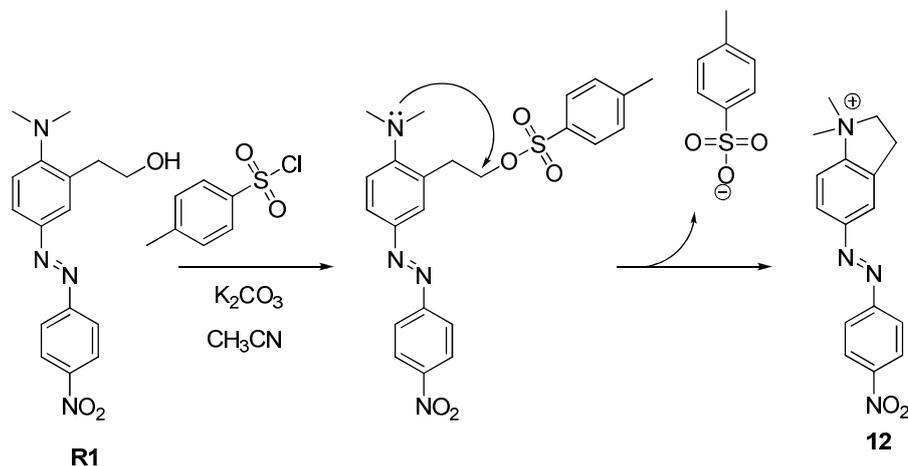


En un matraz de 100 mL de fondo redondo provisto de agitación magnética se disuelve 4-nitroanilina (98%) (134 mg, 0.95 mmol) en 14 mL de una mezcla de ácido sulfúrico, ácido acético y ácido propanoico (1:10:3). Se sumerge el matraz en un baño de agua-hielo a 0-5 °C y se añade gota a gota el NaNO<sub>2</sub> disuelto en 1 mL de agua. Se agita durante 30 minutos a baja temperatura (5 °C). Se disuelve 2-(2-(metil(fenil)amino)etoxi)etanol (**11**) (185 mg, 0.95 mmol) en 3 mL de una mezcla de MeOH/H<sub>2</sub>O (2/1, v/v) y se pone en baño de agua-hielo. Sobre esta disolución se añade gota a gota a 0 °C durante 1 hora la disolución de la sal de diazonio de la 4-nitroanilina. Se agita la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 24 horas. Se neutraliza hasta pH 5-6 con amoníaco acuoso. Se agita durante 2 horas y se aísla el producto por filtración a vacío. El producto se purifica por cromatografía en columna empleando sílice y diclorometano. Se obtienen 175 mg (53 %) del producto **R6** en forma de sólido de color rojo.

$^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.19 (d,  $J = 9.1$  Hz, 2H), 7.80 (ddd,  $J = 9.2$ , 4.8, 2.4 Hz, 4H), 6.67 (d,  $J = 9.3$  Hz, 2H), 4.12 (ddd,  $J = 5.9$ , 4.8, 3.2 Hz, 2H), 3.64 – 3.54 (m, 6H), 3.04 (s, 3H).

$^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  157.14, 152.87, 147.71, 144.15, 126.49, 125.03, 122.99, 111.88, 69.62, 69.01, 63.72, 52.57, 39.81.

### Síntesis de 12



En un matraz de fondo redondo de 50 mL provisto de agitación magnética se disuelve 2-((E)-5-(2-(4-nitrofenil)diazenil)-2-(dimetilamino)fenil)etanol (**R1**) (63 mg, 0.2 mmol) en acetonitrilo anhidro (1 mL) y se añade  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (56 mg, 0.4 mmol). Sobre esta mezcla se adiciona lentamente una disolución de cloruro de tosilo (36 mg, 0.2 mmol) en acetonitrilo (0.5 mL). Después de agitar durante 6 horas a temperatura ambiente se añade tolueno (6 mL) y precipita el producto **12** en forma de tosilato de la sal de amonio como un sólido blanco que se aísla por filtración (46 mg, 0.1 mmol).

$^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  8.46 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H), 8.15 (m, 4H), 8.02 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 7.72 (d,  $J = 7.8$  Hz, 2H), 7.25 (d,  $J = 7.8$  Hz, 2H), 4.36 (t,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 3.65 (s, 6H), 3.59 (t,  $J = 7.2$  Hz, 2H).

$^{13}\text{C}$  RMN (101 MHz, MeOD)  $\delta$  159.99, 155.23, 153.86, 149.40, 135.57, 124.94, 124.57, 123.58, 120.32, 118.17, 68.54, 53.95, 26.59.

**HRMS (EI)**  $m/z$  calculada para:  $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{N}_4\text{O}_2$  297.1352.  $[\text{M}]^+$  encontrada: 297.1355.

**Capítulo 3. Colorantes azoicos derivados de piridina como sondas colorimétricas para el reconocimiento de agentes nerviosos. Sistema de recepción en la parte aceptora del colorante.**

## **Capítulo 3. Colorantes azoicos derivados de piridina como sondas colorimétricas para el reconocimiento de agentes nerviosos. Sistema de recepción en la parte aceptora del colorante.**

### ***3.1 Introducción***

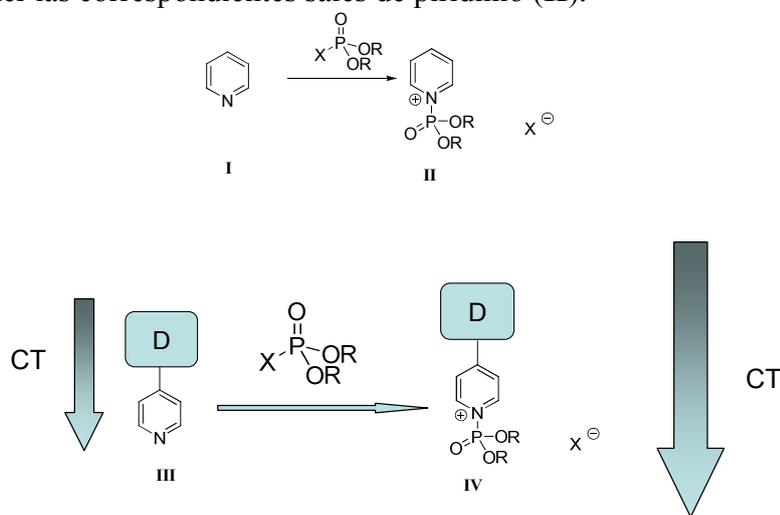
En este capítulo se expondrán los resultados obtenidos en la utilización de colorantes azoicos derivados de piridina como sondas colorimétricas para la detección de los simulantes de agentes nerviosos de guerra química y por extensión de los propios agentes nerviosos. Teniendo en cuenta los buenos resultados obtenidos con los colorantes azoicos descritos en el **Capítulo 2** y en los que la unidad receptora se encontraba en la parte dadora de la molécula, se decidió diseñar y sintetizar una colección de sondas colorimétricas con el sistema de recepción en la parte aceptora y estudiar su capacidad de reconocimiento frente a simulantes de agentes nerviosos. Mediante esta aproximación se pretendía mejorar la detección visual de los agentes nerviosos. Esta detección visual ya se consiguió con los reactivos cromogénicos **R1-R3**, en los que se observaba una desaparición del color debido a un desplazamiento hipsocrómico. Esta desaparición de color se podía observar a simple vista. Sin embargo el ojo humano tiene mayor sensibilidad y, por tanto, detecta más fácilmente la aparición de un color y no es igualmente sensible para todas las longitudes de onda del espectro visible (de 380 a 780 nm). La sensibilidad óptima se sitúa a 555 nm (color verde-amarillo) en visión de día (condición fotópica) y a 507 nm (color azulado) para la visión nocturna (condición escotópica). Las ondas verdes y amarillas son captadas por el ojo como las más brillantes y las ondas azules y rojas como las más oscuras. Por esa razón se diseñaron ligandos capaces de actuar como dosímetros OFF-ON y que originaron colores en la zona anteriormente mencionada.

### ***3.2 Diseño de sondas colorimétricas.***

Se han publicado estudios que indican que tanto las aminas aromáticas como la piridina pueden reaccionar con fosfatos y fosfonatos que contengan en su estructura un buen grupo saliente, como es el caso de los

agentes nerviosos.<sup>77</sup> Aunque existen estudios cinéticos y mecanísticos de reacciones de piridinólisis de clorofosfatos, no habían descritos en la literatura científica ejemplos de sondas colorimétricas ni fluorogénicas para la detección de simulantes de agentes nerviosos que hicieran uso de esta reactividad. Por todo ello decidimos sintetizar y evaluar el comportamiento frente a simulantes de agentes nerviosos de sondas colorimétricas, cuyo sistema de detección fuera el cambio que se observa en la banda de absorción UV-Vis inducido por la reacción de los simulantes de agentes nerviosos (o de los propios agentes) con el átomo de nitrógeno de una piridina.

El protocolo para el reconocimiento colorimétrico de los simulantes de agentes nerviosos que se describe a continuación, se basa en la reactividad de la piridina (**I**) que la habilita para actuar como receptor. La piridina contiene un átomo de nitrógeno nucleofílico: posee un par de electrones en un orbital  $sp^2$  paralelo a la nube  $\pi$ , que puede dar reacciones de fosforilación con los simulantes de agentes de guerra química para obtener las correspondientes sales de piridinio (**II**).



**Figura 3.1** Protocolo de reconocimiento colorimétrico empleando derivados de piridina.

Siguiendo este protocolo de reconocimiento, que prevé el uso del fragmento **I** como grupo aceptor y su acoplamiento con un grupo dador (**D**) en colorantes azoicos (**III**), se estableció un procedimiento adecuado para el desarrollo de sondas colorimétricas para la detección de agentes nerviosos

<sup>77</sup> (a) A. D. Guha, H. W. Lee, I. Lee, *J. Org. Chem.*, **2000**, 65, 12; (b) N. Bourne, A. Williams, *J. Am. Chem. Soc.*, **1984**, 106, 7591; (c) S. E. Pipko, L. V. Bezgubenko, A. D. Sinitsa, E. B. Rusanov, E. G. Kapustin, M. I. Povolotskii, V. V. Shadchak, *Heteroat. Chem.*, **2008**, 19, 171. (d) Guha, A. K.; Lee, H. W.; Lee, I. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **1999**, 765.

(Figura 3.1). Así, la conversión de la correspondiente piridina (III) en la sal de piridinio (IV), después de la reacción con ciertos derivados organofosforados (OP), induce un cambio en las propiedades electrónicas del átomo de nitrógeno; al cuaternizarse el átomo de nitrógeno pasa a tener una carga positiva aumentando su capacidad electrón-aceptora. La consecuencia directa de este aumento de la capacidad aceptora del anillo de piridina es un desplazamiento de la banda de transferencia de carga hacia longitudes de onda más grandes, lo que se va a reflejar en un cambio de color.

Aunque, como ya se ha mencionado más arriba, las anilinas también pueden dar reacción con los simulantes de agentes nerviosos, esta reacción es mucho más lenta que con las piridinas, debido a la diferencia en la estructura del estado de transición.<sup>77a</sup> Adicionalmente, se sabe que las reacciones de fosforilación de la piridina dependen fuertemente de los agentes de fosforilación y son, en muchos casos, reversibles en presencia de especies nucleofílicas.<sup>78</sup> Así, la presencia del nucleófilo cianuro (como subproducto de las reacciones de fosforilación de los receptores III con DCNP) puede dar lugar a la formación de varios productos diferentes lo que puede llevarnos al reconocimiento selectivo de este agente nervioso frente al DFP y DCP que generan un subproducto no nucleofílico (los aniones fluoruro y cloruro) y dan lugar a la formación de un único producto final.

### 3.3 Síntesis, caracterización y propiedades espectroscópicas.

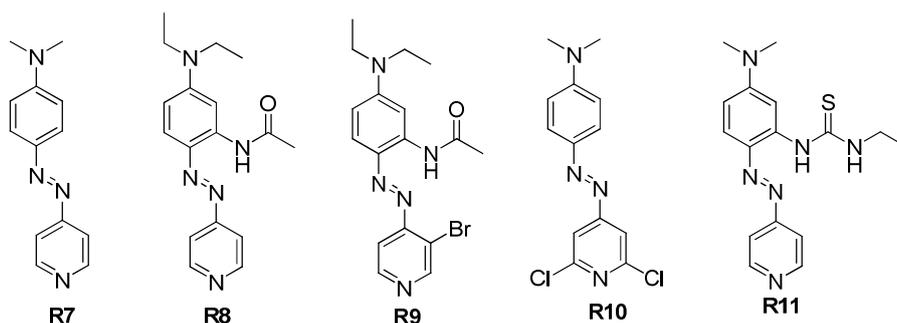


Figura 3.2 Cromoreactivos R7-R11

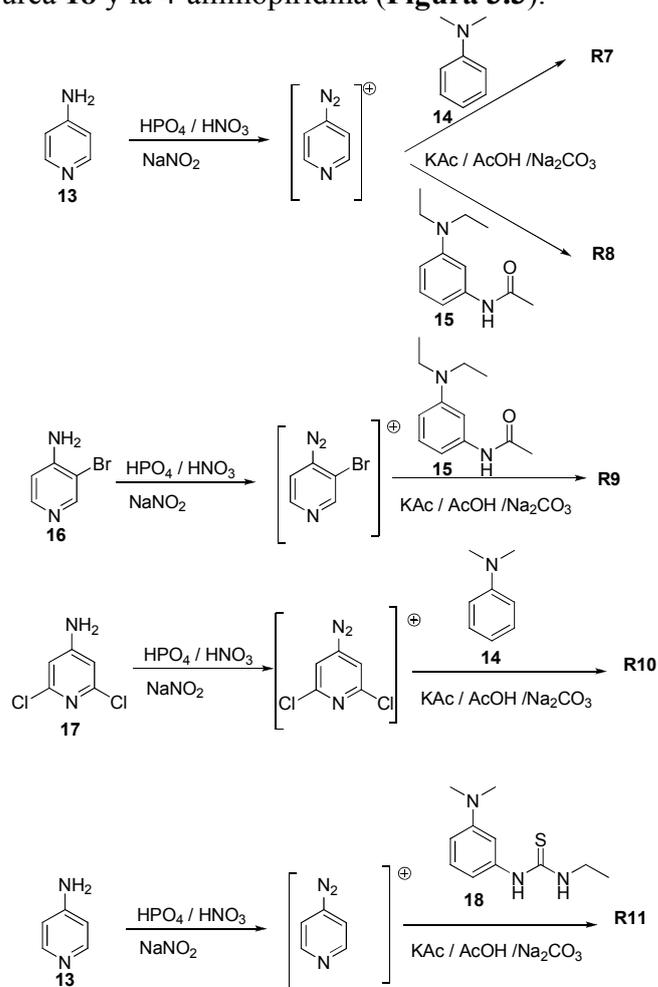
Todos los reactivos cromogénicos que se describen a continuación (Figura 3.2) fueron sintetizados siguiendo el mismo procedimiento descrito en la literatura.<sup>79</sup> Así, por ejemplo, para la obtención del reactivo cromogénico R7 se disuelve la 4-aminopiridina en una mezcla de ácido

<sup>78</sup> G. W. Jameson, J. M. Lawlor, *J. Chem. Soc. (B)*, **1970**, 53.

<sup>79</sup> H. Li, C. Huang, Y. Zhou, X. Zhao, X. Xia, T. Li J. Ba., *J. Mater. Chem.*, **1995**, 5(11), 1871.

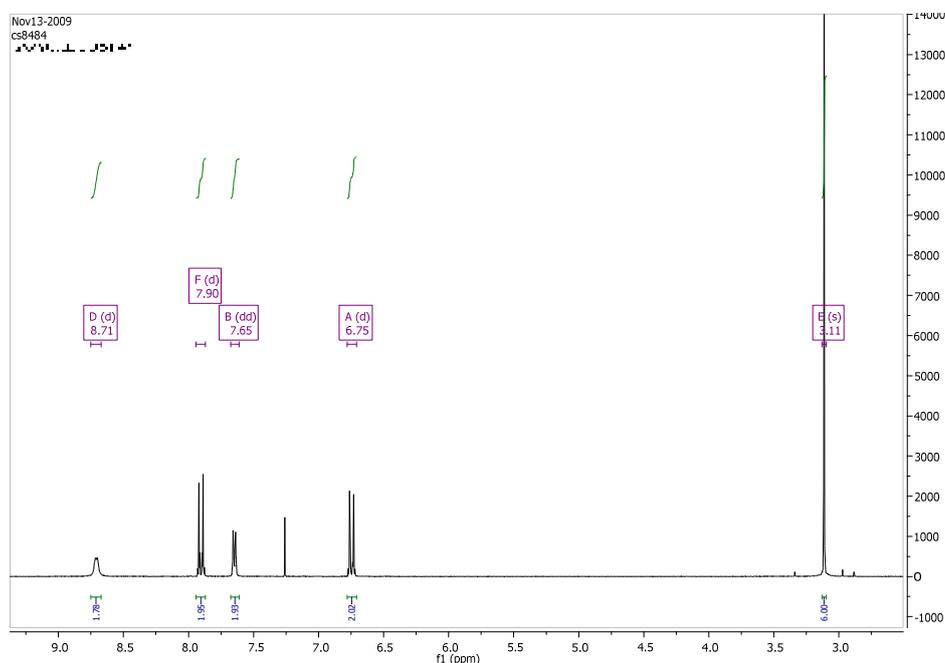
fosfórico y ácido nítrico y se añade lentamente el  $\text{NaNO}_2$  a baja temperatura para formar la correspondiente sal de diazonio y esta sal se hace reaccionar con la *N,N*-dimetilanilina disuelta en agua tamponada con acetato potásico y ácido acético, obteniéndose el correspondiente colorante azoico **R7** (ver **Figura 3.3**).

La síntesis de **R8** y **R9** se llevo a cabo mediante la reacción de diazotación del producto **15** con la sal de diazonio derivada de la 4-aminopiridina (**13** para **R8**) y con la sal de diazonio obtenida a partir de la 3-bromo-4-aminopiridina (**16** para **R9**). De la misma forma el reactivo **R10** se obtuvo mediante la diazotación de la *N,N*-dimetilanilina con la 2,6-dicloro-4-aminopiridina (**17**), mientras que **R11** se preparó mediante la copulación entre la tiourea **18** y la 4-aminopiridina (**Figura 3.3**).



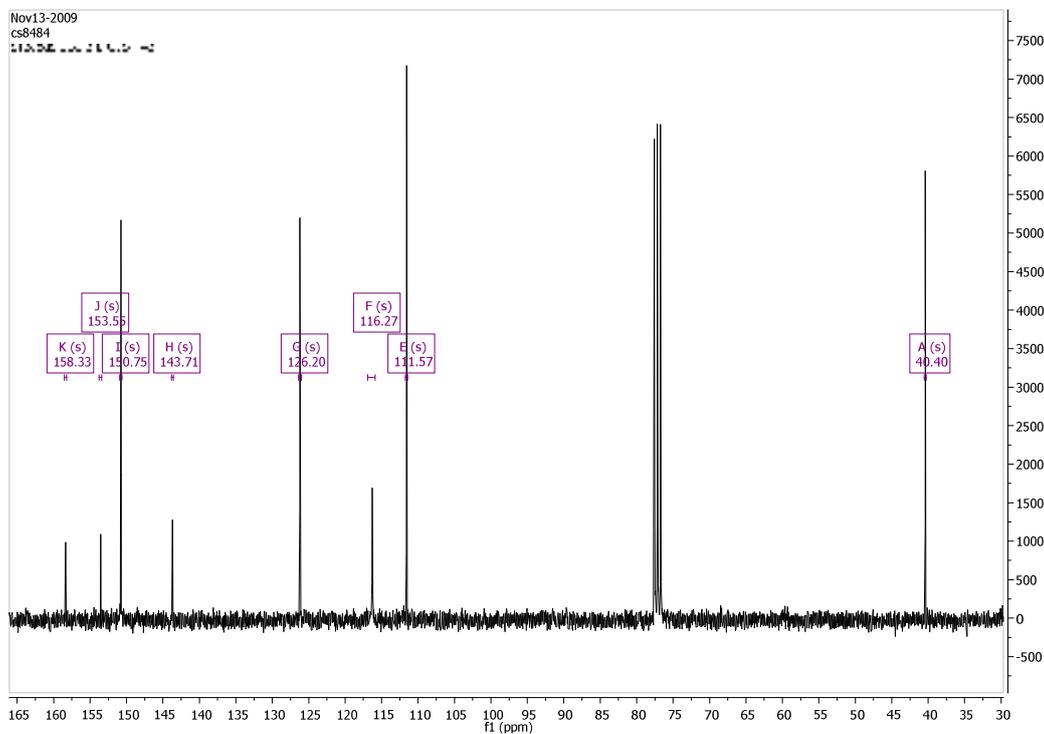
**Figura 3.3** Rutas sintéticas seguidas para la obtención de los reactivos cromogénicos **R7-R11**.

Todos los reactivos cromogénicos sintetizados fueron caracterizados por técnicas de resonancia magnética nuclear de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ . Además se realizaron análisis de espectrometría de masas de alta resolución (HRMS) de los productos finales, antes de su evaluación como posibles sondas colorimétricas para los simulantes de agentes nerviosos empleados. A continuación se explica con detalle y a título indicativo la caracterización por resonancia magnética nuclear del reactivo cromogénico **R7** que permite confirmar la estructura química de la sonda colorimétrica sintetizada.



**Figura 3.4** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del reactivo cromogénico **R7** ( $\text{CDCl}_3$ ).

El espectro de  $^1\text{H}$ -RMN en  $\text{CDCl}_3$  del cromoreactivo **R7** se muestra en la **Figura 3.4**. La señal de los metilos situados sobre el átomo de nitrógeno de la anilina aparece a 3.11 ppm (singlete, seis hidrógenos). En cuanto a la parte aromática se pueden apreciar las señales de los hidrógenos situados en orto al grupo dimetilamino a 6.75 ppm (doblete,  $J = 9.3$  Hz); los dos hidrógenos del anillo de dimetilnilina más próximos al grupo azo aparecen como un doblete a 7.90 ppm, con una constante de acoplamiento con sus hidrógenos vecinales de 9.3 Hz típica en estos compuestos. Los hidrógenos del anillo de piridina aparecen a 7.65 ppm (doble doblete, dos hidrógenos) los que están más próximos al grupo azo con constantes de acoplamiento de 4.7 y 1.5 Hz, típicas de piridinas y a 8.71 ppm (doblete, dos hidrógenos) los que se encuentran en orto al nitrógeno de la piridina.



**Figura 3.5** Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN del reactivo cromogénico **R7** ( $\text{CDCl}_3$ ).

En la **Figura 3.5** se observa el espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN de **R7** en  $\text{CDCl}_3$ . A 40.40 ppm aparece la señal de los metilos situados sobre el átomo de nitrógeno de la anilina. En la parte aromática, en la zona de campos más bajos, se observan las señales de dos de los tres carbonos cuaternarios que existen en la molécula. A 158.33 ppm aparece la señal del carbono del anillo de piridina enlazado al grupo azo. La señal que aparece a 153.55 ppm se asigna al carbono que soporta el dimetilamino. El carbono cuaternario restante, es decir, el carbono del anillo de anilina enlazado al grupo azo, aparece a 143.71 ppm. Las señales de los CH aromáticos se asignaron de la siguiente manera: existen dos pares de CH en el anillo de la dimetilanilina que son magnéticamente equivalentes y corresponden a las señales situadas a 111.57 ppm, los CH más próximos al átomo de nitrógeno de la anilina, y a 126.20 ppm los CH próximos al grupo azo. Los CH del anillo de piridina muestran sus señales de carbono a 116.27 ppm los mas próximos al grupo azo y a 150.75 ppm los CH mas cercanos al N de la piridina.

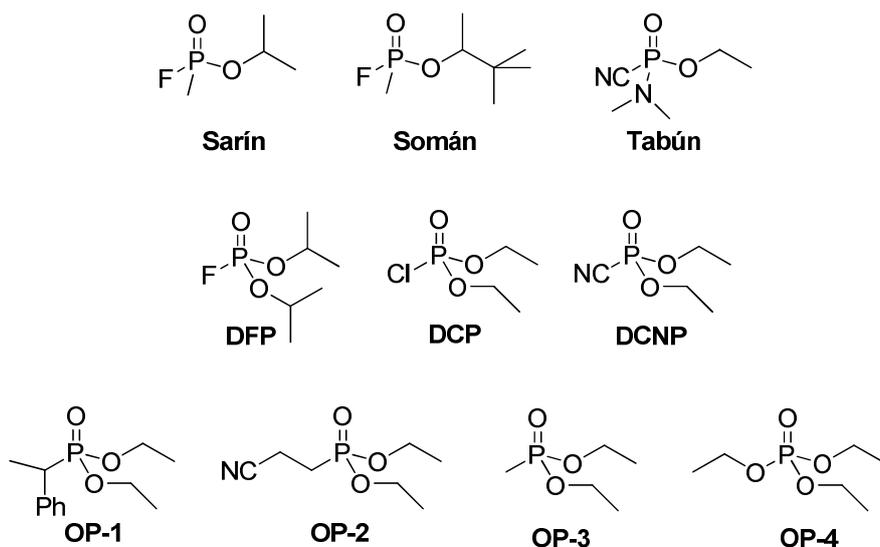
**Tabla 3.1** Bandas en la zona visible de los receptores **R7-R11** ( $1.0 \times 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup>) en acetonitrilo.

Receptor	$\lambda_{\max}$ (nm)	Log $\epsilon$ (M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )
<b>R7</b>	436	4.5
<b>R8</b>	473	4.4
<b>R9</b>	490	4.5
<b>R10</b>	475	4.5
<b>R11</b>	469	4.4

Las propiedades espectroscópicas UV-Vis de los colorantes azoicos **R7-R11** se muestran en la **Tabla 3.1**. Como se puede apreciar, estos reactivos colorimétricos presentan bandas de absorción intensas ( $\log \epsilon > 4$ ) en la región visible del espectro electromagnético entre 436 y 490 nm y por ello el color de sus disoluciones va desde el amarillo de **R7** al naranja de **R9**. Esta banda tiene un carácter de transferencia de carga debido a la presencia de un grupo dialquilanilina con carácter electrón-dador y un grupo piridina con capacidad electrón-aceptora. La presencia de distintos sustituyentes con carácter electrón-dadores o electrón-aceptores en los anillos aromáticos determina la posición de la banda de transferencia de carga. Así, si comparamos los receptores **R7** y **R10** podemos apreciar que la presencia de dos átomos de cloro electronegativos en **R10** aumenta la capacidad electrón-aceptora del anillo de piridina provocando un desplazamiento batocrómico de la banda de absorción de 39 nm. El mismo efecto se observa en **R9** si lo comparamos con **R8**. La presencia de un átomo de bromo en el anillo de piridina induce un desplazamiento batocrómico de 17 nm en la banda de absorción. Si nos fijamos en el anillo de anilina también podemos observar que la inclusión de grupos con cierta capacidad electrón-dadora produce un desplazamiento batocrómico de la banda de absorción. Así, si comparamos el cromoreactivo **R7** con **R11** se puede observar que la presencia de una tiourea, con uno de sus NH enlazado directamente al anillo aromático, provoca un desplazamiento batocrómico de 33 nm. El mismo efecto se observa con la presencia de grupos amida en **R8** y **R9**.

### 3.4 Reactividad con simulantes de agentes nerviosos.

Como ya se mencionó en el **Capítulo 2**, debido a la alta toxicidad de los agentes nerviosos Sarín, Somán y Tabún, los compuestos relacionados DCP, DFP y DCNP que se muestran en la **Figura 3.6** se utilizan como modelos o simulantes para el diseño de indicadores y sistemas de detección. Esto es debido a que tienen una estructura química similar, idéntica reactividad y a la menor toxicidad que presentan por ser menos persistentes.

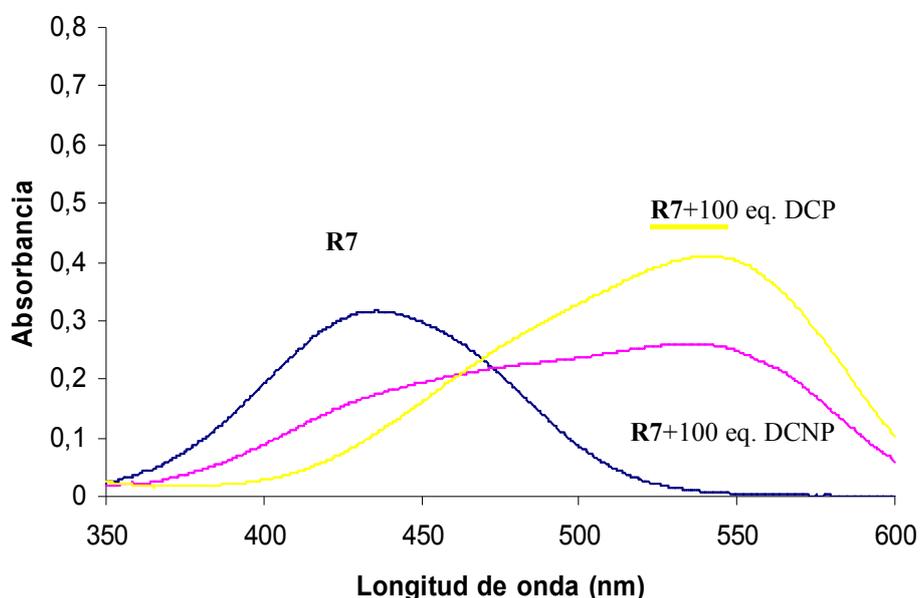


**Figura 3.6** Estructura química de diferentes compuestos organofosforados.

#### 3.4.1 Estudios con el cromoreactivo R7

En primer lugar se realizó un estudio del comportamiento del receptor cromogénico **R7** en acetonitrilo. Así, las disoluciones en acetonitrilo del receptor **R7** ( $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) presentan una banda de absorción intensa centrada a 436 nm (la disolución es de color amarillo) que se puede asignar a un colorante azoico con una transferencia de carga moderada. También aparece, en la zona UV, una banda a 264 nm típica de una transición electrónica localizada en uno de los anillos aromáticos del receptor **R7** (**Figura 3.7**). A continuación se estudió el efecto de la adición

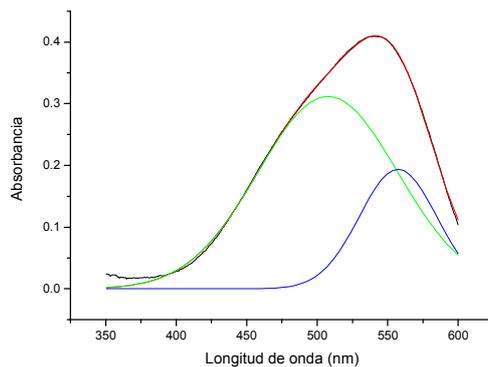
de 100 equivalentes de DCP y DCNP sobre disoluciones del receptor **R7** en acetonitrilo. Así, al adicionar estos simulantes se observó un desplazamiento batocrómico de la banda centrada a 436 nm y un claro cambio de color de amarillo a violeta.



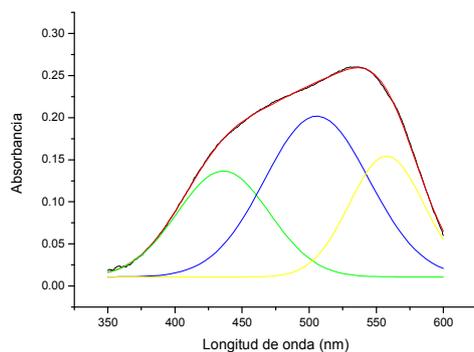
**Figura 3.7** Espectro de absorción UV-Vis de: receptor cromogénico **R7** (acetonitrilo,  $1 \times 10^{-5}$  mol  $\text{dm}^{-3}$ ), **R7** con 100 equivalentes de DCP y **R7** con 100 equivalentes de DCNP.

La forma ancha de la banda desplazada hacia el rojo tras la reacción con los simulantes nos sugirió la presencia de distintas especies. Por ello se llevó a cabo la deconvolución, utilizando el programa Origin 6.1 y ajustando los picos a funciones de tipo gaussiana, de los espectros UV-Vis obtenidos tras la adición de los simulantes. Así, se observó que la deconvolución del espectro UV-visible obtenido tras la adición de DCP (**Figura 3.8**) mostraba la presencia de dos absorciones centradas a 505 y 557 nm mientras que la deconvolución del espectro UV-visible obtenido tras la adición de DCNP (**Figura 3.9**) presentaba tres absorciones centradas a 436, 505 y 557 nm. La banda de absorción centrada a 436 nm se asigna al reactivo **R7** libre mientras que las bandas a 505 y 557 nm pertenecen a dos nuevas especies que aparecen tras la reacción de **R7** con DCP y DCNP. El hecho de que ambas bandas aparezcan a longitudes de onda mayores que la que presenta el reactivo cromogénico libre sugiere que las nuevas especies surgen, como

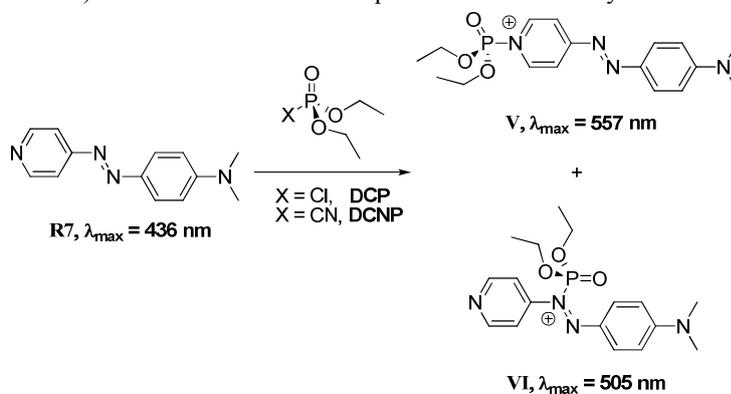
cabría esperar debido al diseño de la sonda, de la reacción con la parte electrón-aceptora de **R7**.



**Figura 3.8** Espectro de absorción UV-Vis del receptor cromogénico **R7** (acetonitrilo  $1 \times 10^{-5}$  mol  $\text{dm}^{-3}$ ) tras reaccionar con 100 equivalentes de DCP y su deconvolución.

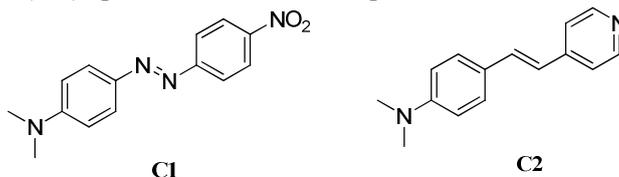


**Figura 3.9** Espectro de absorción UV-Vis del receptor cromogénico **R7** (acetonitrilo  $1 \times 10^{-5}$  mol  $\text{dm}^{-3}$ ) tras reaccionar con 100 equivalentes de DCNP y su deconvolución.



**Figura 3.10** Reacción de fosforilación del reactivo cromogénico **R7** con los simulantes de agentes de guerra química y longitudes de onda del máximo de absorción de las especies formadas en acetonitrilo.

Como se puede ver en la **Figura 3.10** los únicos productos que se pueden formar por la reacción entre el reactivo cromogénico **R7** y los simulantes de agentes de guerra química que originen un desplazamiento batocrómico de la banda de absorción UV-Vis son los que se obtienen tras la reacción con el átomo de nitrógeno del grupo azo más próximo a la piridina o con el átomo de nitrógeno de la piridina. Esto es debido a que las cargas positivas que se forman en la reacción se estabilizan por la resonancia del par de electrones solitario del átomo de nitrógeno de la anilina. Para llevar a cabo la asignación de las bandas a las dos especies que se forman y que se muestra en la **Figura 3.10**, se realizaron experimentos de control con los productos comerciales N,N-dimetil-4-[(E)-4-nitrofenil]diazetil)anilina (**C1**) y N,N-dimetil-4-[(E)-2-(piridin-4-il)vinil)anilina (**C2**) que son cromóforos que también tienen carácter dador-aceptor.

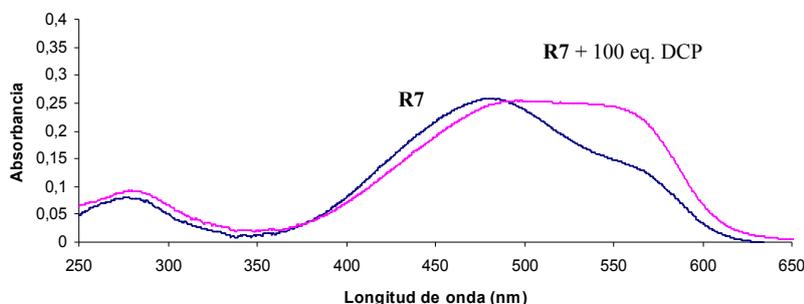


**Figura 3.11** Estructura química de los productos comerciales **C1** y **C2**.

Cuando se adiciona DCP a las disoluciones en acetonitrilo de **C1** y **C2** se observa que, en cada caso, sólo aparece una banda debido a que únicamente se puede formar un producto. En **C1** se produce la fosforilación del grupo azo observándose un desplazamiento batocrómico de 65 nm y en **C2** se produce la fosforilación de la piridina con un desplazamiento batocrómico de 115 nm. Estos desplazamientos son análogos a los observados en la reacción de fosforilación de **R7**. Los estudios de RMN realizados con el cromoreactivo **R7**, como se explicará mas adelante, confirmaron que la especie que se forma mayoritariamente es aquella en la que se fosforila en el N de la piridina.

En vista de los prometedores resultados obtenidos en acetonitrilo se decidió pasar a estudiar la respuesta cromogénica de **R7** en medios acuosos tamponados, de cara a una posible aplicación de este reactivo para la detección de agentes de guerra química en muestras reales y para garantizar que la respuesta cromogénica observada no era consecuencia de reacciones de protonación con los productos de hidrólisis de los simulantes empleados. Para ello se realizaron experimentos en mezclas acetonitrilo-agua 25:75 v/v tamponadas con MES (0.1 mol dm<sup>-3</sup>, pH 5.6). Así, el espectro UV-Visible del compuesto **R7** en este medio muestra una banda de transferencia de carga centrada a 475 nm con un hombro a 553 nm (**Figura 3.12**). A partir de estudios de protonación se ha confirmado que la banda a 475 nm corresponde al colorante **R7**, mientras que la banda a 553 nm se debe a **R7-**

$H^+$  en el que el protón está situado en el nitrógeno del anillo de piridina.<sup>80</sup> Si tenemos en cuenta que la absorptividad molar de **R7-H<sup>+</sup>** es mucho mayor que la de **R7** ( $\log \epsilon = 5.12$  y  $2.75$ , respectivamente), es posible calcular que la extensión de la protonación es muy pequeña (menos del 0.5%). A continuación, se estudió la respuesta cromogénica del reactivo **R7** con DCP, DFP, DCNP y los derivados organofosforados OP-1-4 (ver **Figura 3.6** para sus estructuras). Se observó que **R7** solo cambió de color al adicionar DCP, DFP y DCNP mientras que la presencia de los derivados OP-1-4 no indujo ningún cambio en el espectro UV-visible del reactivo cromogénico.



**Figura 3.12** Espectro de absorción UV-Vis de: receptor cromogénico **R7** ( $1.0 \times 10^{-5}$  mol  $dm^{-3}$ ) en agua/acetonitrilo (3:1 v/v) tamponada a pH 5.6 con MES ( $1.0 \times 10^{-1}$  mol  $dm^{-3}$ ) y **R7** con 100 equivalentes de DCP.

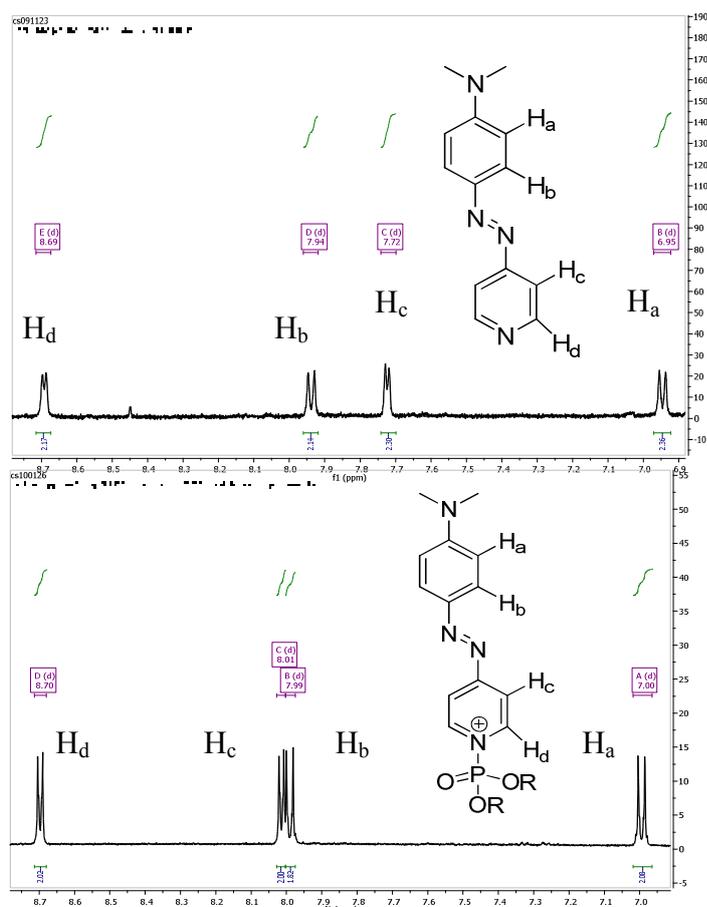
Así, la adición de DCP a una disolución de **R7** en acetonitrilo-agua 25:75 v/v tamponada con MES (pH=5.6) indujo la aparición de una banda de absorción ancha (ver **Figura 3.12**) que, después de la deconvolución, se puede dividir en tres bandas bien definidas centradas a 475, 551 y 575 nm. Estas bandas fueron asignadas a **R7**, **R7-H<sup>+</sup>** y el producto de fosforilación en el anillo de piridina (producto V en la **Figura 3.10**), respectivamente. Como resultado de la reacción de DCP con **R7**, el color de la disolución cambió de color naranja pálido a magenta. La adición de DFP indujo el mismo comportamiento cromogénico.



**Figura 3.13** Fotografía de **R7** ( $1.0 \times 10^{-5}$  mol  $dm^{-3}$  en agua/acetonitrilo 3:1 v/v a pH 5.6) solo y en presencia de 100 equivalentes de DCP y DFP (de izquierda a derecha).

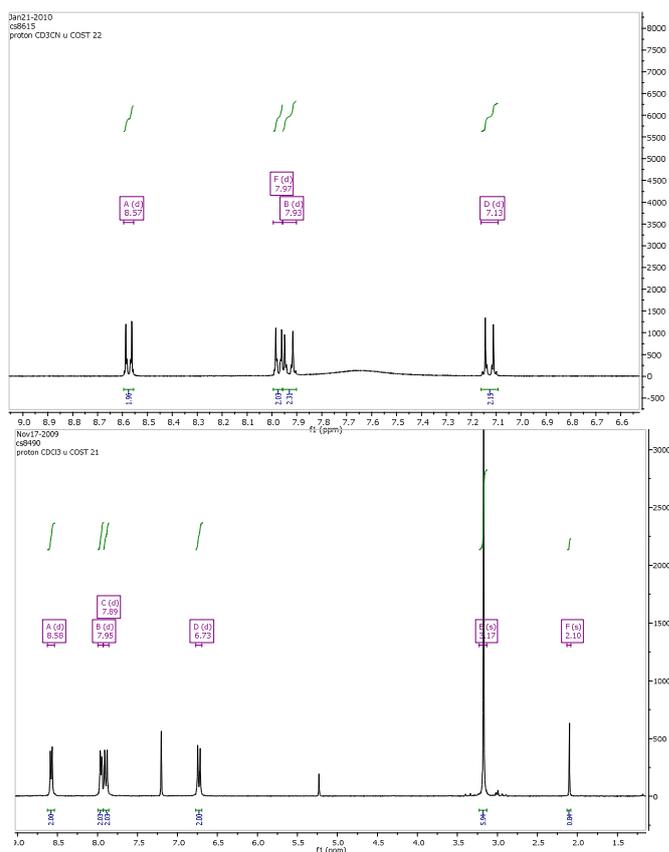
<sup>80</sup> (a) I. M. Klotz, H. A. Fiess, J. Y. C. Ho, M. Mellody, *J. Am. Chem. Soc.*, **1954**, 76, 5136; (b) H. Kubota, M. Idei, S. Motomizu, *Analyst*, **1990**, 115, 1109.

El cambio de color observado es compatible con una reacción de fosforilación en la piridina. Así, la reacción induce un incremento en la capacidad electrón-aceptora de la piridina al pasar de tener un átomo de nitrógeno electronegativo a un nitrógeno cargado positivamente. Esta carga positiva en el anillo de piridina provoca un aumento del carácter dador-aceptor del cromóforo al haber aumentado la capacidad electrón-aceptora de la piridina. Este aumento de la capacidad electrón-aceptora está de acuerdo con el desplazamiento batocrómico de la banda que se observó. La estructura del producto de reacción se confirmó, además, por los experimentos de  $^1\text{H}$ -RMN en  $\text{CD}_3\text{CN-D}_2\text{O}$  25:75 v/v (saturado con MES). En esta mezcla de disolventes, como se puede ver en la parte de arriba de la **Figura 3.14**, las señales de los hidrógenos aromáticos del receptor **R7** aparecen centradas a 8.69 y 7.72 ppm ( $\text{H}_d$  y  $\text{H}_c$  del anillo de piridina) y a 7.94 y 6.95 ppm ( $\text{H}_b$  y  $\text{H}_a$  del anillo de anilina 1,4-disustituido).



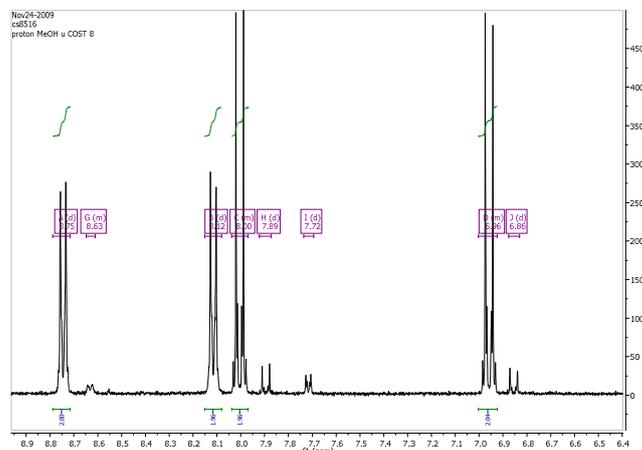
**Figura 3.14** Arriba: espectro de  $^1\text{H}$ -RMN (zona aromática) de **R7** realizado en  $\text{CD}_3\text{CN-D}_2\text{O}$  25:75 v/v (saturado con MES). Debajo: espectro de  $^1\text{H}$ -RMN (zona aromática) del reactivo **R7** tras reaccionar con DCP realizado en  $\text{CD}_3\text{CN-D}_2\text{O}$  25:75 v/v (saturado con MES).

Después de agregar DCP, las señales aromáticas se desplazan y aparecen a 8.70 y 8.01ppm ( $H_d$  y  $H_c$  del anillo de piridina) y a 7.99 y 7.00 ppm ( $H_b$  y  $H_a$  del anillo de anilina 1,4-disustituido). El cambio más importante se observó para el protón del anillo de piridina  $H_c$  ( $\Delta\delta = 0.29$  ppm). Aunque cabría esperar una mayor variación del desplazamiento químico de la señal de los hidrógenos situados en orto al N de la piridina ( $H_d$ ) no sucede así y se comprobó experimentalmente realizando experiencias de  $^1\text{H}$ -RMN de los correspondientes derivados N-protonados, N-acilados y N-metilados del compuesto **R7**. En la **Figura 3.15** se muestran los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN del derivado protonado con ácido trifluoroacético (arriba), y del derivado acilado (debajo), sintetizado a partir de **R7** con cloruro de acetilo en acetonitrilo. Como se puede observar los espectros mostrados en la **Figura 3.15** son muy similares al producto de fosforilación con DCP.



**Figura 3.15** Arriba: espectro de  $^1\text{H}$ -RMN (zona aromática) de **R7** protonado con ácido trifluoroacético realizado en  $\text{CD}_3\text{CN}$ . Debajo: espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del reactivo **R7** tras reaccionar con cloruro de acetilo realizado en  $\text{CDCl}_3$ .

Aunque se podría pensar que el ácido trifluoroacético y el cloruro de acetilo pueden dar las correspondientes reacciones de protonación y acetilación sobre el N del grupo azo más alejado del grupo dimetilamino y por tanto los espectros mostrados fueran de dichas especies, el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del producto obtenido por reacción entre el cromoreactivo **R7** y yoduro de metilo,<sup>81</sup> muestra variaciones similares en los desplazamientos químicos de las señales de los hidrógenos aromáticos (con un  $\Delta\delta = 0.4$  ppm para  $\text{H}_c$ ) lo que confirma la cuaternización del átomo de nitrógeno de la piridina.



**Figura 3.16** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN (zona aromática) de **R7** metilado con yoduro de metilo realizado en MeOD. Las señales de menor intensidad corresponden al producto sin metilar **R7**.

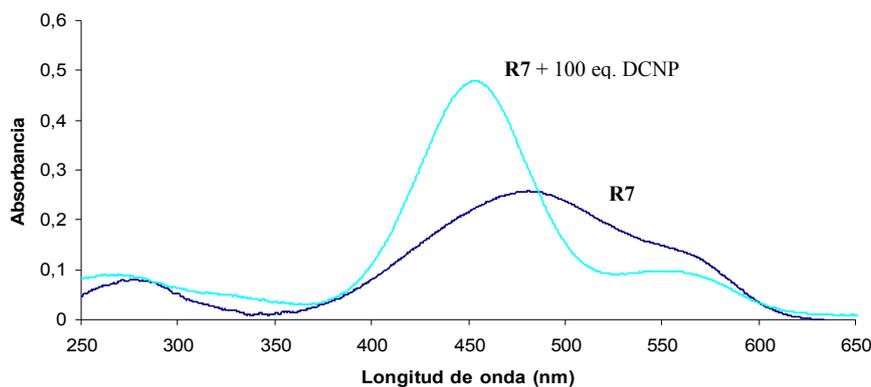


**Figura 3.17** Fotografía de **R7** ( $1.0 \times 10^{-5}$  mol  $\text{dm}^{-3}$  en agua/acetonitrilo 3:1 v/v a pH 5.6) sólo y en presencia de 100 equivalentes de DCP y DCNP (de izquierda a derecha).

Sin embargo, se observó un comportamiento muy diferente cuando se añadió DCNP a las disoluciones en acetonitrilo-agua 25:75 v/v de **R7**. Inicialmente la adición de DCNP indujo un cambio inmediato en el color, de naranja a magenta, que es similar al observado cuando se adicionó DCP e

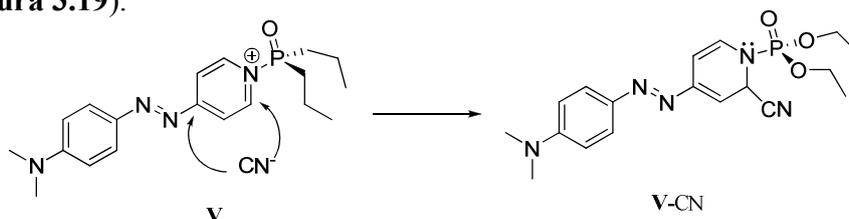
<sup>81</sup> E. Cariati, R. Macchi, D. Roberto, R. Ugo, S. Galli, N. Masciocchi, A. Sironi *Chem. Mater.*, **2007**, 19, 3704.

indica la fosforilación de la piridina. Sin embargo, la disolución magenta se volvió de color amarillo en pocos minutos (**Figura 3.17**). El espectro UV-Visible final muestra una banda intensa centrada en 452 nm con un hombro a 551 nm (**Figura 3.18**).



**Figura 3.18** Espectro de absorción UV-Vis de: receptor **R7** ( $1.0 \times 10^{-5}$  mol  $\text{dm}^{-3}$ ) en agua/acetonitrilo (3:1 v/v) a pH 5.6 y **R7** con 100 equivalentes de DCNP.

Teniendo en cuenta que la reacción entre **R7** y el DCNP produce la fosforilación de la piridina (producto **V** en **Figura 3.10** de color magenta) y libera al anión cianuro, pensamos que el consiguiente cambio de color a amarillo podría ser debido a la reacción de este anión nucleofílico con los átomos de carbono deficientes en electrones del anillo de piridínio **V** (**Figura 3.19**).<sup>82</sup>

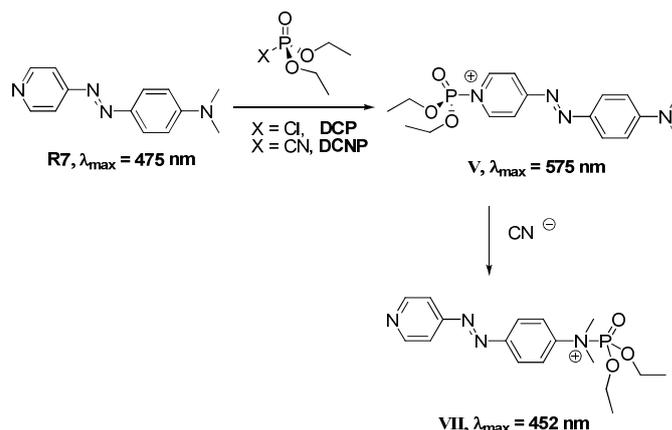


**Figura 3.19** Mecanismo propuesto de la adición de cianuro a las posiciones deficientes en densidad electrónica del anillo de piridínio 2 y 6. Sólo se muestra el producto de adición en la posición 2.

Esta reactividad del anión cianuro es muy común y se han descrito derivados de pirilío y tiopirilío que experimentan reacciones de adición con dicho anión dando cambios de color importantes. Sin embargo, en los espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN del producto amarillo final no se observó ninguna señal de carbono situada en la región de 117 a 125 ppm que pudiera ser asignada a un grupo nitrilo. La ausencia de esta señal nos hizo descartar el

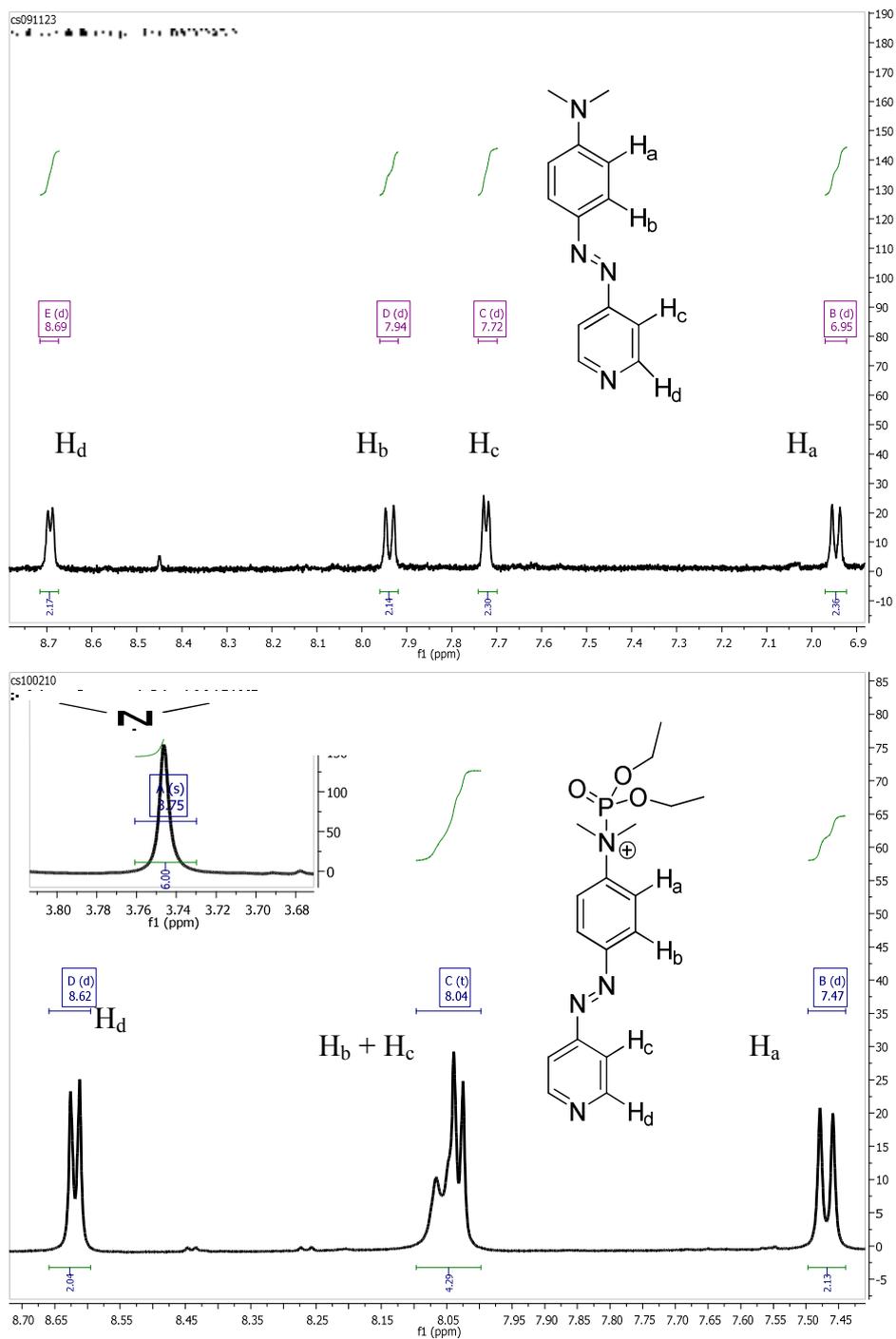
<sup>82</sup> T. Ábalos, S. Royo, R. Martínez-Mañez, F. Sancenón, J. Soto, A. M. Costero, S. Gil, M. Parra, *New J. Chem.*, **2009**, 33, 1641.

ataque nucleofílico del cianuro a **R7** como mecanismo de la respuesta cromogénica observada. Teniendo en cuenta que se han descrito reacciones de trasposición de fosfatos en derivados de piridinas, dirigimos nuestra atención hacia la posibilidad de que los cambios de color observados fueran debidos a una transferencia desde el átomo de nitrógeno de la piridina al átomo de nitrógeno de la anilina dando el producto fosforilado en el anillo de anilina, que sería el responsable de la banda centrada a 452 nm (estructura **VII** en la **Figura 3.20**). La fosforilación de la anilina induciría una disminución del carácter electrón-dador de su átomo de nitrógeno provocando una disminución importante del carácter de transferencia de carga de la banda de absorción del producto que se reflejaría en un corrimiento al azul de la banda de absorción.



**Figura 3.20** Reacción de fosforilación del reactivo cromogénico **R7** con los simulantes de agentes de guerra química y longitudes de onda de los máximo de absorción de las especies formadas en agua/acetonitrilo (3:1) tamponada a pH 5.6 con MES ( $1.0 \times 10^{-1} \text{ mol dm}^{-3}$ )

Los estudios de RMN de este producto indican de manera inequívoca la formación de **VII**. En la ampliación del espectro de protón mostrado en la figura interior de la **Figura 3.21** (debajo) se observa que la señal a 3.19 ppm de los hidrógenos de los metilos de la anilina en el producto **R7** se desplaza hasta 3.75 en **VII** debido a la pérdida del carácter electrón-dador del átomo de nitrógeno de la anilina al cargarse positivamente. Además, como se observa en la ampliación de la zona aromática del espectro  $^1\text{H}$ -RMN de **R7** tras reaccionar con DCNP, mostrado en la **Figura 3.21** (debajo), la señal de los hidrógenos en orto al grupo dimetilamino ( $\text{H}_a$ ) deja de estar apantallada ( $\delta = 6.95 \text{ ppm}$ ) por la pérdida de la densidad electrónica del átomo de nitrógeno y se desplaza hasta 7.47 ppm.



**Figura 3.21** Espectro de <sup>1</sup>H-RMN (zona aromática) del reactivo cromogénico **R7** (izquierda) y de **R7** tras reaccionar con DCNP (derecha) realizado en CD<sub>3</sub>CN-D<sub>2</sub>O 25:75 v/v (saturado con MES).

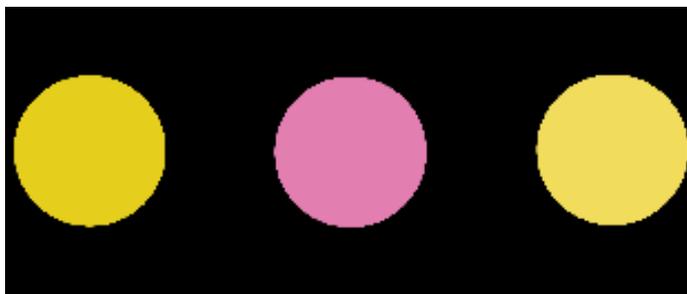
Para confirmar el mecanismo propuesto se realizaron espectros de  $^{31}\text{P}$ -RMN. Así, en el espectro  $^{31}\text{P}$ -RMN se observó un triplete (1:1:1) a 9,5 ppm, que se puede atribuir al acoplamiento  $^{31}\text{P}$ - $^{14}\text{N}$  (con una  $J = 100$  Hz típica de acoplamientos P-N a un enlace), además el hecho de que se observe este acoplamiento también sugiere una baja velocidad de relajación de este  $^{14}\text{N}$  que indica un entorno con cierta simetría (compatible con un átomo de nitrógeno cuaternizado). Por otra parte, cuando este producto es analizado por HPLC-MS se observa un pico con una relación  $m/z$  de 365, correspondiente a  $[M + 2]$ . Más característica es la presencia de un pico con una relación  $m/z$  de 182 que se puede atribuir al fragmento  $(\text{CH}_3)_2\text{N-PO}(\text{OEt})_2$ . Esta fragmentación entre el carbono aromático y el átomo de nitrógeno de la anilina ha sido descrita como típica de este tipo de sistemas.<sup>83</sup> Además, no se encontraron evidencias espectroscópicas para la fosforilación de los nitrógenos del grupo azo ( $\text{N}=\text{N}$ ) en las condiciones de reacción utilizadas.

El comportamiento diferente observado para **R7** en presencia de DCP, DFP y DCNP está relacionado con la reversibilidad de la reacción de fosforilación en presencia de cianuro. Esto está de acuerdo con ciertos trabajos publicados que describen la existencia de reacciones de fosforilación reversibles con derivados de piridina.<sup>84</sup> Los datos sugieren que cuando se añade DCNP, DCP o DFP a las disoluciones acuosas de **R7** tiene lugar la fosforilación en el resto de piridina (**V** en la **Figura 3.20**). Con DCNP, el anión cianuro, generado por la fosforilación de la piridina, cataliza la migración del fosfato de la piridina a la anilina (estructura **VII** en la **Figura 3.20**). Los límites de detección visuales alcanzados en disolución acuosa para **R7** fueron de  $5.7 \times 10^{-3}$ ,  $9.0 \times 10^{-4}$  y  $1.9 \times 10^{-2}$  M para DCNP, DCP y DFP, respectivamente.

---

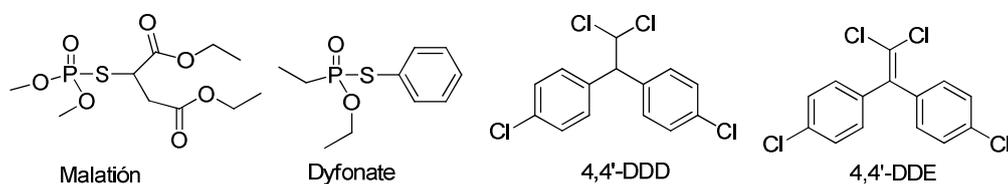
<sup>83</sup> (a) C. T. Vijayakumar, D. Jayaprakash, M. J. Nanjan, *Polymer Plast. Tech. Eng.*, **2007**, 46, 1187; (b) Z. -M. Gu, J. Ma, X. -G. Zhao, J. Wu, D. Ahang, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2006**, 20, 2969.

<sup>84</sup> J. Nilsson, A. Kraszewski, J. Stawinski, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **2001**, 2263.



**Figura 3.22** Membranas de poliuretano con el reactivo **R7** inmovilizado. De izquierda a derecha; **R7**, **R7** en presencia de vapores de DCP y **R7** en presencia de vapores de DCNP.

Alentados por estos resultados favorables, que nos permitían la discriminación colorimétrica del DCNP, simulante del agente nervioso Tabún, respecto del DCP y DFP, se dio un paso más y se llevaron a cabo estudios sobre el posible uso de esta reacción para la detección de agentes nerviosos en fase gas. Para estudiar esta posibilidad, se preparó una película de poliuretano hidrófilo con el compuesto **R7** como un prototipo de detector colorimétrico. En un ensayo típico el polímero se expone a aire que contiene DCP o DCNP (100 ppm v/v). Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 3.22**. Se observó una modulación de color similar a la encontrada en disolución (**Figura 3.12**). Esto indica que tanto el DCP como el DCNP son capaces de reaccionar en fase gas con **R7** mostrando cambios de color diferenciados, por lo que es posible diseñar dosímetros cromogénicos selectivos para la detección de estos simulantes de agentes nerviosos en fase gas. Los cambios de color se observan a simple vista para concentraciones de 8 y 80 ppm (v/v) de DCP y DCNP, respectivamente.



**Figura 3.23** Estructura química de malatión, dyfonate, 4,4'-DDD y 4,4'-DDE.

También se evaluó el funcionamiento de las películas de poliuretano con el compuesto **R7** en presencia de posibles interferentes que pudieran estar presentes en un entorno militar o en un ambiente civil. Así, se emplearon Malatión, Dyfonate, 4,4'-DDD, 4,4'-DDE (**Figura 3.23**) y gases

de escape de motores gasolina y diesel.<sup>85</sup> En un experimento típico, las películas que contenían **R7** fueron suspendidas en un matraz de fondo redondo en una atmósfera saturada de vapores de los insecticidas Malatión, Dyfonate, 4,4'-DDD, 4,4'-DDE durante 24 horas. Por otra parte se pusieron membranas del polímero con el compuesto **R7** bajo un flujo abundante de los humos de escape de motores de gasolina y diesel durante más de 30 minutos. En todos los casos no se observó cambio en el color. Además se confirmó que las películas de **R7** todavía eran capaces de reaccionar con DCP y DCNP en presencia de estos potenciales interferentes. También se llevaron a cabo estudios con los posibles interferentes en disolución. En este caso, se añadieron 160 ppm de Malatión, Dyfonate, 4,4'-DDD y 4,4'-DDE a las disoluciones de **R7** en acetonitrilo y se observó que no se producían cambios en el color. Se realizaron experimentos análogos en mezclas acetonitrilo-agua 25:75 v/v a pH 5.6 y tampoco se detectó modificación del color. Por otra parte, cuando se añadió DCP o DCNP a las disoluciones en acetonitrilo-agua 25:75 v/v de **R7** que contenían estos posibles interferentes, se observaron cambios de color como los que se muestran en la fotografía de la **Figura 3.14**, lo que indica que estas especies no interfieren en la detección de los simulantes de agentes nerviosos. Los espectros UV-Vis de estas pruebas eran idénticos (en la parte visible del espectro) a los mostrados en las **Figuras 3.11 y 3.16**.

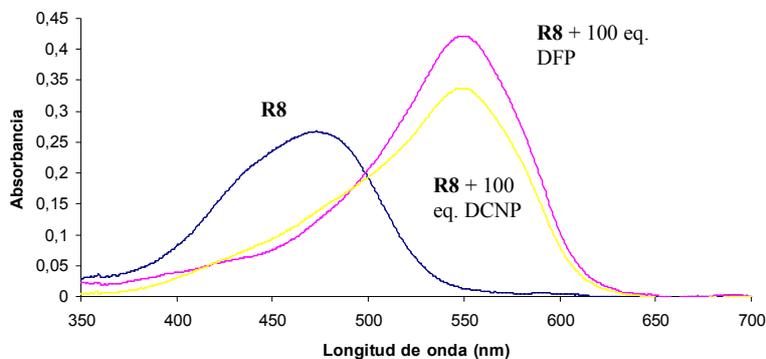
### 3.4.2 Estudios con los cromoreactivos **R8-R11**

Posteriormente se evaluó la respuesta cromogénica frente a los simulantes de gases nerviosos de los reactivos **R8-R11** en acetonitrilo. De los cuatro reactivos cromogénicos ensayados **R10** fue incapaz de dar cambios de color al adicionar DFP, DCP y DCNP. Esta falta de respuesta de este compuesto es debida a la poca basicidad y nucleofilia del átomo de nitrógeno de la piridina debido a la presencia de dos átomos de cloro en las posiciones 2 y 6.<sup>86</sup> Además, los impedimentos estéricos que provocan dichos átomos dificultan el solapamiento entre los orbitales  $\pi$  de la piridina y los orbitales d del átomo de fósforo en el estado de transición.<sup>77a</sup>

---

<sup>85</sup> D. K. Rohrbaugh, E. W. Sarver, *J. Chromatogr. A*, **1998**, 809, 141.

<sup>86</sup> G. P. Bean, C. D. Johnson, A. R. Katritzky, B. J. Ridgewell, and A. M. White, *J. Chem. Soc. (B)*, **1967**, 1219. El valor del  $pK_a$  de los productos relacionados 4-aminopiridina y 4-amino-2,6-dicloropiridina es de 9.17 y 1.17 respectivamente.



**Figura 3.24** Espectro de absorción UV-Vis de: receptor cromogénico **R8** (acetonitrilo,  $1 \times 10^{-5}$  mol  $\text{dm}^{-3}$ ), **R8** con 100 equivalentes de DFP y **R8** con 100 equivalentes de DCNP.

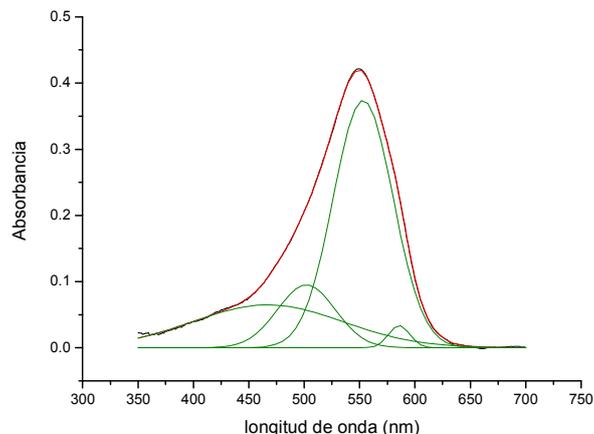
Las disoluciones en acetonitrilo del receptor **R8** ( $1.0 \times 10^{-5}$  mol  $\text{dm}^{-3}$ ) presentan una banda de absorción intensa centrada a 473 nm (la disolución es de color amarillo) que se puede asignar a un colorante azoico con una transferencia de carga moderada (**Figura 3.24**). Se estudió el efecto de la adición de 100 equivalentes de DFP y DCNP sobre disoluciones del receptor **R8** en acetonitrilo y se observó el desplazamiento batocrómico de la banda situada a 473 nm al adicionar los dos simulantes. El desplazamiento de la banda de absorción a longitudes de onda mayores induce un cambio de color de las disoluciones de **R8** que pasan de amarillo a morado (**Figura 3.25**) en presencia de DFP y DCNP (más intenso con DFP que con DCNP).



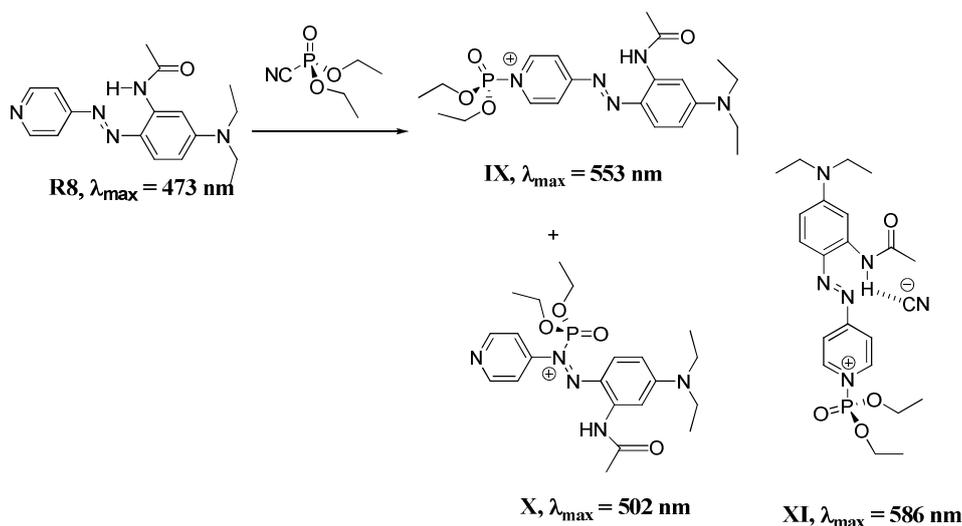
**Figura 3.25** Fotografía de **R8** ( $1.0 \times 10^{-5}$  mol  $\text{dm}^{-3}$  en acetonitrilo) sólo y en presencia de 100 equivalentes de DCNP y DFP (de izquierda a derecha).

La forma ancha de la banda desplazada hacia el rojo tras la reacción con los simulantes nos sugirió la presencia de distintas especies. Por ello se llevó a cabo la deconvolución de los espectros de UV-Vis obtenidos tras la adición de los simulantes. Así, se observó que la deconvolución del espectro UV-Visible obtenido tras la adición de DFP (**Figura 3.26**) mostraba la presencia de cuatro absorciones centradas a 467, 502, 553 y 586 nm. La banda de absorción centrada a 467 nm se asigna al reactivo **R8** libre mientras que las bandas a 501, 553 y 586 nm pertenecen a tres nuevas

especies que aparecen tras la reacción de **R8** con DFP y DCNP. El hecho de que estas tres nuevas bandas aparezcan a longitudes de onda mayores que la que presenta el reactivo cromogénico libre, sugieren que las nuevas especies presentan una mayor deslocalización electrónica.



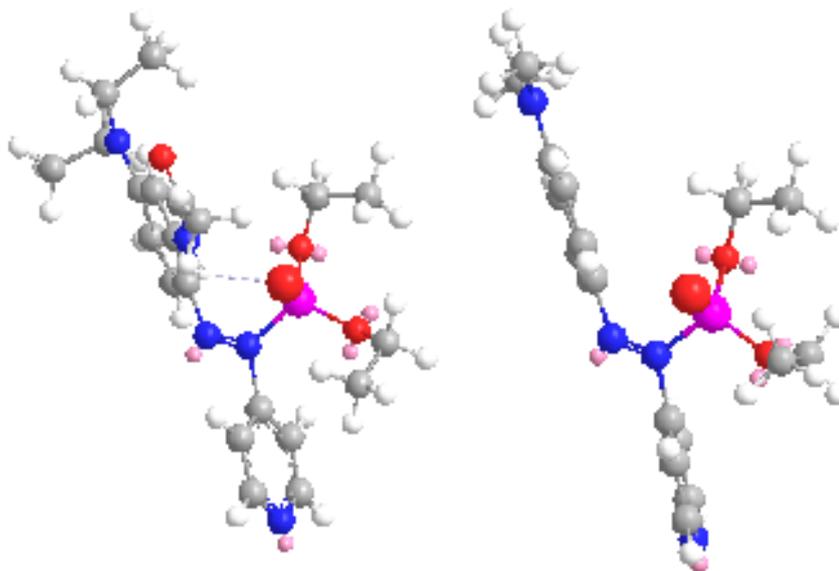
**Figura 3.26** Espectro de absorción UV-Vis del receptor **R8** (acetonitrilo  $1 \times 10^{-5}$  mol  $\text{dm}^{-3}$ ) tras reaccionar con 100 equivalentes de DFP y su deconvolución.



**Figura 3.27** Reacciones de fosforilación y formación de complejo del reactivo cromogénico **R8** con DCNP y longitudes de onda de los máximos de absorción de las especies formadas en acetonitrilo.

Al igual que sucedía con **R7** como se puede ver en la **Figura 3.27**, los únicos productos que se pueden formar por la reacción entre el reactivo

cromogénico **R8** y los simulantes de agentes de guerra química, que den un desplazamiento batocrómico de la banda de absorción UV-Vis, son los que se obtienen tras la reacción con el átomo de nitrógeno del grupo azo más próximo a la piridina ó con el átomo de nitrógeno de la piridina. Esto es debido a que las cargas positivas que se forman en la reacción se estabilizan por la resonancia del par de electrones solitario del átomo de nitrógeno de la anilina. Ahora bien, en este caso, la presencia del NH del grupo amida permite la formación de complejos con los aniones que se generan en la reacción de fosforilación lo que daría lugar a la tercera especie.<sup>87</sup> La asignación de las distintas bandas a las especies que se forman es análoga a la que se realizó para **R7**. Sin embargo los desplazamientos batocrómicos respecto del producto de partida en este caso son menores, 29 nm para la especie fosforilada en el azo y 80 nm para la especie fosforilada en la piridina. La razón de estos menores desplazamientos podría residir en la presencia del grupo amida en el anillo de anilina. En efecto, la modelización de la especie **X** (haciendo uso del programa ChemBio3D) indica que el sistema conjugado está mucho más alejado de la planaridad que su análoga **VI** debido a que se forma un enlace de H entre el NH de la amida y el oxígeno doblemente enlazado al átomo de fósforo. Estos resultados se muestran en la **Figura 3.28**.

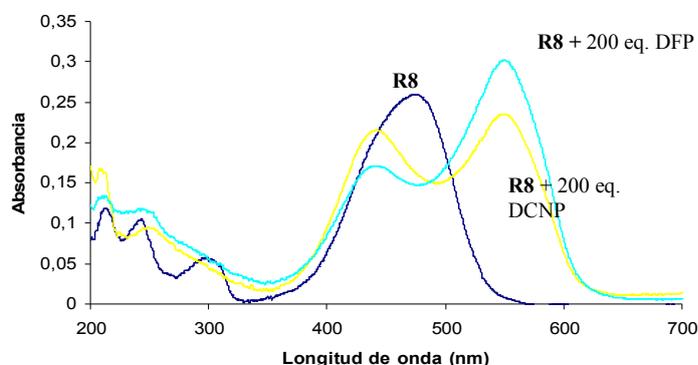


**Figura 3.28** Conformaciones de mínima energía para los productos de fosforilación en el átomo de N del grupo azo con DCNP (**X**) de **R8** (izquierda) y de **R7** (**VI**) (derecha).

<sup>87</sup> C. M. G. dos Santos, T. McCabe, G. W. Watson, P. E. Kruger, T. Gunnlaugsson, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 9235.

Del mismo modo **IX** también presenta una falta de planaridad provocada por la formación de un enlace de hidrógeno entre el átomo de hidrógeno del NH de la amida y el N del grupo azo más cercano al anillo de piridina. Esta asignación conformacional esta avalada por estudios de difracción de Rayos-X de compuestos similares.<sup>88</sup> La pequeña banda que aparece en la deconvolución del espectro situada a 586 nm, que aparece desplazada hacia el rojo en 33 nm respecto del producto de fosforilación en el N de la piridina (**X**), se asignó al producto de complejación del anteriormente mencionado producto (**X**) con los aniones fluoruro y cianuro que se generan en la reacción de fosforilación.

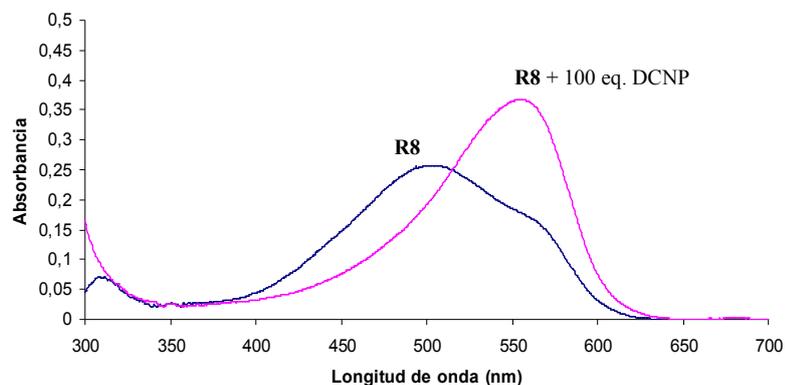
Adicionalmente se observó que con mayores cantidades de los simulantes DFP y DCNP aparecía otra banda situada a 441 nm (**Figura 3.29**). Ésta banda se asignó a la especie fosforilada en el átomo de nitrógeno de la piridina y protonada en el átomo de nitrógeno de la anilina con los productos de hidrólisis del DFP y DCNP (HF y HCN respectivamente), ya que el espectro UV-visible es idéntico al que se obtiene si añadimos ácido a las disoluciones de **R8** tras reaccionar con 100 equivalentes de DFP.



**Figura 3.29** Espectro de absorción UV-Vis de: receptor cromogénico **R8** (acetonitrilo,  $1 \times 10^{-5}$  mol  $\text{dm}^{-3}$ ), **R8** con 200 equivalentes de DFP y **R8** con 200 equivalentes de DCNP.

Finalmente, se determinó la mínima cantidad de DFP y de DCNP que era capaz de producir cambios de color detectables a simple vista. Así, los límites de detección visuales que se alcanzaron con **R8** fueron de  $3.7 \times 10^{-4}$  M (68 ppm) para el DFP y  $2.0 \times 10^{-4}$  M (33 ppm) para el DCNP.

<sup>88</sup> (a) D. Greenwood, M. G. Hutchings, B. Lamble, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II*, **1986**, 1107. (b) E. Hoyer, R. Schickfluss, W. Steckelberg, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **1973**, 12, 926. (c) J. C. J. Bart, M. Calcaterra, K. A. Woode, *Dyes and Pigments*, **1984**, 5, 145; (d) M. Komeyama, S. Yamamoto, N. Nishimura, and S. Hasegawa, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1973**, 46, 2606.

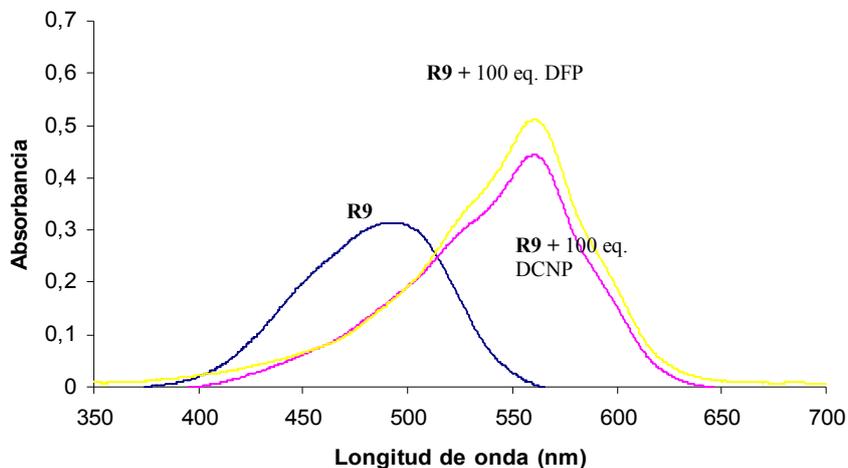


**Figura 3.30** Espectro de absorción UV-Vis de: receptor cromogénico **R8** ( $1.0 \times 10^{-5}$  mol  $\text{dm}^{-3}$ ) en agua/acetonitrilo (3:1 v/v) a pH 5.6 y **R8** con 100 equivalentes de DCNP.

De cara a una posible aplicación de **R8** en la detección cromogénica de agentes de guerra química en medios acuosos se estudió el comportamiento UV-visible del receptor en mezclas acuosas. Así, el espectro UV-Vis del compuesto **R8** en una mezcla acetonitrilo-agua 25:75 v/v tamponada con MES ( $0.1 \text{ mol dm}^{-3}$ , pH 5.6) muestra una banda centrada a 506 nm con un hombro a 556 nm (**Figura 3.30**). La banda centrada en 506 nm se asigna al reactivo **R8**, mientras que la absorción a 556 nm es debida a **R8-H<sup>+</sup>** en el que el protón está situado en el nitrógeno del anillo de piridina. Al adicionar tanto DFP como DCNP sobre disoluciones de **R8** en acetonitrilo-agua 25:75 v/v tamponada con MES ( $0.1 \text{ mol dm}^{-3}$ , pH 5.6) se observó la aparición de una única banda centrada a 556 nm, incluso con 200 equivalentes, debido a la fosforilación del átomo de nitrógeno de la piridina y un cambio de color de la disolución de rosa a morado (ver **Figura 3.31**).



**Figura 3.31** Fotografía de **R8** ( $1.0 \times 10^{-5}$  mol  $\text{dm}^{-3}$  en agua/acetonitrilo 3:1 v/v a pH 5.6) sólo y en presencia de 100 equivalentes de DCNP (de izquierda a derecha).



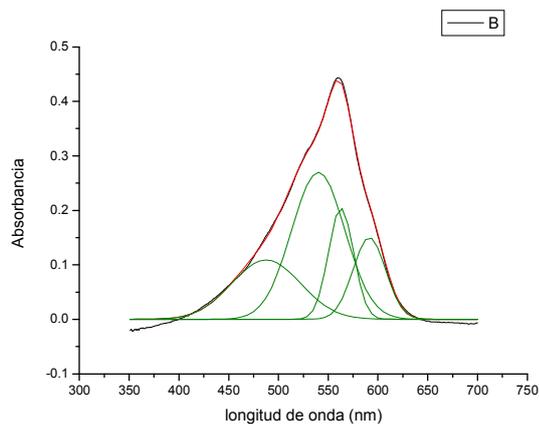
**Figura 3.32** Espectro de absorción UV-Vis de: receptor cromogénico **R9** (acetonitrilo,  $1 \times 10^{-5}$  mol  $\text{dm}^{-3}$ ), **R9** con 100 equivalentes de DFP y **R9** con 100 equivalentes de DCNP.

El comportamiento del reactivo cromogénico **R9** es muy similar al que hemos descrito anteriormente para **R8**. Sus disoluciones en acetonitrilo ( $1 \times 10^{-5}$  mol  $\text{dm}^{-3}$ ) presentan una banda de absorción en la zona visible centrada a 490 nm (la disolución es de color naranja). Al añadir 100 equivalentes de DCP, DFP y DCNP se observó la misma respuesta cromogénica (**Figuras 3.32** y **3.33**), cambió el color de la disolución de naranja a morado debido un desplazamiento batocrómico de la banda.



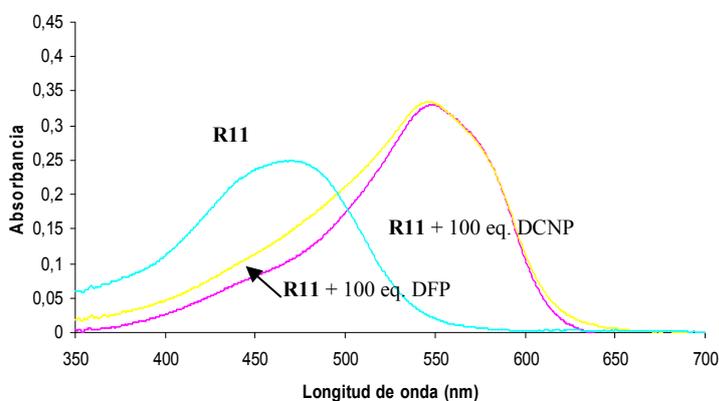
**Figura 3.33** Fotografía de **R9** ( $1.0 \times 10^{-5}$  mol  $\text{dm}^{-3}$  en acetonitrilo) sólo y en presencia de 100 equivalentes de DCP, DFP y DCNP (de izquierda a derecha).

Igual que con **R8** la forma ancha de la banda desplazada hacia el rojo tras la reacción con los simulantes nos sugirió la presencia de distintas especies. Por ello se llevó a cabo la deconvolución de los espectros de UV-Vis obtenidos tras la adición de los simulantes. Así, se observó que la deconvolución de los espectros UV-visible obtenidos tras la adición de DCP, DFP y DCNP mostraban la presencia de cuatro absorciones centradas a 490, 540, 563 y 591 nm (**Figura 3.34**).



**Figura 3.34** Espectro de absorción UV-Vis del receptor cromogénico **R9** (acetonitrilo  $1 \times 10^{-5}$  mol  $\text{dm}^{-3}$ ) tras reaccionar con 100 equivalentes de DFP y su deconvolución.

La asignación de bandas a las distintas especies se hizo de forma análoga a la indicada para **R8**. Cabe destacar que en este caso la formación del correspondiente complejo con el anión que se libera en la reacción de fosforilación es mayor. Este hecho puede ser debido a la mayor acidez del NH de la amida por el efecto inductivo electrón-atractor del átomo de bromo. Los límites de detección visuales que se alcanzaron con **R9** fueron de  $5.56 \times 10^{-4}$  M (102 ppm) para el DFP,  $8.03 \times 10^{-4}$  M (131 ppm) para el DCNP y  $2.24 \times 10^{-4}$  M (39 ppm) para el DCP. Si se hace uso de técnicas instrumentales como la espectroscopía UV-Visible los límites de detección son claramente más bajos (34 ppm para el DFP y 33 ppm para el DCNP).



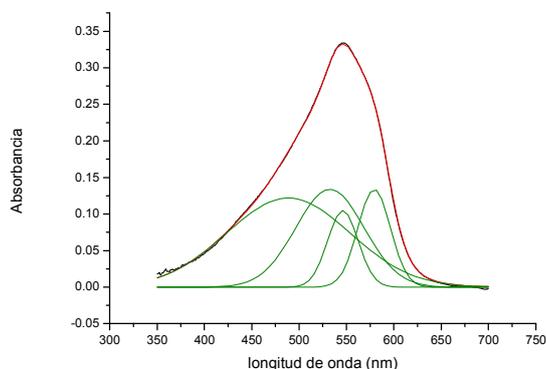
**Figura 3.35** Espectro de absorción UV-Vis de: receptor cromogénico **R11** (acetonitrilo,  $1 \times 10^{-5}$  mol  $\text{dm}^{-3}$ ), **R11** con 100 equivalentes de DFP y **R11** con 100 equivalentes de DCNP.

Finalmente se estudió el comportamiento del reactivo cromogénico **R11** con los simulantes DFP y DCNP. Las disoluciones en acetonitrilo del receptor **R11** ( $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) presentan una banda de absorción intensa centrada a 469 nm (la disolución es de color amarillo) que se puede asignar a un colorante azoico con una transferencia de carga moderada (**Figura 3.35**). A continuación, se estudió el efecto de la adición de 100 equivalentes de DCNP y DFP sobre disoluciones del receptor **R11** en acetonitrilo. Como consecuencia de esta adición se observó la aparición de una nueva banda centrada a 547 nm y un cambio de color de la disolución de amarillo a rosa (**Figura 3.36**) para ambos simulantes.



**Figura 3.36** Fotografía de **R11** ( $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$  en acetonitrilo) sólo y en presencia de 100 equivalentes de DCNP y DFP (de izquierda a derecha).

De nuevo la forma ancha de la banda desplazada hacia el rojo tras la reacción con los simulantes nos sugirió la presencia de distintas especies. Por ello se llevó a cabo la deconvolución de los espectros de UV-Vis obtenidos tras la adición de los simulantes. Así, se observó que la deconvolución del espectro UV-Visible obtenidos tras la adición de DFP, por ejemplo, mostraba la presencia de cuatro absorciones centradas a 488, 532, 546 y 579 nm (**Figura 3.37**).

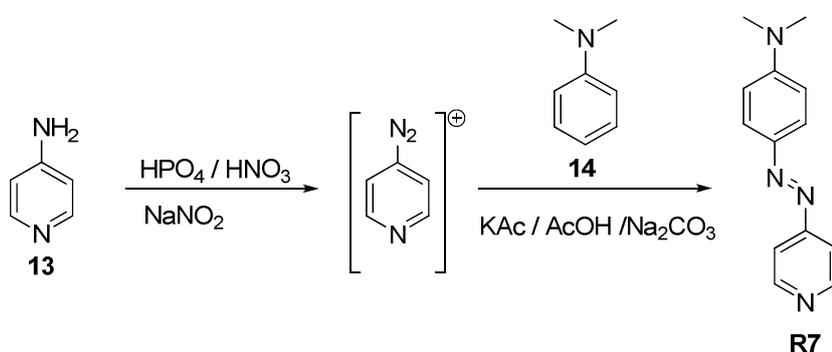


**Figura 3.37** Espectro de absorción UV-Vis y su deconvolución del receptor cromogénico **R9** (acetonitrilo  $1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) tras reaccionar con 100 equivalentes de DFP.

La asignación de bandas a las distintas especies se hizo en forma análoga a la indicada para **R8** y **R9**. Como se puede observar en este caso la formación de los correspondientes complejos con el anión que se libera en la reacción de fosforilación es muchísimo mayor que para **R9** y **R8** debido a la mayor facilidad de los NH de la tiourea a formar complejos por enlace de hidrógeno. Los límites de detección visuales que se alcanzaron con el reactivo cromogénico **R11** fueron de  $5.55 \times 10^{-4}$  M (102 ppm) para el DFP y  $6.0 \times 10^{-4}$  M (99 ppm) para el DCNP, aunque son mucho menores (del orden de las 30 ppm) si se hace uso de técnicas instrumentales como la espectroscopía UV- Vis.

### 3.5 Procedimientos experimentales

#### Síntesis de *N,N*-Dimetilanilina-4-azopiridina (**R7**)



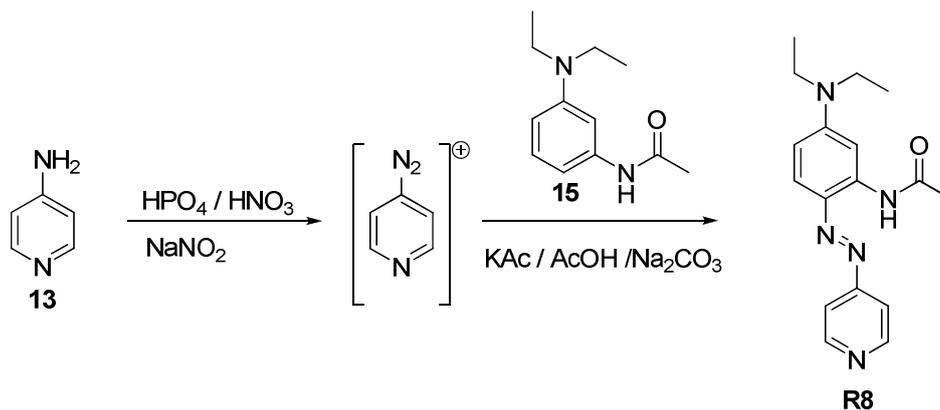
En un matraz de fondo redondo de 100 mL provisto de agitación magnética se disuelve 4-aminopiridina (**13**) (3.6 g, 38.25 mmol) en una mezcla de ácido fosfórico (85%, 20 mL) y ácido nítrico (68%, 10 mL). Se coloca el matraz en un baño de agua-hielo y se adiciona muy lentamente  $\text{NaNO}_2$  (2.8 g, 40.6 mmol) hasta su completa disolución, manteniendo la temperatura a  $0^\circ\text{C}$ . Después se añaden 50 g de hielo picado y la suspensión resultante se agita durante 1 hora, obteniéndose una disolución de la sal de diazonio de color amarillo. En un vaso de 1 L se disuelven ácido acético (40 g), acetato potásico (64 g) y carbonato de sodio (56 g) en agua (800 mL) y se añade sobre esta disolución *N,N*-dimetilanilina (**14**) (8.4 g, 66.3 mmol). La disolución amarilla de la sal de diazonio se añade gota a gota manteniendo la temperatura a  $5^\circ\text{C}$ , utilizando un baño de agua-hielo. La disolución roja resultante se agita durante 3 horas. Precipita un sólido de color naranja que se aísla por filtración y se seca en estufa a  $70^\circ\text{C}$ , obteniéndose 4.46 g (51%) del producto en forma de sólido brillante de color naranja.

$^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.64 (d,  $J = 4.4$  Hz, 2H), 7.83 (d,  $J = 9.3$  Hz, 1H), 7.58 (dd,  $J = 4.7, 1.5$  Hz, 2H), 6.67 (d,  $J = 9.3$  Hz, 1H), 3.04 (s, 6H).

$^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  158.59, 153.82, 151.01, 143.97, 126.47, 116.53, 111.83, 40.66.

HRMS (EI):  $m/z$  calculada para  $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{N}_4$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 227.1297  $[\text{M}+\text{H}]^+$  encontrada: 227.1302

### Síntesis de 5-(*N,N*-dietilamino)acetanilida-2-azopiridina (R8)



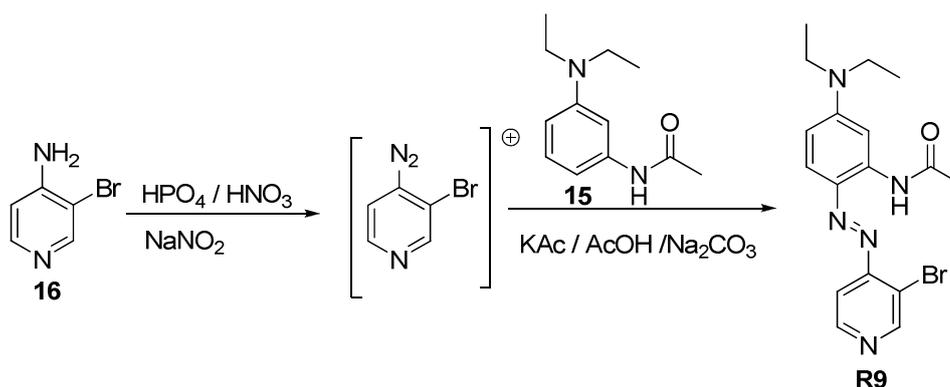
En un matraz de fondo redondo de 50 mL provisto de agitación magnética se disuelve 4-aminopiridina (**13**) (1.02 g, 11 mmol) en una mezcla de ácido fosfórico (85%, 10 mL) y ácido nítrico (68%, 5 mL). Se coloca el matraz en un baño de agua-hielo y se adiciona muy lentamente  $\text{NaNO}_2$  (0.75 g, 11 mmol) hasta su completa disolución, manteniendo la temperatura a  $0^\circ\text{C}$ . Después se añaden 20 g de hielo picado y la suspensión resultante se agita durante 1 hora, obteniéndose una disolución de la sal de diazonio de color amarillo. En un vaso de 1 L se disuelven ácido acético (5 g), acetato potásico (8 g) y carbonato de sodio (7 g) en agua (100 mL) y se añade sobre esta disolución 3-(*N,N*-dietilamino)acetanilida (**15**) (2.95 g, 14.3 mmol). La disolución amarilla de la sal de diazonio se añade gota a gota manteniendo la temperatura a  $5^\circ\text{C}$ , utilizando un baño de agua-hielo. La disolución de color rojo-púrpura resultante se agita durante 12 horas. Precipita un sólido de oscuro color púrpura que se aísla por filtración y se seca en estufa a  $70^\circ\text{C}$ , obteniéndose 1.4 g (41%) del producto en forma de sólido brillante de color púrpura.

$^1\text{H RMN}$  (300 MHz, DMSO)  $\delta$  10.61 (banda ancha del NH, 1H), 8.78 (d,  $J = 6.8$  Hz, 2H), 8.13 (d,  $J = 7.0$  Hz, 2H), 7.94 (d,  $J = 2.7$  Hz, 1H), 7.84 (d,  $J = 9.7$  Hz, 1H), 6.79 (dd,  $J = 9.7, 2.8$  Hz, 1H), 3.57 (q,  $J = 6.9$  Hz, 4H), 2.26 (s, 3H), 1.22 (t,  $J = 7.0$  Hz, 6H).

$^{13}\text{C RMN}$  (75 MHz, DMSO)  $\delta$  169.77, 162.03, 155.12, 143.40, 142.84, 133.27, 124.43, 117.29, 110.02, 100.73, 45.37, 25.05, 12.72.

**HRMS (EI):**  $m/z$  calculada para  $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{N}_5\text{O}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 312.1824  $[\text{M}+\text{H}]^+$  encontrada: 312.1826

### Síntesis de 5-(*N,N*-dietilamino)acetanilida-2-azo-(3-bromo-4-piridina) (**R9**)



En un matraz de fondo redondo de 50 mL provisto de agitación magnética se disuelve 4-amino-3-bromopiridina (**16**) (312 mg, 1.81 mmol) en una mezcla de ácido fosfórico (85%, 10 mL) y ácido nítrico (68%, 5 mL). Se coloca el matraz en un baño de agua-hielo y se adiciona muy lentamente  $\text{NaNO}_2$  (125 mg, 1.81 mmol) hasta su completa disolución, manteniendo la temperatura a  $0^\circ\text{C}$ . Después se añaden 10 g de hielo picado y la suspensión resultante se agita durante 1 hora, obteniéndose una disolución de la sal de diazonio de color amarillo. En un vaso de 500 mL se disuelven ácido acético (5 g), acetato potásico (8 g) y carbonato de sodio (7 g) en agua (100 mL) y se añade sobre esta disolución 3-(*N,N*-dietilamino)acetanilida (**17**) (374 g, 1.81 mmol). La disolución amarilla de la sal de diazonio se añade gota a gota manteniendo la temperatura a  $5^\circ\text{C}$ , utilizando un baño de agua-hielo. La disolución de color rojo-púrpura resultante se agita durante 12 horas. Precipita un sólido de color púrpura que

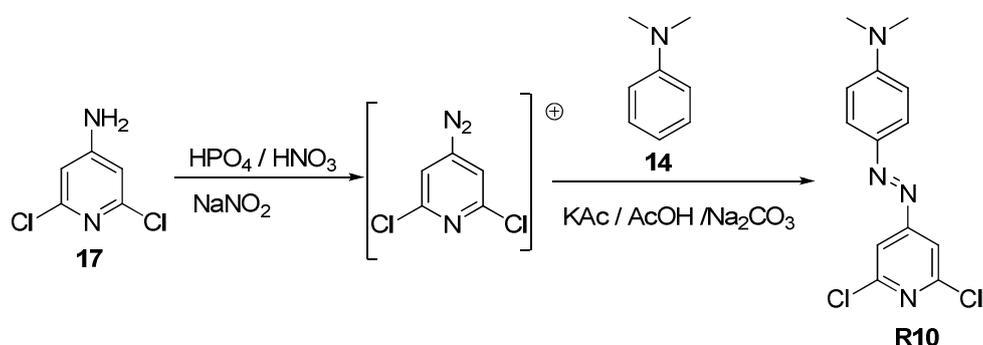
se aísla por filtración y se seca en estufa a 70 °C, obteniéndose 465 mg (66%) del producto en forma de sólido oscuro de color púrpura.

$^1\text{H RMN}$  (300 MHz, DMSO)  $\delta$  11.26 (banda ancha del NH, 1H), 8.99 (s, 1H), 8.59 (d,  $J = 6.1$  Hz, 1H), 8.05 (d,  $J = 2.6$  Hz, 1H), 7.94 (d,  $J = 6.0$  Hz, 1H), 7.78 (d,  $J = 9.6$  Hz, 1H), 6.83 (dd,  $J = 9.6, 2.7$  Hz, 1H), 3.58 (q,  $J = 7.0$  Hz, 4H), 2.27 (s, 3H), 1.22 (t,  $J = 7.0$  Hz, 6H).

$^{13}\text{C RMN}$  (75 MHz, DMSO)  $\delta$  170.17, 157.55, 154.89, 148.14, 144.45, 140.65, 133.25, 129.84, 118.07, 112.09, 110.07, 100.46, 45.46, 25.58, 12.71.

**HRMS (EI):**  $m/z$  calculada para  $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_5\text{O}^{79}\text{Br}$   $[\text{M}]^+$ : 390.0924  $[\text{M}]^+$  encontrada: 390.0918

### Síntesis de *N,N*-Dimetilanilina-4-azo-(2,6-dicloropiridina) (R10)



En un matraz de fondo redondo de 50 mL provisto de agitación magnética se disuelve 4-amino-2,6-dicloropiridina (**17**) (97%, 169 mg, 1 mmol) en una mezcla de ácido fosfórico (85%, 1 mL) y ácido nítrico (68%, 0.5 mL). Se coloca el matraz en un baño de agua-hielo y se adiciona muy lentamente  $\text{NaNO}_2$  (76 mg, 1.1 mmol) hasta su completa disolución, manteniendo la temperatura a 0°C. Después se añaden 5 g de hielo picado y la suspensión resultante se agita durante 1 hora, obteniéndose una disolución de la sal de diazonio de color amarillo. En un vaso de 250 mL se disuelven ácido acético (1.98 g), acetato potásico (3.17 g) y carbonato de sodio (2.74 g) en agua (50 mL) y se añade sobre esta disolución *N,N*-dimetilanilina (**14**) (127  $\mu\text{L}$ , 1 mmol). La disolución amarilla de la sal de diazonio se añade gota a gota manteniendo la temperatura a 5 °C, utilizando un baño de agua-hielo. La disolución roja resultante se agita durante 3 horas. Precipita un sólido de color granate que se aísla por filtración y se seca en estufa a 70 °C,

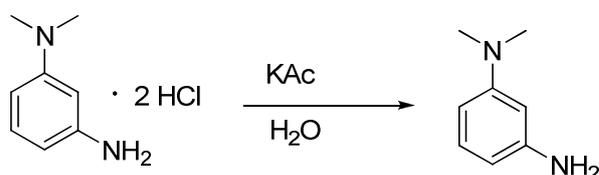
obteniéndose 235 mg (79%) del producto en forma de sólido brillante de color granate.

$^1\text{H RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.83 (d,  $J = 9.3$  Hz, 1H), 7.54 (s, 1H), 6.68 (d,  $J = 9.4$  Hz, 1H), 3.09 (s, 3H).

$^{13}\text{C RMN}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  162.12, 154.57, 151.49, 143.64, 127.45, 115.95, 112.05, 40.79.

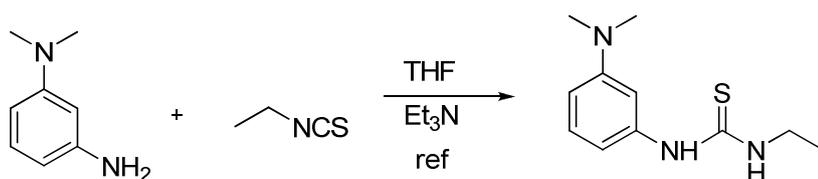
**HRMS (EI):** m/z calculada para  $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{Cl}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 295.0517  $[\text{M}+\text{H}]^+$  encontrada: 295.0518

### Obtención de la *N,N*-dimetil-1,3-parafenilendiamina



En un vaso de precipitados se disuelve dihidrocloruro de *N,N*-dimetil-1,3-parafenilendiamina (1.986 g, 9.5 mmol) en 50 mL de agua y se añade acetato potásico (3.73 g, 38 mmol) en pequeñas porciones. Se agita hasta disolución completa y se extrae con diclorometano ( $3 \times 20$  mL). La reunión de fases orgánicas se seca con  $\text{MgSO}_4$  anhidro, se filtra y el disolvente se elimina por destilación a presión reducida en rotavapor. Se obtienen 1.133g (88%) en forma de aceite.

### Síntesis de 1-(3-(dimetilamino)fenil)-3-etiltiourea (18)



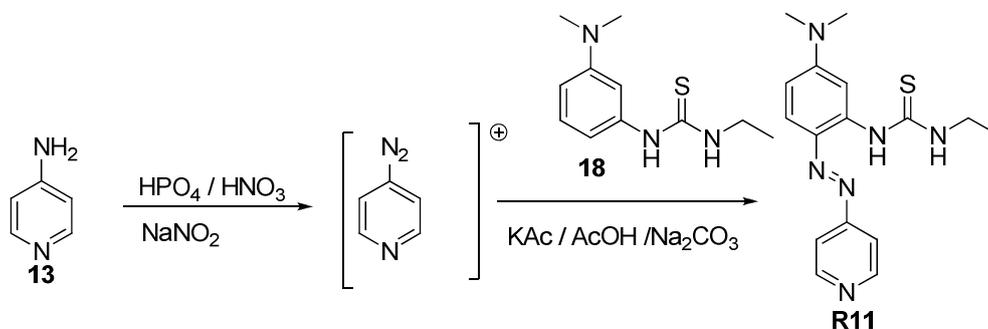
En un matraz de fondo redondo de 100 mL provisto de agitación magnética, calefacción y refrigerante, se disuelve *N,N*-dimetil-1,3-

parafenilendiamina (1.33 g, 9.8 mmol) en 10 mL de THF seco. Se añade trietilamina (1.36 mL, 9.8 mmol) e isotiocianato de etilo (858  $\mu$ L, 9.8 mmol). La mezcla de reacción se calienta a reflujo durante 13 horas. Transcurrido este tiempo, se concentra en el rotavapor para eliminar el disolvente y la trietilamina. Se obtienen 1.91 g (91%) del producto en forma de sólido cristalino ligeramente amarillo.

$^1\text{H RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.95 (s, 1H, NH), 7.28 – 7.21 (m, 1H), 6.62 (dd,  $J = 8.4, 2.5$  Hz, 1H), 6.54 – 6.49 (m, 1H), 6.47 (t,  $J = 2.2$  Hz, 1H), 6.20 (s, 1H, NH), 3.66 (qd,  $J = 7.2, 5.5$  Hz, 2H), 2.95 (s, 6H), 1.18 (t,  $J = 7.2$  Hz, 3H).

$^{13}\text{C RMN}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  180.49, 152.17, 137.37, 130.92, 112.68, 111.34, 108.90, 40.69, 30.07, 14.75.

### Síntesis de 1-(5-(*N,N*-dimetilamino)-2-(azo-(4-piridina))-3-etiltiourea (R11)



En un matraz de fondo redondo de 50 mL provisto de agitación magnética se disuelve 4-aminopiridina (**13**) (86 mg, 0.89 mmol) en una mezcla de ácido fosfórico (85%, 1 mL) y ácido nítrico (68%, 0.5 mL). Se coloca el matraz en un baño de agua-hielo y se adiciona muy lentamente  $\text{NaNO}_2$  (62 mg, 0.89 mmol) hasta su completa disolución, manteniendo la temperatura a  $0^\circ\text{C}$ . Después se añade 1 g de hielo picado y la suspensión resultante se agita durante 1 hora, obteniéndose una disolución de la sal de diazonio de color amarillo. Sobre esta disolución se añade, gota a gota, 1-(3-(dimetilamino)fenil)-3-etiltiourea (**18**) (197 mg, 0.89 mmol) disuelta en etanol (10 mL), manteniendo la temperatura a  $5^\circ\text{C}$  utilizando un baño de agua-hielo. La disolución de color rojo-púrpura resultante se agita durante 12 horas y se vierte sobre una disolución saturada de  $\text{NaHCO}_3$ . Precipita un sólido de color púrpura que se aísla por filtración y se seca en estufa a  $70^\circ\text{C}$

obteniéndose 99 mg (34%) del producto en forma de sólido oscuro de color púrpura.

**<sup>1</sup>H RMN** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.55 (dd, *J* = 4.8, 1.4 Hz, 2H), 7.72 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H), 7.47 (d, *J* = 6.2 Hz, 2H), 7.20 (s, *J* = 1.2 Hz, 1H), 6.45 (dd, *J* = 9.3, 2.8 Hz, 1H), 3.67 – 3.54 (m, 2H), 3.10 (s, 6H), 1.25 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H).

**<sup>13</sup>C RMN** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 180.26, 158.52, 154.77, 150.62, 138.91, 132.93, 116.57, 116.09, 108.49, 102.36, 45.44, 41.30, 14.49.

**HRMS (EI):** *m/z* calculada para C<sub>16</sub>H<sub>21</sub>N<sub>6</sub>S [M+H]<sup>+</sup>: 329.1470 [M+H]<sup>+</sup> encontrada: 329.1475

**Capítulo 4. Derivados de diarilmetanol y triarilmetanol (carbinoles) como dosímetros químicos para el reconocimiento de simulantes de agentes de guerra química.**

## Capítulo 4. Derivados de diarilmetanol y triarilmetanol (carbinoles) como dosímetros químicos para el reconocimiento de simulantes de agentes de guerra química.

### 4.1 Introducción.

Las sondas colorimétricas descritas en los **Capítulos 2 y 3** presentan una respuesta cromogénica en presencia de los simulantes de gases nerviosos que está basada en el carácter electrofílico del átomo de fósforo de estos compuestos. Así, cuando un nucleófilo adecuado reacciona con este átomo de fósforo se produce una detección óptica mediante una desaparición (comportamiento ON-OFF debido a un desplazamiento hipsocrómico) o un cambio (desplazamiento batocrómico) de color. En este capítulo se describe la preparación y el empleo, como sensores de simulantes de gases nerviosos, de una nueva familia de reactivos colorimétricos de tipo di- o triarilmetanol (carbinoles) que dan lugar a sistemas OFF-ON en los que la detección visual se basa en la aparición de un producto coloreado a partir de un producto incoloro. Como se mencionó en la introducción del **Capítulo 3** el ojo humano tiene una mayor sensibilidad, es decir, detecta más fácilmente la aparición de un color que la desaparición o el cambio de éste. Por ello decidimos diseñar, sintetizar y evaluar una pequeña familia de productos que permitieran la detección de agentes de guerra química mediante la aparición de color y así contribuir, en la medida de lo posible, al desarrollo de reactivos que finalmente puedan ser incluidos en sistemas de detección fiables y sensibles para el reconocimiento de este tipo de sustancias.

Esta nueva familia de dosímetros químicos, basados en la agrupación di- y triarilmetanol, es capaz de reaccionar con los simulantes de agentes de guerra química y generar los correspondientes carbocationes. Los compuestos basados en el trifenilmetano constituyen una clase de colorantes orgánicos muy importante y, a pesar de que se encuentran entre los primeros preparados sintéticamente, se siguen describiendo continuamente nuevas aplicaciones. Así, además de sus usos en bioquímica<sup>89</sup> también se han

---

<sup>89</sup> (a) C. Xi, Z. Liu, L. Kong, X. Hu, S. Liu, *Anal. Chim. Acta*, **2008**, 613 (1), 83. (b) Y. Eldem, I. Özer, *Dyes Pigments*, **2004**, 60, 83. (c) B. P. Cho, T. Yang, L. R. Blankenship, J. D. Moody, M. Churchwell, F. A. Beland, S. J. Culp, *Chem. Res. Toxicol.*, **2003**, 16, 285.

descrito aplicaciones analíticas en el reconocimiento de aniones,<sup>90</sup> cationes<sup>91</sup> y moléculas neutras.<sup>92</sup> Una característica importante de este tipo de compuestos es el cambio de color dependiendo del equilibrio de hidratación.<sup>93</sup> Este equilibrio ha sido utilizado en el diseño de indicadores de pH pero también puede ser aplicado en el diseño de sondas selectivas para otras especies.

#### 4.2 Diseño de sondas colorimétricas.

Está descrito en la literatura que tanto los diarilmetanoles como los triarilmetanoles reaccionan con ácidos minerales y sufren una reacción de deshidratación para generar carbocationes.<sup>94</sup> Esta reacción, al generar un orbital p vacío con carácter electrón-aceptor, permite que se establezca conjugación entre los anillos aromáticos dando lugar a la aparición de una banda de transferencia de carga que, normalmente está dentro del rango visible del espectro y por ello las especies que se forman presentan color. En base a esta reactividad se pretende establecer un nuevo protocolo de reconocimiento colorimétrico para los simulantes de agentes nerviosos empleados y por consiguiente para los propios agentes neurotóxicos. Como se puede ver en el esquema de la **Figura 4.1** el mecanismo implicado empleando diaril- o triarilmetanoles (estructura **I**) consta de dos etapas, fosforilación del alcohol secundario o terciario del colorante (estructura **II**) seguida de una pérdida del derivado del ácido fosfórico correspondiente para generar un carbocatión coloreado (estructura **III**). La generación de la carga positiva en la estructura **III** induce un proceso de transferencia de carga que es el responsable de la aparición de color. El desplazamiento batocrómico inducido es mayor o menor dependiendo de los grupos sustituyentes presentes en la estructura.

---

<sup>90</sup> (a) E. I. Soborover, V. A. Tverskoi, S. V. Tokarev, *J. Anal. Chem.*, **2005**, 60, 274. (b) S. Motomizu, S. Fujiwara, K. Toei, *Anal. Chim. Acta*, **1981**, 128, 185.

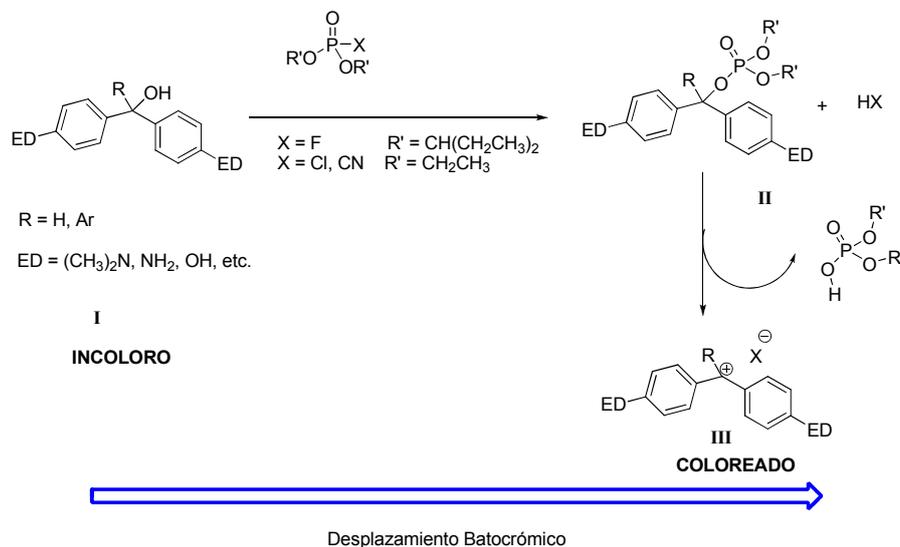
<sup>91</sup> (a) R. M. Uda, M. Oue, K. Kimura, *J. Supramol. Chem.*, **2002**, 2, 311. (b) K. Kimura, R. Mizutani, M. Yocoyama, R. Arakawa, Y. Sakurai, *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, 122, 5448.

<sup>92</sup> F. L. Dickert, M. Vonend, H. Kimmel, G. Mages, *J. Anal. Chem.*, **1989**, 333, 615.

<sup>93</sup> Por ejemplo ver G. Bengtesson, *Acta Chem. Scand.* **1969**, 23, 455 y sus referencias.

<sup>94</sup> S. A. Gorman, J. D. Hepworth and D. Mason, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **2000**, 1889.

C. Villalonga-Barber, B. R. Steele, Veronika Kovac, M. Micha-Screttas, C. G. Screttas, *J. Organomet. Chem.*, **2006**, 961, 2785.



**Figura 4.1** Protocolo de reconocimiento colorimétrico. El grupo hidroxilo experimenta una fosforilación seguida de una eliminación para generar el correspondiente carbocatión coloreado.

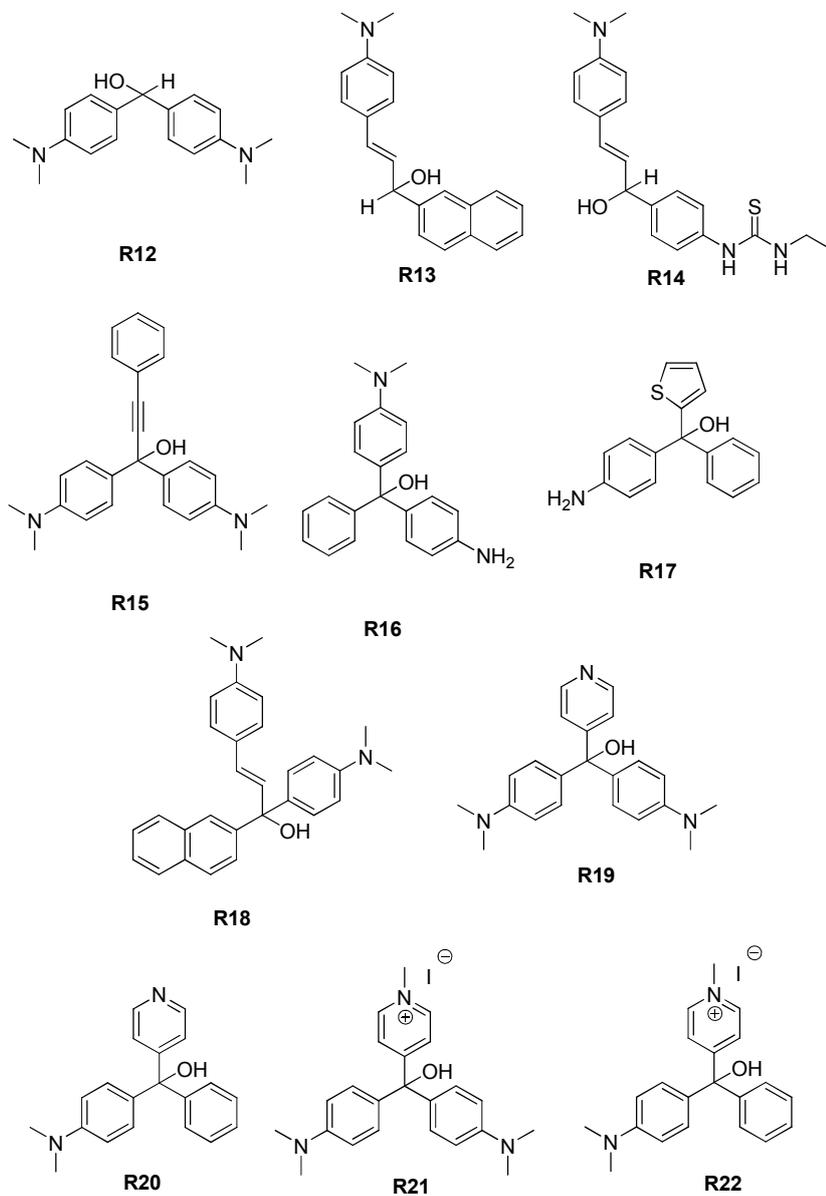
### 4.3 Síntesis, caracterización y propiedades espectroscópicas.

Teniendo en cuenta lo expuesto en la introducción se pensó en preparar una familia de diarilmetanoles y triarilmetanoles para la detección colorimétrica de gases nerviosos. Así se sintetizaron los reactivos cromogénicos **R12-R22** cuyas estructuras se muestran en la **Figura 4.2**.

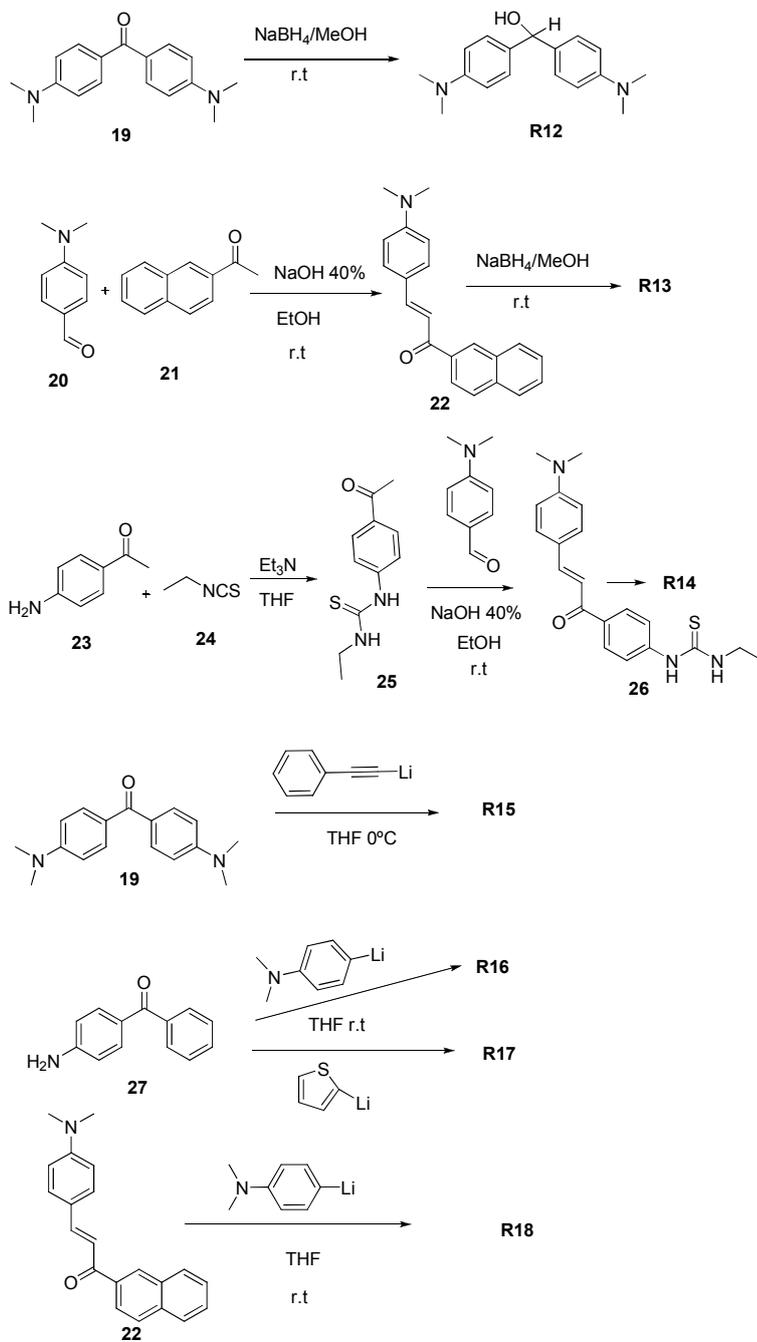
Los reactivos cromogénicos **R12-R14** se obtuvieron por reducción de las correspondientes cetonas con  $\text{NaBH}_4$  en metanol (ver **Figura 4.3**).<sup>95</sup> Para la obtención de **R12** se partió de la 4,4'-bis(dimetilamino)benzofenona (**19**) o benzofenona de Mickler, que es un producto comercial. Las cetonas de partida para la obtención de **R13** y **R14** se obtuvieron por condensación en medio básico del 4-dimetilaminobenzaldehído (**20**) con la 2-naftilacetofenona (**21**) y la 1-(4-acetilfenil)-3-etiltiourea (**25**) obtenida a partir de la 4-aminoacetofenona (**23**) e isotiocianato de etilo (**24**).<sup>96</sup>

<sup>95</sup> B. C. Ranu, S. Samanta, *Tetrahedron*, 59, **2003**, 7901. S. Ducki, *Bioorg. Med. Chem.*, **2009**, 17, 7968.

<sup>96</sup> S. Akiyama, S. Nakatsuji, K. Nakashima, S. Yamasaki, *Dyes and Pigments*, 9, **1988**, 459.

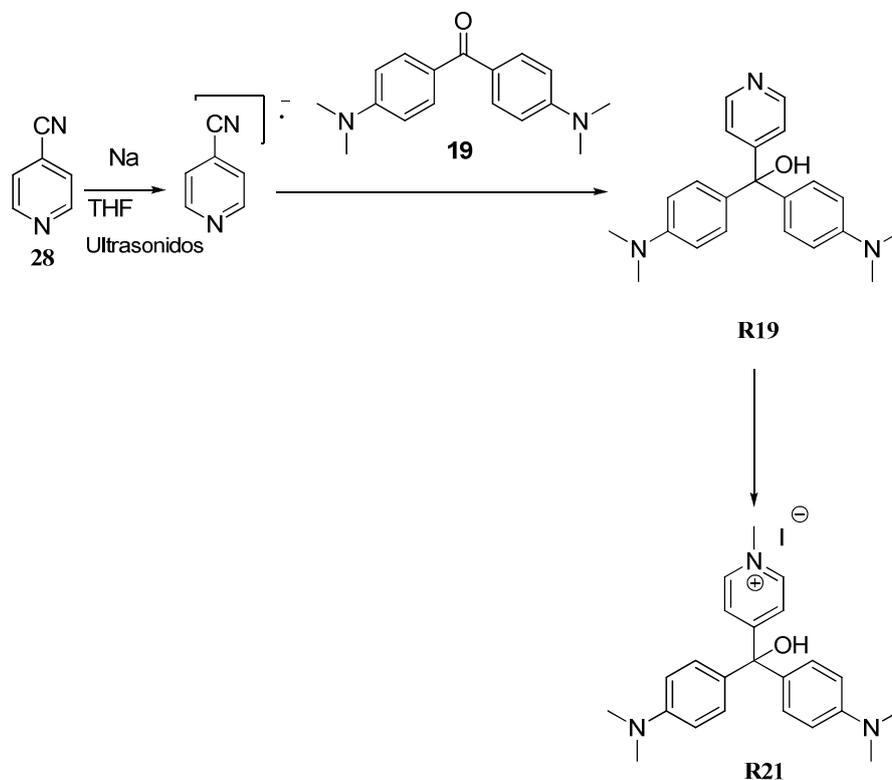


**Figura 4.2** Estructura química de los reactivos cromogénicos **R12-R22**.



**Figura 4.3** Rutas sintéticas seguidas para la obtención de **R12-R18**.

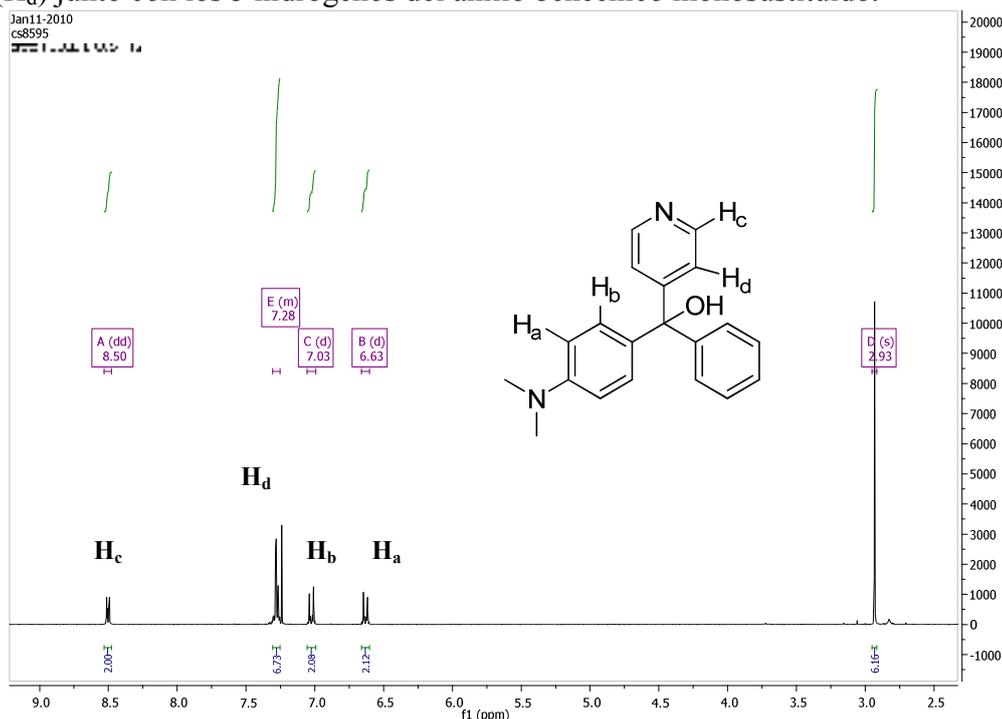
Los reactivos cromogénicos **R15-R18** se obtuvieron por adición del correspondiente derivado organolítico al carbonilo de las cetonas sustituidas como se muestra en el esquema de la **Figura 4.3**. Por su parte, los cromoreactivos **R19** y **R20** se obtuvieron por condensación del radical-anión, generado con sodio metálico, de la 4-cianopiridina (**28**) con 4,4'-bis(dimetilamino)benzofenona (**19**) y con 4-dimetilaminobenzofenona respectivamente. Sus derivados **R21** y **R22** se obtuvieron por metilación del átomo de nitrógeno de la piridina con yoduro de metilo (ver **Figura 4.4**).



**Figura 4.4** Ruta sintética seguida para la obtención de **R19** y **R21**.

Todos los reactivos cromogénicos sintetizados fueron caracterizados por técnicas de resonancia magnética nuclear de  $^1H$  y  $^{13}C$ . Además se realizaron análisis de masas de alta resolución (HRMS) de los productos finales antes de su evaluación como posibles sondas colorimétricas para los simulantes de agentes de guerra química empleados. A continuación se explica con detalle y a título indicativo la caracterización por resonancia magnética nuclear del reactivo cromogénico **R20** que permite confirmar la estructura química de la sonda colorimétrica sintetizada.

El espectro de  $^1\text{H}$ -RMN en  $\text{CDCl}_3$  del reactivo cromogénico **R20** se muestra en la **Figura 4.5**. La señal de los metilos situados sobre el átomo de nitrógeno de la anilina aparece a 2.93 ppm (singlete, seis hidrógenos). Las señales aromáticas aparecen todas situadas en la zona de campos bajos. Así se pueden apreciar las señales de los átomos de hidrógeno situados en orto al grupo dimetilamino ( $\text{H}_a$ ) a 6.63 ppm (doblete, dos hidrógenos,  $J=9.0$  Hz); los dos hidrógenos del anillo de dimetilamnilina más próximos al carbono que soporta al grupo hidroxilo ( $\text{H}_b$ ) aparecen como un doblete a 7.03 ppm con una constante de acoplamiento con sus hidrógenos vecinales de 9.0 Hz típica en estos compuestos. Los hidrógenos del anillo de piridina aparecen a 8.50 ppm (doble doblete, dos hidrógenos,  $J = 4.5, 1.6$  Hz) los que están más próximos al nitrógeno de la piridina ( $\text{H}_c$ ) y a 7.28 ppm los vecinales a estos ( $\text{H}_d$ ) junto con los 5 hidrógenos del anillo bencénico monosustituido.



**Figura 4.5** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del reactivo cromogénico **R20** ( $\text{CDCl}_3$ ).

En la **Figura 4.6** se observa el espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN del reactivo cromogénico **R20** en  $\text{CDCl}_3$ . Para realizar todas las asignaciones que se mencionan a continuación se emplearon técnicas de RMN de correlación  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a un enlace (HSQC) y a varios enlaces (HMBC). A 44.77 ppm tenemos la señal de los metilos situados sobre el átomo de nitrógeno de la anilina (carbonos 9 y 10). El carbono que soporta al grupo hidroxilo aparece a 77.61 ppm ( $\text{C}7$ ) y como se ve en la ampliación de esta región en la figura

interior está ocultada por la señal del cloroformo. En la parte aromática se observan las señales de tres de los cuatro carbonos cuaternarios aromáticos que existen en la molécula. La señal que aparece a 156.37 ppm se asigna al carbono que soporta el grupo dimetilamino (C2). A 150.39 ppm aparece la señal del carbono del anillo de benceno enlazado al carbono funcionalizado con el grupo hidroxilo (C11). A 146.38 ppm aparece la señal del carbono del anillo de piridina enlazado al carbinol (C12). El carbono cuaternario restante, es decir, el carbono del anillo de anilina enlazado al carbinol, aparece a 133.70 ppm (C5). Las señales de los CH aromáticos se asignaron de la siguiente manera: existen dos pares de CH en el anillo de la dimetilanimilina que son magnéticamente equivalentes y corresponden a las señales situadas a 112.16 ppm, los CH más próximos al átomo de nitrógeno de la anilina (C1 y C3), y a 128.46 ppm los CH próximos al carbinol (C4 y C6). Los CH del anillo de piridina muestran sus señales de carbono a 123.06 ppm, los más próximos al grupo carbinol (C18 y C22), y a 149.79 ppm los CH mas cercanos al átomo de nitrógeno de la piridina (C19 y C21). Las señales de los átomos de carbono del anillo aromático monosustituido aparecen centradas a 127.88 ppm el que está en posición *para* al carbono cuaternario enlazado al carbono que contiene al grupo hidroxilo (C15), a 128.11 ppm los situados en *orto* a dicho carbono cuaternario (C14 y C16) y a 129.21 ppm el otro par de CH restantes (C13 y C17).

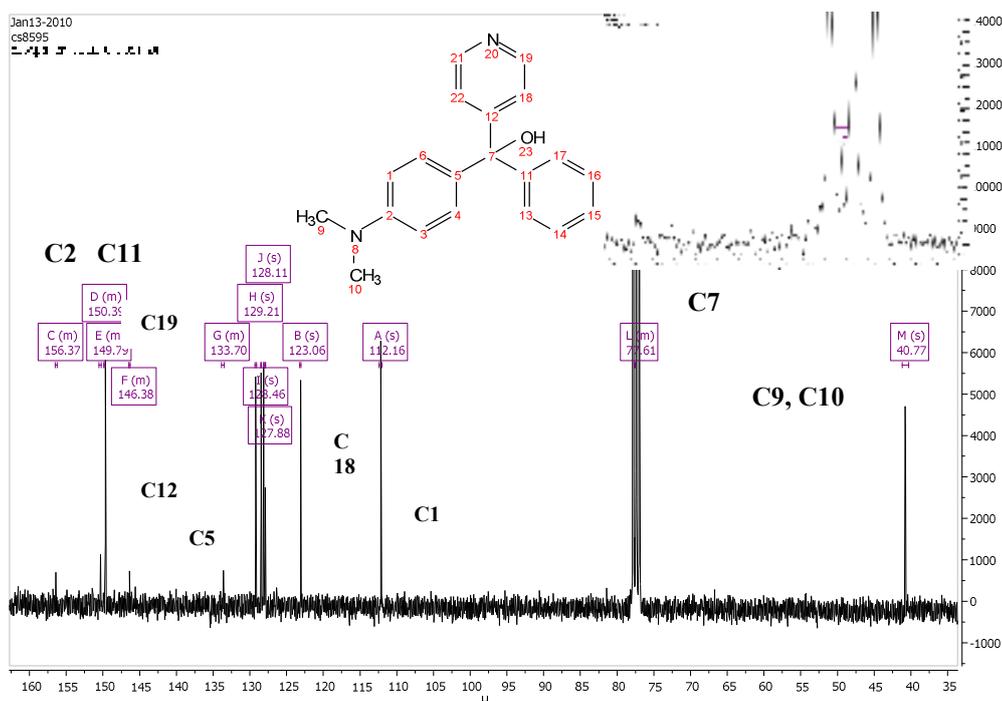


Figura 4.6 Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN del cromoreactivo R20 ( $\text{CDCl}_3$ ).

**Tabla 4.1.** Absorciones UV de los ligandos **R12-R22** ( $C = 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) en acetonitrilo.

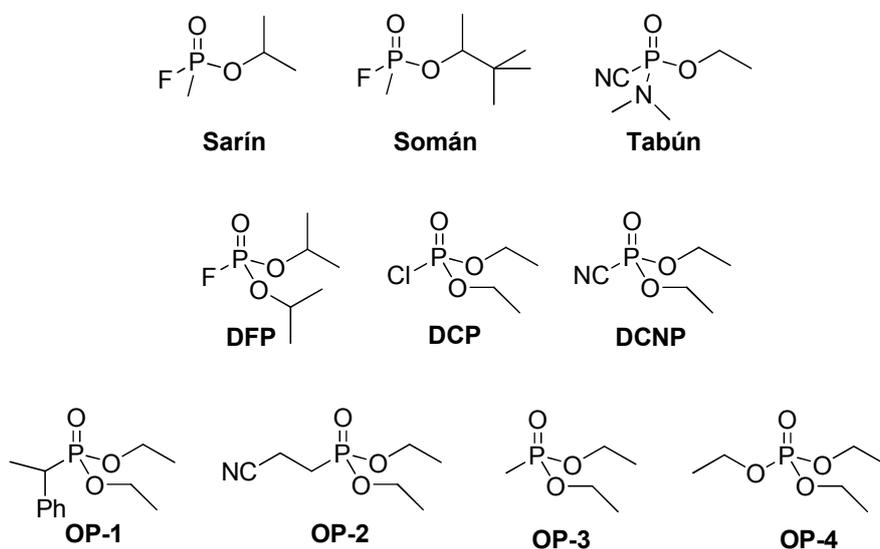
	$\lambda(\text{nm})$ (carbinol)	$\lambda(\text{nm})$ (catión)
<b>R12</b>	270	605
<b>R13</b>	284	510
<b>R14</b>	300	548
<b>R15</b>	266	689
<b>R16</b>	261	592
<b>R17</b>	272	500
<b>R18</b>	274	715
<b>R19</b>	252	640
<b>R20</b>	264	431
<b>R21</b>	217	----
<b>R22</b>	212	----

Las propiedades espectroscópicas UV-Vis de los reactivos cromogénicos **R12-R22** y de los cationes que se forman por reacción con los simulantes de agentes nerviosos y/o por deshidratación con ácidos minerales se muestran en la **Tabla 4.1**. Estos reactivos colorimétricos presentan bandas de absorción intensas ( $\log \epsilon > 4$ ) en la región ultravioleta del espectro electromagnético entre 212 y 300 nm y por ello sus disoluciones son incoloras. Los carbocationes que se forman al desfosfatar y/o deshidratar presentan intensas bandas de absorción en la región visible del espectro. Estas bandas tienen carácter de transferencia de carga debido a la presencia de al menos un grupo dimetilnilina con carácter electrón-dador y un carbono  $sp^2$  cargado positivamente con capacidad electrón-aceptora. La influencia del carácter electrónico de los sustituyentes en el sistema conjugado se hace patente al comparar varios receptores entre sí. Así, si comparamos los receptores **R20** y **R21** podemos apreciar que se produce un desplazamiento batocrómico de la banda del carbocatión de 209 nm al sustituir un anillo de benceno en **R20** por una *N, N*-dimetilnilina en **R19**. El mismo efecto se observa si sustituimos un átomo de hidrógeno por un grupo *N, N*-dimetilnilina. Así se aprecia un desplazamiento hacia el rojo de 205 nm si comparamos **R13** con **R18**. Si comparamos **R17** y **R16** podemos observar que la substitución de un tiofeno, con menor capacidad electrón-

dadora aún siendo un sistema  $\pi$ -excedente, por una *N,N*-dimetilanilina induce un desplazamiento de 92 nm. Cabe destacar que la presencia de un grupo tan electrón-aceptor como es el anillo de piridinio, que posee una carga positiva sobre el átomo de nitrógeno, como es el caso de **R21** y **R22** inhibe la formación del correspondiente carbocatión coloreado, incluso utilizando ácidos fuertes. Los carbocationes de **R14**, **R19** y **R20** que no se pudieron obtener por reacción con los simulantes de agentes nerviosos se obtuvieron por deshidratación con ácido perclórico.

#### 4.4 Reactividad con simulantes de agentes nerviosos.

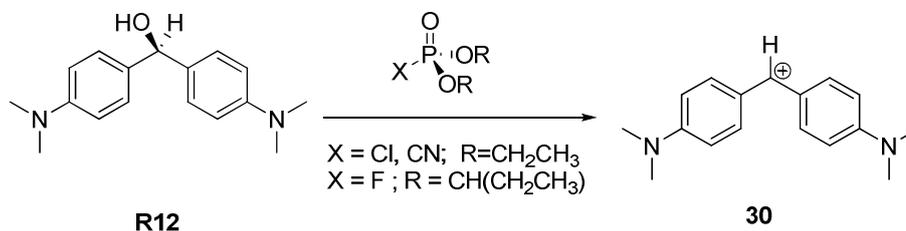
Como ya se mencionó en los capítulos anteriores debido a la alta toxicidad de los agentes nerviosos Sarín, Somán y Tabún, los compuestos relacionados DCP, DFP y DCNP que se muestran en la **Figura 4.7** se utilizan como modelos o simulantes para el diseño de indicadores y sistemas de detección, debido a su estructura química similar, idéntica reactividad y a la menor toxicidad que presentan por ser menos persistentes.



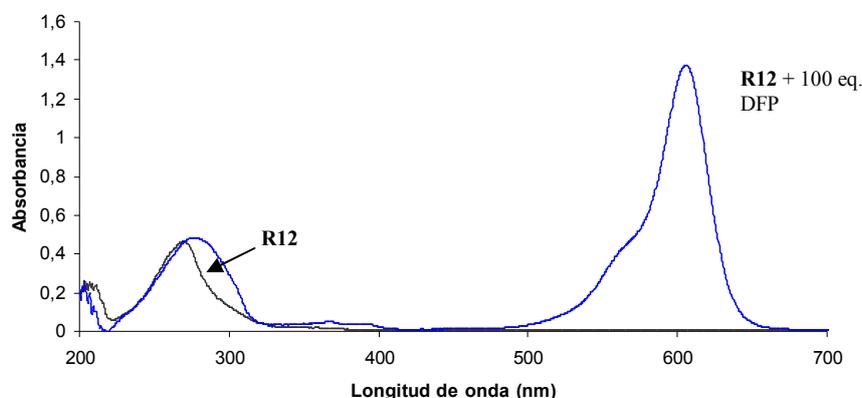
**Figura 4.7** Estructura química de diferentes compuestos organofosforados.

En primer lugar se realizó el estudio del comportamiento del receptor cromogénico **R12** en acetonitrilo en presencia de simulantes. Así, las disoluciones en acetonitrilo del receptor **R12** ( $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) presentan una banda de absorción intensa centrada a 270 nm (la disolución

es incolora). Al adicionar 100 equivalentes de DCP, DFP o DCNP se observó la aparición de una nueva banda centrada a 605 nm, que provoca un cambio en el color de las disoluciones de incoloro a azul intenso. Esta banda a 605 nm se puede asignar a la formación del carbocatión correspondiente (**30**) mediante un proceso de fosforilación del hidroxilo de **R12** y posterior eliminación (ver **Figura 4.8**).



**Figura 4.8** Reacción de formación del carbocatión **30** a partir de **R12** con los simulantes empleados DCP, DCNP y DFP.

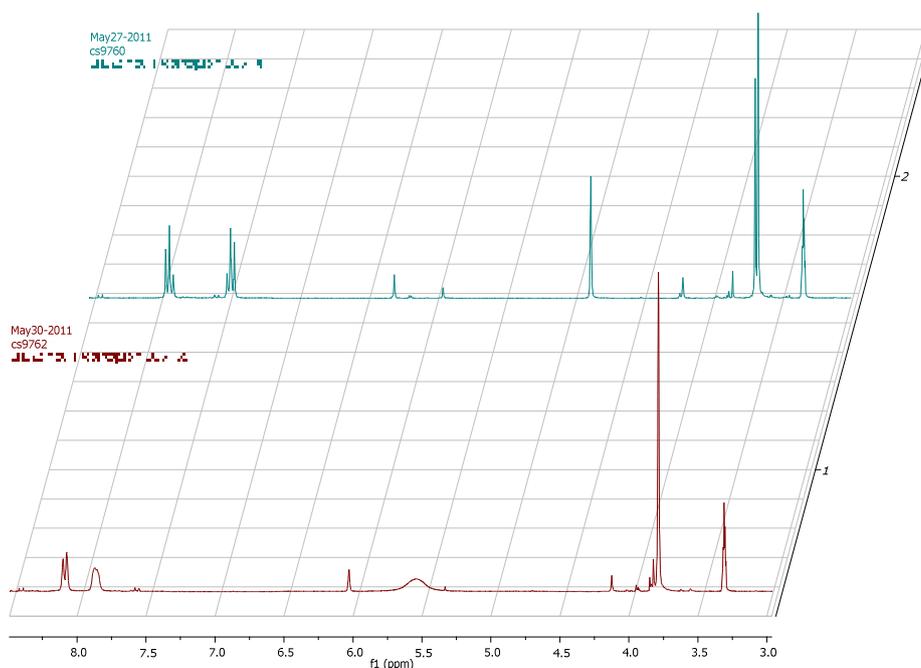


**Figura 4.9** Espectro de absorción UV-Vis de: receptor cromogénico **R12** (acetonitrilo,  $1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) y **R12** con 100 equivalentes de DFP.

En la **Figura 4.9** se muestra el espectro UV-Vis del reactivo cromogénico **R12** y del carbocatión coloreado (**30**) que se forma tras la reacción de detección del simulante DFP, medido 1 minuto después de la adición de los 100 equivalentes. Los espectros UV-Visible obtenidos al adicionar DCP y DCNP a las disoluciones de **R12** después de 1 minuto muestran la aparición de la misma banda centrada a 605 nm que se asigna a la formación de **30**. Sin embargo, la intensidad de la banda a 605 nm es distinta debido a que la velocidad de reacción de **R12** con los diferentes simulantes es diferente en cada caso (ver apartado 4.5 de este capítulo). Este

hecho implica que al cabo de 1 minuto (tiempo de medida) la concentración del catión en la disolución depende del simulante empleado.

Para confirmar el mecanismo implicado en la respuesta cromogénica observada se obtuvo el carbocatión **30** a través de una ruta sintética distinta. Se disolvió una pequeña cantidad (10 mg) del producto **R12** en MeOD (0.75 mL) y se añadió ácido trifluoroacético (3  $\mu$ L), obteniéndose y caracterizándose el carbocatión generado (**30**) por RMN. La dilución en acetonitrilo a una concentración  $1 \times 10^{-5}$  M de la disolución obtenida mostró el mismo espectro UV-Vis que el obtenido al adicionar los tres simulantes a disoluciones de **R12** en acetonitrilo.



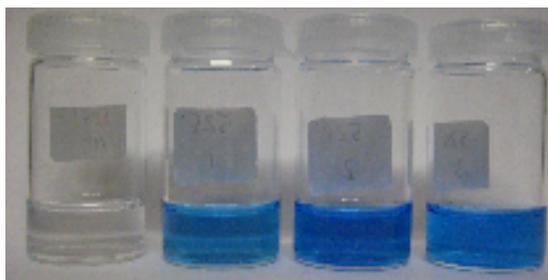
**Figura 4.10** Espectros de  $^1\text{H}$ -RMN del cromoreactivo **R12** (arriba) y del carbocatión **30** (debajo) en MeOD.

Como se puede observar en la **Figura 4.10** la formación del carbocatión implica un desapantallamiento de las señales de los hidrógenos aromáticos y de los metilos situados sobre los N anilínicos. En el espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN la señal del C metanólico situada a 75.78 ppm del cromoreactivo **R12** desaparece al deshidratarse y aparece una nueva señal aromática situada a 138.8 ppm en el espectro del carbocatión **30**.

Posteriormente se realizaron estudios de selectividad en presencia de los derivados organofosforados OP1-OP4 (ver **Figura 4.7**). Así, al adicionar 100 equivalentes de estos derivados a disoluciones del receptor **R12** en

acetonitrilo ( $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) no se observaron cambios significativos en el espectro UV-Visible. Esta ausencia de respuesta cromogénica es consecuencia de que los organofosforados OP1-OP4 no tienen buenos grupos salientes en sus estructuras y, por tanto, no pueden fosforilar el grupo hidroxilo del receptor **R12**.

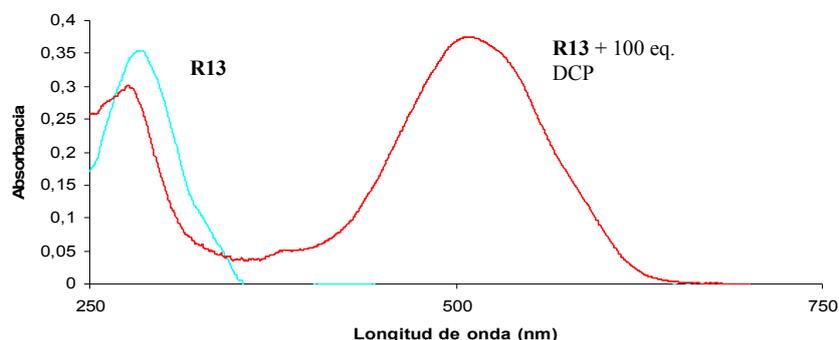
Después de estudiar la respuesta cromogénica del receptor **R12** en presencia de compuestos organofosforados en acetonitrilo, se decidió emplear mezclas acuosas para estudiar su comportamiento de cara a una posible aplicación para determinaciones en muestras reales. Estos estudios en mezclas acuosas nos servirán también para confirmar que la respuesta cromogénica observada en acetonitrilo es debida exclusivamente a la fosforilación del grupo hidroxilo con la subsiguiente eliminación y no a la reacción de deshidratación del carbinol provocada por los posibles productos de hidrólisis de los simulantes. Así se prepararon disoluciones ( $1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) de **R12** en acetonitrilo-agua 25:75 v/v, tamponadas con MES ( $0.1 \text{ mol dm}^{-3}$ , pH 5.6). Estas disoluciones presentaron una banda de absorción en la zona UV centrada a 265 nm. Al añadir 100 equivalentes de DCP, DFP y DCNP se observó la aparición de una banda centrada a 607 nm y un cambio de color de incoloro a azul (ver **Figura 4.11**). De nuevo, el cambio de color fue asignado a la formación de un carbocatión después del proceso de fosforilación del grupo hidroxilo de **R12** con posterior eliminación.



**Figura 4.11** Fotografía de **R12** ( $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$  en agua/acetonitrilo 3:1 v/v con MES  $0.1 \text{ mol dm}^{-3}$  a pH 5.6) sólo y en presencia de 200 equivalentes de DCP, DFP y DCNP (de izquierda a derecha).

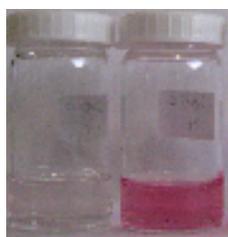
Los resultados obtenidos en disolución acuosa demostraron que la generación del catión no era debida simplemente a una reacción ácido-base sino a un proceso de fosforilación y posterior eliminación. Aunque estos resultados eran de interés, el trabajo en medio acuoso presentó ciertas limitaciones. En primer lugar, los límites de detección eran más elevados que en acetonitrilo (por ejemplo para el DCNP en acetonitrilo el límite de detección con **R12** es de 165 ppm y en medio acuoso es de 300 ppm) y en segundo lugar los tiempos de respuesta eran bastante más largos (pocos

segundos en acetonitrilo y algunos minutos en mezclas agua-acetonitrilo). Este hecho nos decidió a proseguir con los experimentos sólo en acetonitrilo, ya que uno de los requisitos fundamentales de un buen sistema de detección es que el tiempo de respuesta sea corto.



**Figura 4.12** Espectro de absorción UV-Vis de: receptor cromogénico **R13** (acetonitrilo,  $1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) y **R13** con 100 equivalentes de DCP.

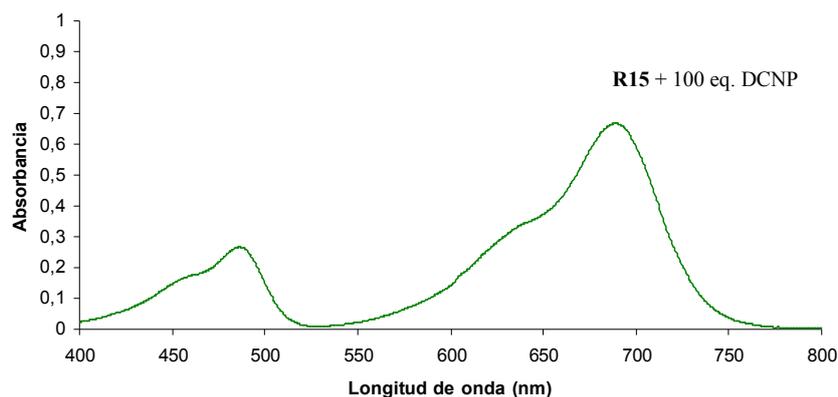
El reactivo cromogénico **R13** presentó un comportamiento similar al observado con **R12**. Así, las disoluciones en acetonitrilo ( $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) de **R13** son incoloras debido a que este compuesto presenta una banda de absorción intensa centrada a 284 nm. Como se puede ver en la **Figura 4.12**, al adicionar 100 equivalentes del simulante DCP apareció una banda centrada a 510 nm que indujo la aparición de color rosa en las disoluciones debido a la formación del carbocatión (ver **Figura 4.13**). Los espectros UV-Vis obtenidos con DCP y DCNP son similares aunque sus cinéticas, como se mencionó para **R12** y se explicará en el apartado 4.5, son distintas.



**Figura 4.13** Fotografía de **R13** ( $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$  en acetonitrilo) sólo (izquierda) y en presencia de 100 equivalentes de DCP (derecha).

El reactivo cromogénico **R14**, que posee una etiltiourea, se diseñó para que actuara como doble sonda. **R14** posee un grupo coordinante tiourea enlazado covalentemente con la estructura aromática del reactivo. Esta bien establecido en el campo de la química de los receptores para aniones que las tioureas tienen capacidad de coordinar especies cargadas negativamente por

formación de enlaces de hidrógeno con sus NH.<sup>97</sup> También se ha descrito que aniones muy básicos (como el fluoruro y el cianuro) son capaces de desprotonar uno de los NH de una tiourea dando lugar a la aparición de bandas de transferencia de carga con importantes cambios de color asociados.<sup>98</sup> Así, se pensó que al fosforilar el hidroxilo de **R14** con DFP o DCNP los aniones liberados (fluoruro y cianuro) podrían inducir la desprotonación de uno de los NH de la tiourea dando lugar a un cambio de color distinto al observado tras la formación del carbocatión. Así podría diferenciarse entre los tres simulantes de gases nerviosos empleados. Sin embargo al añadir los distintos simulantes (100 equivalentes) sobre disoluciones del reactivo cromogénico **R14** en acetonitrilo ( $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) no se observó la formación de ninguna banda de transferencia de carga en la zona visible ni, por lo tanto, cambio de color en un tiempo razonable para que el producto pudiera ser utilizado como sonda colorimétrica. Sí se observó una ligera coloración rojiza 12 horas después de realizar la adición de los simulantes. La ralentización de la formación del carbocatión se atribuyó al efecto inductivo electrón-atractor de la tiourea, que no favorece la eliminación del fosfato correspondiente. El carbocatión de **R14** se obtuvo exclusivamente tras tratar el receptor con ácido perclórico dando lugar a un sólido de color rojo. Ahora bien, este producto, al ser coloreado y contener una tiourea, podría ser un buen sensor colorimétrico para aniones por lo que en la actualidad se están explorando sus posibles aplicaciones en este campo.



**Figura 4.14** Espectro de absorción UV-Vis de: **R15** con 100 equivalentes de DCNP (acetonitrilo,  $1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ).

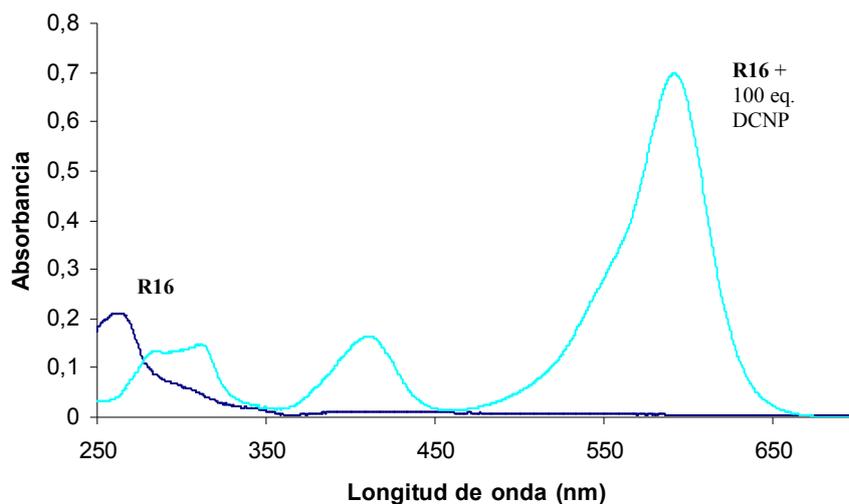
<sup>97</sup> M. E. Moragues, R. Martínez-Máñez, F. Sancenón. *Chem. Soc. Rev.*, **2011**, 40, 2593.

<sup>98</sup> J. N. Babu, V. Bhalla, M. Kumar, R. K. Puri and R. K. Mahajan, *New J. Chem.*, **2009**, 33, 675.

El reactivo cromogénico **R15** presentó un comportamiento similar al descrito para **R12**. Así, sus disoluciones en acetonitrilo ( $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) son incoloras debido a que presentan una banda de absorción intensa centrada a 266 nm. Como se puede ver en la **Figura 4.14** al adicionar 100 equivalentes de DCNP aparecieron dos bandas en el rango visible del espectro, una banda de transferencia de carga centrada a 689 nm con un hombro a 630 nm y otra banda mas pequeña situada sobre los 480 nm, que indujeron la aparición de color verde en la disolución debido a la formación del carbocatión correspondiente (ver **Figura 4.15**). Prácticamente los mismos resultados se obtuvieron al adicionar DFP y DCP a disoluciones en acetonitrilo de **R15**.



**Figura 4.15** Fotografía de **R15** ( $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$  en acetonitrilo) sólo y en presencia de 100 equivalentes de DCNP, DCP y DFP (de izquierda a derecha).



**Figura 4.16** Espectro de absorción UV-Vis de: receptor cromogénico **R16** (acetonitrilo,  $1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) y **R16** con 100 equivalentes de DCNP.

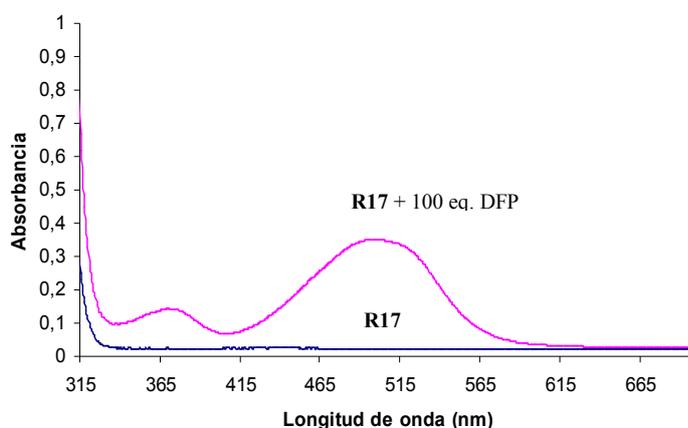
El reactivo cromogénico **R16** presentó un comportamiento similar al descrito para **R12**. Las disoluciones en acetonitrilo ( $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) son

incoloras debido a que presentan una banda de absorción centrada a 261 nm. Como se puede ver en la **Figura 4.16** al adicionar 100 equivalentes de DCNP apareció una banda de transferencia de carga centrada a 592 nm que indujo la aparición de color azul en la disolución debido a la formación del carbocatión correspondiente (ver **Figura 4.17**). De nuevo la adición de los otros dos simulantes indujo cambios de color similares debido a la aparición de la banda del carbocatión a 592 nm.

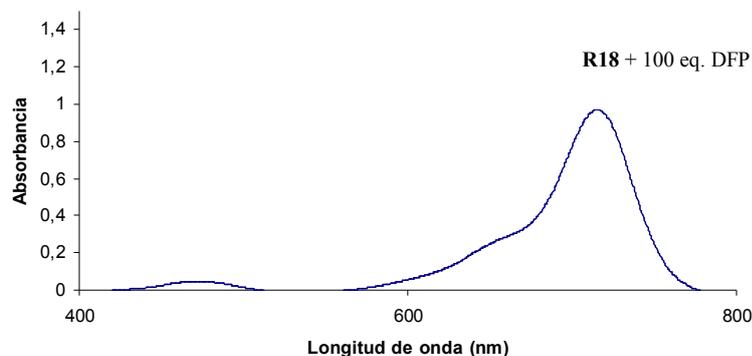


**Figura 4.17** Fotografía de **R16** ( $1.0 \times 10^{-5}$  mol  $\text{dm}^{-3}$  en acetonitrilo) sólo y en presencia de 100 equivalentes de DCNP (de izquierda a derecha).

Como se puede ver en los espectros UV-Vis que se muestran a continuación, en la **Figura 4.18** y en la **Figura 4.19**, los reactivos cromogénicos **R17** y **R18** también dieron una respuesta cromogénica en presencia de los simulantes de agentes neurotóxicos empleados. El mecanismo es idéntico al observado en los anteriores reactivos cromogénicos.



**Figura 4.18** Espectro de absorción UV-Vis de: receptor cromogénico **R17** (acetonitrilo,  $1 \times 10^{-5}$  mol  $\text{dm}^{-3}$ ) y **R17** con 100 equivalentes de DFP.



**Figura 4.19** Espectro de absorción UV-Vis de receptor cromogénico **R18** (acetonitrilo,  $1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) con 100 equivalentes de DFP.

Como ya se mencionó al final del apartado 4.3 los reactivos cromogénicos **R19-R22** no son capaces de dar cambios de color en presencia de los simulantes empleados. El hecho de que **R19** y **R20** no mostraran una respuesta cromogénica con DCP, DFP y DCNP a simple vista y se observara en el espectro UV-Visible una nueva banda a 403 nm nos sugirió que además de la fosforilación del alcohol se estaba produciendo la reacción de fosforilación del anillo de piridina y que la formación de una carga positiva sobre el átomo de nitrógeno de piridina al fosforilarse inhibía la reacción de eliminación del fosfato para dar el carbocatión correspondiente. Para comprobar que la presencia de una carga positiva sobre el anillo de piridina inhibía la reacción de eliminación y, por tanto, la formación del carbocatión, se pensó en cuaternizar la piridina mediante una metilación del átomo de nitrógeno. Para ello se prepararon los receptores **R21** y **R22**. El grupo hidroxilo de **R21** y **R22** sí que se fosforila en presencia de los simulantes de agentes nerviosos, pero los productos de fosforilación no dieron lugar a la reacción de eliminación del fosfato correspondiente. Así no se generaba ningún tipo de carbocatión y, como consecuencia, no se producía ninguna respuesta cromogénica. Ni siquiera añadiendo un ácido fuerte se pudo inducir la reacción de deshidratación de ambos reactivos. Estos hechos nos permiten concluir que la presencia de un grupo electrón-atractor moderado como es la feniletiltiourea en **R14**, inhibe la reacción de eliminación del producto que se forma al reaccionar el grupo hidroxilo con los simulantes y, por tanto, la formación del carbocatión.<sup>99</sup> Sin embargo, se puede generar el carbocatión de **R14** adicionando un ácido fuerte como el ácido perclórico. Ahora bien, la presencia de un grupo

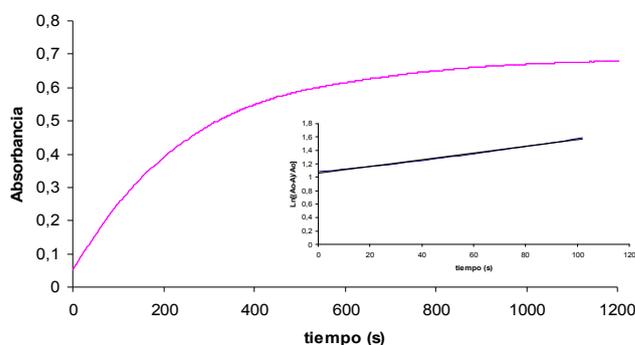
<sup>99</sup> C. Villalonga-Barber, B. R. Steele, V. Kovac, M. Micha-Screttas, C. G. Screttas, *J. Organomet. Chem.*, **2006**, 2785. K. Kimura, R. Mizutani, M. Yokoyama, R. Arakawa, and Y. Sakurai, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 5448.

electrón-atractor más fuerte, como es el anillo de piridinio, inhibe incluso la formación del carbocatión incluso cuando se utilizan ácidos fuertes.<sup>100</sup>

#### 4.5 Estudios cinéticos y límites de detección.

Aunque la respuesta cromogénica observada con los receptores **R12**, **R13**, **R15-R18**, como se mostró en el esquema de la **Figura 4.1**, está basada en dos reacciones consecutivas: (i) una fosforilación de un hidroxilo alifático y (ii) una posterior eliminación que da lugar a la formación de un carbocatión, se estudió el proceso global bajo condiciones de una cinética de pseudo primer orden con un exceso de simulante. Para ello se emplearon disoluciones de los reactivos cromogénicos **R12**, **R13**, **R15-R18** en acetonitrilo ( $1 \times 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup>) a las que se adicionaron 100 equivalentes de los simulantes DFP y DCNP. Para este tipo de estudios se prescindió del empleo de DCP ya que este simulante se hidroliza con relativa facilidad y los tiempos de medida de las cinéticas, en algunos casos, eran largos (más de 20 minutos).

Siguiendo los cambios en la intensidad de absorbancia de la banda de transferencia de carga, que aparece después del proceso de dos pasos, y representando  $\ln [(A_0 - A) / A]$  frente al tiempo (donde  $A_0$  es la absorbancia final y  $A$  es la absorbancia en un momento dado) nos permitió la determinación de las constantes de velocidad ( $k$ ) y los tiempos de vida media ( $t_{1/2} = \ln 2/k$ ) para la reacción entre los simulantes de agentes nerviosos y los reactivos cromogénicos **R12**, **R13**, **R15-R18**.



**Figura 4.20** Cambios en la intensidad de la banda de absorción centrada a 592 nm después de la reacción del reactivo cromogénico **R16** con DCNP (100 equivalentes). La gráfica interior indica una cinética de primer orden.

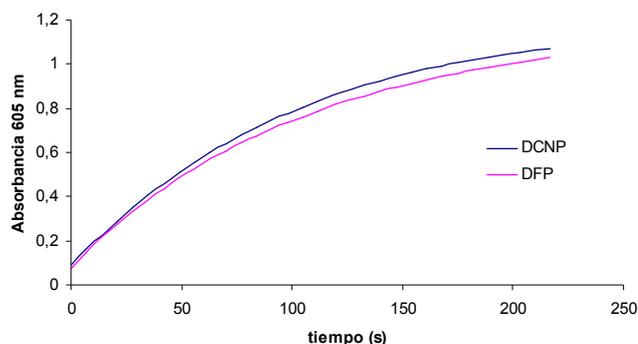
<sup>100</sup> Stephen A. Gorman, John D. Hepworth and Donald Mason, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **2000**, 1889.

La **Figura 4.20** muestra el aumento de absorbancia de la banda de transferencia de carga centrada a 592 nm para el reactivo cromogénico **R16** después de la reacción con el DCNP. Con todos los simulantes empleados, la reacción es relativamente rápida y los cambios en el espectro UV-Visible se observan después de pocos segundos. Los datos cinéticos obtenidos en el estudio de los reactivos cromogénicos **R12**, **R13**, **R15-R18** en acetonitrilo se resumen en la **Tabla 4.2**.

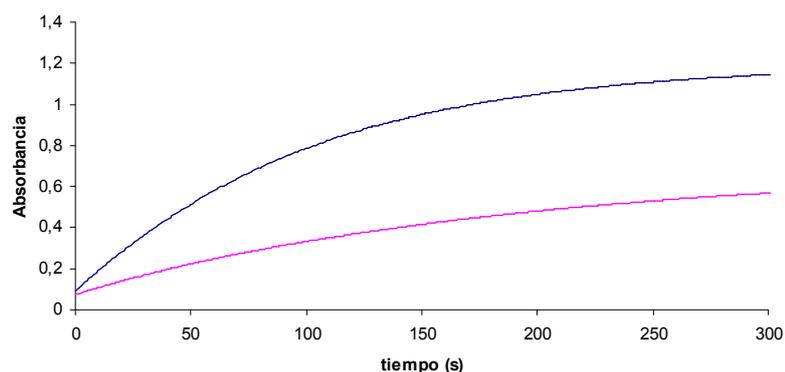
**Tabla 4.2** Datos cinéticos para los reactivos cromogénicos **R12**, **R13**, **R15-R18**.

<b>Cromoreactivo</b>	<b>Simulante</b>	<b>k (s<sup>-1</sup>)</b>	<b>t<sub>1/2</sub> (s)</b>
<b>R12</b>	<b>DFP</b>	0.0077	90.01
	<b>DCNP</b>	0.0091	76.17
<b>R13</b>	<b>DFP</b>	0.0013	533.19
	<b>DCNP</b>	0.0010	693.15
<b>R15</b>	<b>DFP</b>	0.0025	277.26
	<b>DCNP</b>	0.0026	266.60
<b>R16</b>	<b>DFP</b>	0.0229	30.260
	<b>DCNP</b>	0.0050	138.60
<b>R17</b>	<b>DFP</b>	0.0005	1386.29
	<b>DCNP</b>	0.0027	256.72
<b>R18</b>	<b>DFP</b>	0.0230	30.14
	<b>DCNP</b>	0.0144	48.14

Resultan, en principio, sorprendentes los resultados obtenidos al comparar **R12** y **R15**. En principio, parecería que las mayores velocidades deberían obtenerse para el compuesto **R15** que originaría un carbocatión terciario. Sin embargo los resultados obtenidos demuestran que **R12** reacciona tres veces más rápido que **R15** con DFP y casi 4 veces más rápido con DCNP. Este hecho puede estar relacionado con la primera etapa del proceso, es decir el ataque por parte del hidroxilo al simulante. Esta etapa se vería favorecida en **R12** debido a razones estéricas (el hidroxilo es más accesible en **R12** que en **R15**). Este hecho también estaría de acuerdo con que el DCNP reacciona más rápidamente que el DFP con **R12** ya que: 1) el DCNP tiene un menor impedimento estérico y 2) tiene un mejor grupo saliente (CN<sup>-</sup> frente a F<sup>-</sup>).



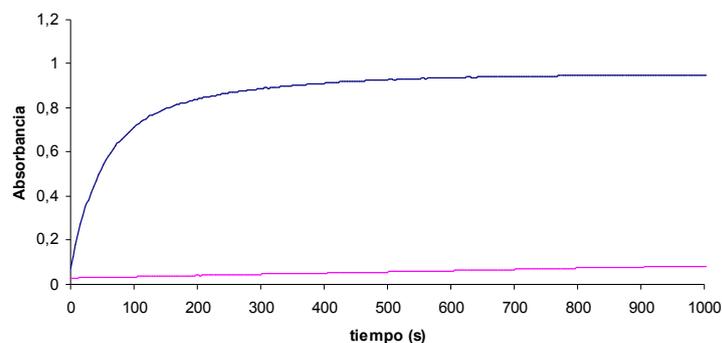
**Figura 4.21** Cambios en la intensidad de la banda de absorción centrada a 605 nm después de la reacción del reactivo cromogénico **R12** con DCNP y DFP (100 equivalentes).



**Figura 4.22** Cambios en la intensidad de la banda de absorción centrada a 605 nm después de la reacción del reactivo cromogénico **R12** (línea de color azul oscuro) y a 689 nm después de la reacción de **R15** (línea de color azul claro) con 100 equivalentes de DCNP.

Como se puede observar en la **Figura 4.22** la pendiente de la curva de la cinética de formación del carbocatión correspondiente tras la reacción con DCNP de **R12** es mucho mayor que la de **R15**, indicando una mayor velocidad de formación del correspondiente carbocatión.

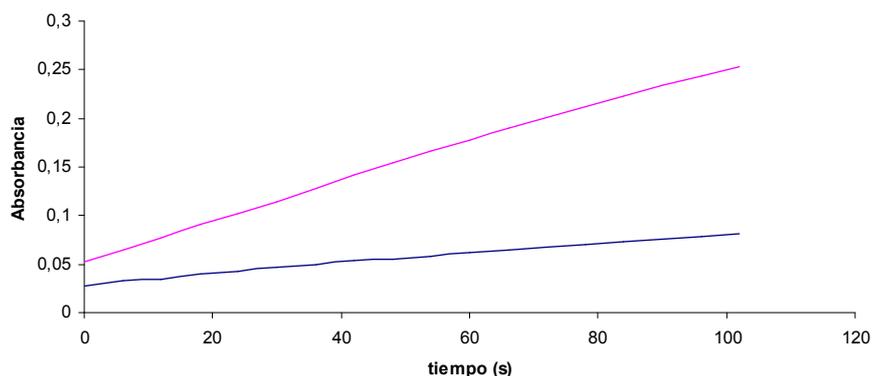
La comparación de las cinéticas de **R13** y **R18**, como se observa en la **Figura 4.23**, pone de manifiesto que tanto con DFP como con DCNP la velocidad de **R18** es más alta que la de **R13**. Este hecho está de acuerdo con la mayor facilidad de generación de un carbocatión terciario en relación a uno secundario.



**Figura 4.23** Cambios en la intensidad de la banda de absorción centrada a 715 nm después de la reacción del reactivo cromogénico **R18** (línea de color azul oscuro) y a 510 nm después de la reacción de **R13** (línea de color azul claro) con 100 equivalentes de DCNP.

Con ambos reactivos se comprueba que el DFP reacciona más rápidamente que DCNP. Este hecho podría estar relacionado con el mayor impedimento estérico de los grupos isopropilo presentes en el simulante DFP y que favorecerían la segunda etapa del proceso que implica una disminución de la compresión estérica.

Por otra parte cuando se comparan los compuestos **R16** con **R17** se observa que la sustitución de un grupo dimetilamino por un grupo tiofeno conduce a una disminución de la velocidad lo que está de acuerdo con la menor capacidad electrón-dadora del grupo tiofeno.

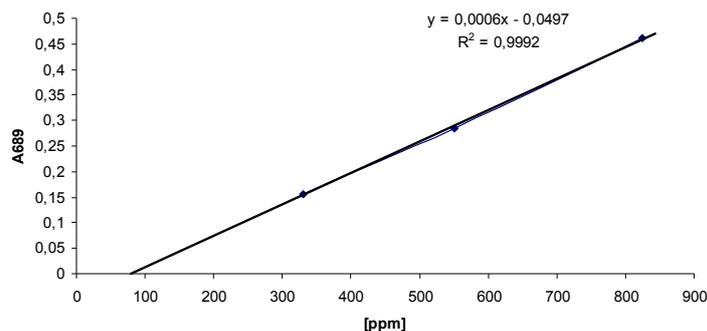


**Figura 4.24** Cambios en la intensidad de la banda de absorción centrada a 500 nm después de la reacción del reactivo cromogénico **R17** (línea de color azul oscuro) y a 592 nm después de la reacción de **R16** (línea de color azul claro) con 100 equivalentes de DCNP.

**Tabla 4.3** Límites de detección visuales para los reactivos cromogénicos **R12, R13, R15-R18**.

<b>Cromoreactivo</b>	<b>Simulante</b>	<b>Límite de detección (ppm)</b>
<b>R12</b>	<b>DFP</b>	510
	<b>DCNP</b>	165
	<b>DCP</b>	195
<b>R13</b>	<b>DFP</b>	1700
	<b>DCNP</b>	330
	<b>DCP</b>	390
<b>R15</b>	<b>DFP</b>	850
	<b>DCNP</b>	165
	<b>DCP</b>	39
<b>R16</b>	<b>DFP</b>	340
	<b>DCNP</b>	165
	<b>DCP</b>	97
<b>R17</b>	<b>DFP</b>	510
	<b>DCNP</b>	495
	<b>DCP</b>	585
<b>R18</b>	<b>DFP</b>	330
	<b>DCNP</b>	85
	<b>DCP</b>	97

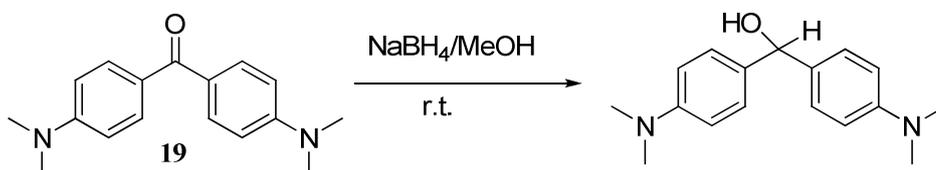
La **Tabla 4.3** incluye los límites de detección visuales medidos para los seis reactivos cromogénicos evaluados con éxito con los tres simulantes de gases nerviosos empleados. Los resultados recogidos en la **Tabla 4.3** indican que en general el DFP es el simulante que da los límites de detección más elevados. Valores que oscilan desde 1700 ppm para **R13** hasta 330 o 340 para **R18** y **R16** respectivamente. Los resultados obtenidos para DCP y DCNP son considerablemente más bajos llegando a 39 ppm para DCP con el compuesto **R15** o a 35 ppm para DCNP con el compuesto **R18**. Como ya se ha indicado anteriormente estos valores corresponden a los límites de detección a simple vista. Como es lógico estos valores claramente mejoran haciendo uso de la espectroscopía UV-Vis. Así, como se muestra en la **Figura 4.25** el límite de detección para el DCNP con el cromoreactivo **R15** estaría alrededor de 100 ppm cuando visualmente sólo se detectaban 165 ppm.



**Figura 4.25** Curva de calibrado para la detección de DCNP utilizando el cromoreactivo **R15**.

#### 4.6 Procedimientos experimentales

##### Síntesis del bis(4-(dimetilamino)fenil)metanol (**R12**)



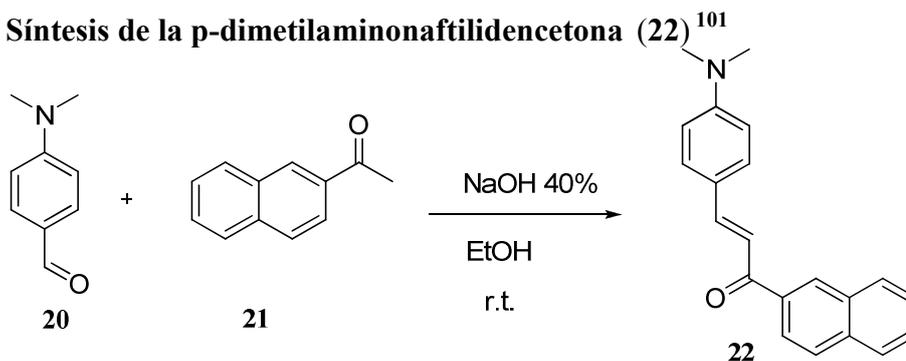
En un matraz de fondo redondo de 100 mL provisto de agitación magnética se disuelve bis(4-dimetilamino)benzofenona (**19**) (50 mg, 0.186 mmol) en 10 mL de MeOH. Se adiciona poco a poco NaBH<sub>4</sub> (70 mg, 1.86 mmol) y se agita a temperatura ambiente toda la noche. Se añaden 20 mL de agua y se realiza una extracción con diclorometano (3 × 20 mL). La fase orgánica se lava con 20 mL de salmuera, se seca con MgSO<sub>4</sub> anhidro y se concentra en el rotavapor obteniéndose 48 mg (95%) del producto en forma de sólido de color verde.

<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.26 (dd, *J* = 8.9, 0.5 Hz, 4H), 6.73 (d, *J* = 8.9 Hz, 4H), 5.74 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 2.95 (s, 12H).

<sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 150.07, 132.69, 127.61, 112.63, 75.78, 40.83.

HRMS (EI): *m/z* calculada para C<sub>17</sub>H<sub>21</sub>N<sub>2</sub><sup>+</sup> [M-OH]<sup>+</sup>: 253.1705 [M-OH]<sup>+</sup> encontrada: 253.1704

### Síntesis de la p-dimetilaminonaftilidencetona (22)<sup>101</sup>



En un matraz de fondo redondo de 100 mL provisto de agitación magnética se disuelven 4-dimetilaminobenzaldehído (**20**) (97%) (1.044 g, 6.79 mmol) y 2-acetilnaftaleno (**21**) (1.160 g, 6.79 mmol) en 10 mL de EtOH. Se añaden 2 mL de una disolución de NaOH al 40% en agua-EtOH (4:1) y se agita durante toda la noche. La mezcla de reacción se vierte sobre agua (100 mL) y precipita el producto en forma de sólido naranja. Se filtra con un embudo Büchner y se seca en estufa a 60 °C. El producto se recristaliza de MeOH, obteniéndose 1.2 g (59%) de un sólido cristalino de color naranja.

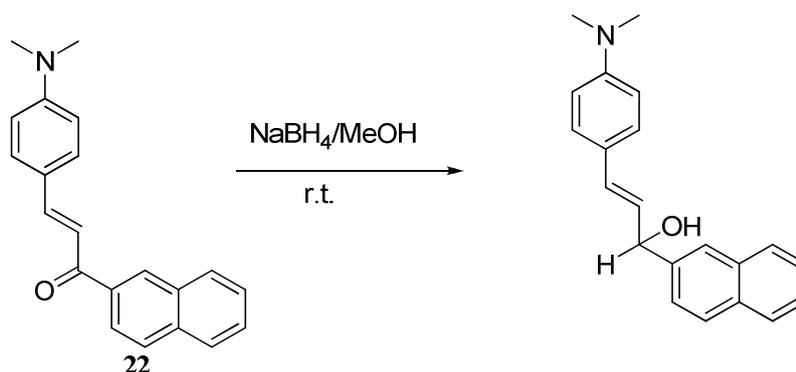
<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.54 (s, 1H), 8.12 (dd, *J* = 8.6, 1.8 Hz, 1H), 8.02 (dd, *J* = 7.5, 1.7 Hz, 1H), 7.95 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.88 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H), 7.65 – 7.56 (m, 4H), 7.52 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H), 6.74 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 3.08 (s, 6H).

<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, Acetona deuterada) δ 8.66 (d, *J* = 0.7 Hz, 1H), 8.02 (dd, *J* = 8.6, 1.8 Hz, 1H), 7.99 (dd, *J* = 7.0, 1.4 Hz, 1H), 7.89 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.86 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.67 (s, 2H), 7.58 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.50 (dq, *J* = 8.5, 6.9, 1.6 Hz, 2H), 6.67 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 2.93 (s, 6H).

<sup>13</sup>C RMN (75 MHz, Acetona deuterada) δ 188.85, 152.76, 145.36, 136.85, 135.76, 133.33, 130.87, 129.89, 129.78, 128.63, 128.48, 128.10, 126.96, 124.90, 123.08, 116.67, 112.24, 39.67.

<sup>101</sup> Akiyama S., Nakatsuji S., Nakashima K., Yamasaki S., *Dye and Pigments*, **1988**, 9, 459.

### Síntesis de (E)-3-(4-(dimetilamino)fenil-1-(naftalen-2-il)prop-2-en-1-ol (R13)



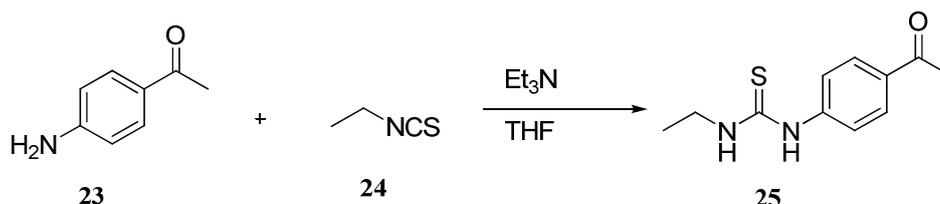
En un matraz de fondo redondo de 100 mL provisto de agitación magnética se disuelve p-dimetilaminonaftilidencetona (**22**) (50 mg, 0.166 mmol) en 10 mL de MeOH. Se adiciona poco a poco NaBH<sub>4</sub> (63 mg, 1.66 mmol) y se agita a temperatura ambiente toda la noche. Se añaden 20 mL de agua y se realiza una extracción con diclorometano (3 × 20 mL). La fase orgánica se lava con 20 mL de salmuera, se seca con MgSO<sub>4</sub> anhidro y se concentra en el rotavapor obteniéndose 47 mg (93%) del producto **R13** puro en forma de aceite oscuro.

<sup>1</sup>H MNR (300 MHz, Acetona deuterada) δ 8.02 (d, *J* = 0.7 Hz, 1H), 7.93 – 7.86 (m, 3H), 7.66 (dd, *J* = 8.6, 1.7 Hz, 1H), 7.49 (pd, *J* = 6.8, 1.8 Hz, 2H), 7.32 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 6.74 – 6.65 (m, 3H), 6.33 (dd, *J* = 15.8, 6.8 Hz, 1H), 5.57 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H), 4.76 (s, 1H), 2.89 (s, 6H).

<sup>13</sup>C MNR (75 MHz, Acetona deuterada) δ 150.69 , 142.89 , 134.02 , 133.32 , 130.36 , 128.85 , 128.38 , 128.25 , 128.09 , 127.91 , 126.42 , 126.01 , 125.64 , 125.60, 124.86, 112.75, 75.26, 40.12.

HRMS (EI): *m/z* calculada para C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>N [M-OH]<sup>+</sup>: 286.1590 [M-OH]<sup>+</sup> encontrada: 286.1596

### Síntesis de 1-(4-acetilfenil)-3-etiltiourea (25)

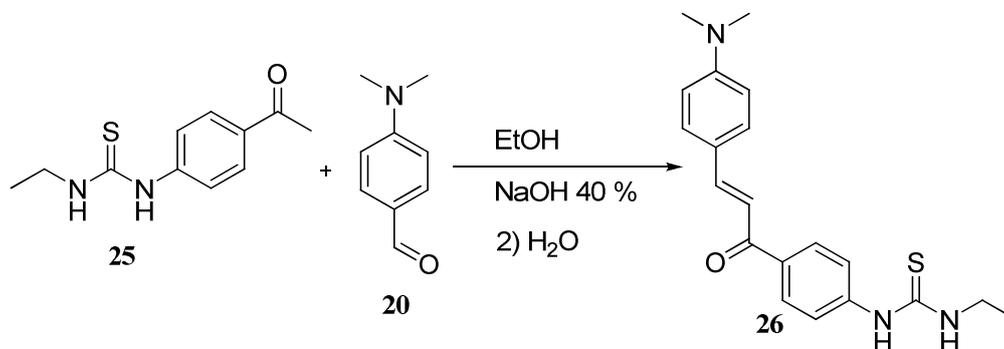


En un matraz de 100 mL de fondo redondo provisto de agitación magnética y refrigerante se disuelve 4-aminoacetofenona (**23**) (1.045g, 7.73 mmol) en 10 mL de THF y se añade isotiocianato de etilo (**24**) (698 $\mu\text{L}$ , 7.73 mmol) y trietilamina (1.077mL, 7.73 mmol). La mezcla de reacción se calienta a reflujo toda la noche. Se concentra en el rotavapor para eliminar el disolvente y el residuo se disuelve con diclorometano (30 mL), se lava con HCl al 10% (3  $\times$  20 mL), se seca con  $\text{MgSO}_4$  anhidro y se concentra, obteniéndose 1.37g (80%) del producto **25** en forma de sólido amarillo.

$^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.02 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H), 7.89 (s, 1H), 7.32 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H), 6.25 (s, 1H), 3.78 – 3.65 (m, 2H), 2.61 (s, 3H), 1.26 (t,  $J = 7.3$  Hz, 3H).

$^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  197.20, 180.43, 141.48, 134.79, 130.78, 123.38, 40.88, 26.97, 14.53.

### Síntesis de (E)-1-(4-(3-(4-(dimetilamino)fenil)acriloil)fenil)-3-etiltiourea (26)



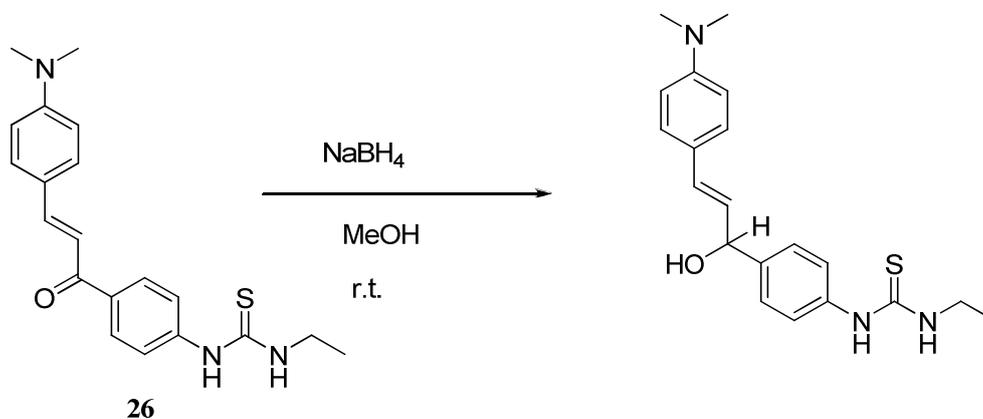
En un matraz de fondo redondo de 100 mL provisto de agitación magnética se disuelven 4-dimetilaminobenzaldehído (**20**) (97%) (456 mg, 3.06 mmol) y 1-(4-acetilfenil)-3-etiltiourea (**25**) (679 mg, 3.06 mmol) en 10

mL de EtOH. Se añaden 2 mL de una disolución de NaOH al 40% en agua-EtOH (4:1) y se agita durante toda la noche. La mezcla de reacción se vierte sobre agua (100 mL) y precipita el producto en forma de sólido de color rojo. Se filtra con un embudo Büchner y se seca en estufa a 60 °C. El producto **26** se recristaliza de MeOH, obteniéndose 487 mg (45%) de un sólido de color rojo.

<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.99 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.73 (d, *J* = 15.5 Hz, 2H), 7.50 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.29 – 7.20 (m, 3H), 6.75 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 6.19 (s, 1H), 3.70 – 3.58 (m, 2H), 3.01 (s, 6H), 1.18 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

<sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 187.93, 179.50, 150.30, 141.56, 130.98, 130.82, 128.07, 126.96, 125.80, 123.82, 112.70, 104.01, 55.43, 41.01, 17.88.

### Síntesis de (E)-1-(4-(3-(4-(dimetilamino)fenil)-1-hidroxiálil)fenil)-3-etiltiourea (R14)

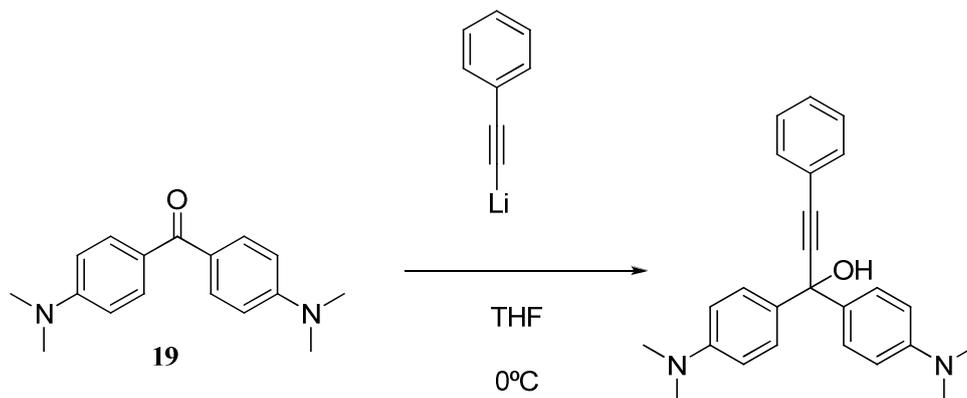


En un matraz de fondo redondo de 100 mL provisto de agitación magnética se disuelve la cetona **26** (46 mg, 0.13 mmol) en 10 mL de MeOH. Se adiciona poco a poco NaBH<sub>4</sub> (49 mg, 1.30 mmol) y se agita a temperatura ambiente toda la noche. Se añaden 20 mL de agua y se realiza una extracción con acetato de etilo (3 × 20 mL). La fase orgánica se lava con 20 mL de salmuera, se seca con MgSO<sub>4</sub> anhidro y se concentra en el rotavapor obteniéndose 47 mg (100%) del producto en forma de aceite verde.

$^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.77 (s, 1H), 7.41 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H), 7.19 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H), 7.08 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 6.58 (d,  $J = 8.9$  Hz, 2H), 6.51 (d,  $J = 15.7$  Hz, 1H), 6.04 (dd,  $J = 15.7, 7.3$  Hz, 1H), 5.94 (s, 1H), 5.27 (d,  $J = 7.5$  Hz, 1H), 3.63 – 3.50 (m, 2H), 2.88 (s,  $J = 1.9$  Hz, 6H), 1.09 (t,  $J = 7.3$  Hz, 3H).

$^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  180.82, 150.79, 142.97, 135.50, 132.00, 128.47, 128.07, 126.96, 125.80, 124.75, 112.70, 75.44, 53.87, 40.84, 14.71.

### Síntesis de 1,1-bis(4-(dimetilamino)fenil)-3-fenilprop-2-in-1-ol (R15)<sup>102</sup>



En un matraz de fondo redondo de 100 mL provisto de agitación magnética, baño de agua-hielo y atmósfera inerte se disuelve a 0 °C fenilacetileno (200  $\mu\text{L}$ , 1.82 mmol) en 15 mL de THF seco recién destilado y se inyecta BuLi 1.32 M en hexano (1.52 mL, 1.1 equivalentes). Se agita durante 25 minutos para permitir la formación cuantitativa del fenilacetiluro de litio y se inyecta 4,4'-bis(dimetilamino)benzofenona (**19**) (488 mg, 1.82 mmol) disuelta en 10 mL de THF seco a 0 °C. Se deja toda la noche agitando a temperatura ambiente y se añaden 50 mL de agua precipitando el producto impuro en forma de sólido blanco amarillento. El producto se purifica por cromatografía en columna empleando como fase estacionaria sílice que previamente ha sido basicada con trietilamina y como fase móvil una mezcla de hexano, acetato de etilo y  $\text{Et}_3\text{N}$  (8:3:1). Se obtienen 296 mg (44%) de un sólido de color blanco amarillento.

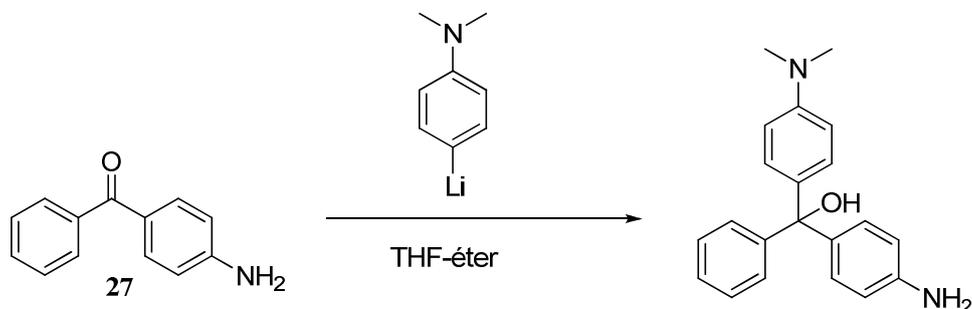
$^1\text{H}$  RMN (300 MHz, Acetona deuterada)  $\delta$  7.39 – 7.30 (m, 6H), 7.27 – 7.21 (m, 3H), 6.56 (d,  $J = 9.0$  Hz, 4H), 2.77 (s, 12H).

<sup>102</sup> Nakatsuji S., Okamoto N., Nakashima K., Akiyama S., *Chem. Lett.*, **1986**, 329.

$^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz, Acetona deuterada)  $\delta$  150.26, 135.16, 132.01, 131.72, 128.86, 128.59, 127.28, 112.15, 94.71, 85.21, 73.74, 40.19.

**HRMS (ED):**  $m/z$  calculada para  $\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 371.2123  $[\text{M}+\text{H}]^+$  encontrada: 371.2119

### Síntesis de (4-aminofenil)(4-(dimetilamino)fenil)fenil)metanol (R16)



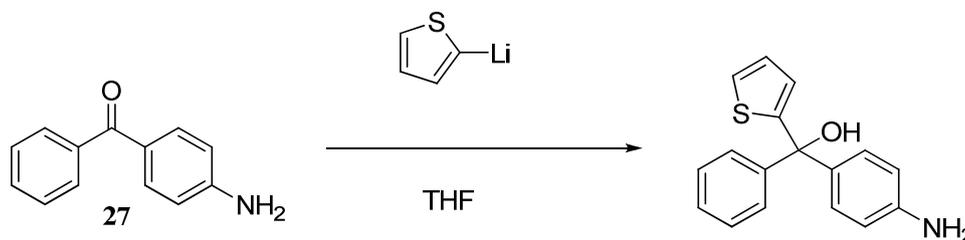
En un matraz de fondo redondo de 250 mL provisto de agitación magnética y atmósfera inerte se disuelve  $N,N,N',N'$ -tetrametiletilendiamina (955  $\mu\text{L}$ , 6.33 mmol) en 40 mL de éter dietílico, se inyecta  $n$ -butil-litio 1.3M en hexano (4.87 mL, 6.33 mmol) y se agita a temperatura ambiente durante 45 minutos para garantizar la formación del complejo BuLi-TMEDA. Se añade 4-bromo- $N,N$ -dimetilanilina (1.266 g, 6.33 mmol) disuelta en 25 mL de éter dietílico y se agita durante 90 minutos para que se forme la 4-litio- $N,N$ -dimetilanilina. A esta disolución se le inyecta 4-aminobenzofenona (27) (208 mg, 1.05 mmol) disuelta en 30 mL de THF y se agita durante 5 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se vierte sobre 100 mL de agua y se extrae con diclorometano ( $3 \times 20$  mL). La fase orgánica se lava con 20 mL de salmuera, se seca con  $\text{MgSO}_4$  anhidro y se concentra en el rotavapor obteniéndose un aceite de color verde. El producto se purifica por cromatografía en columna empleando como fase estacionaria sílice que previamente ha sido basificada con trietilamina y como fase móvil una mezcla de hexano, acetato de etilo y  $\text{Et}_3\text{N}$  (5:4:2). Se obtienen 120 mg (36 %) en forma de aceite de color verde.

$^1\text{H}$  MNR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.37 – 7.27 (m, 5H), 7.13 (d,  $J = 9.0$  Hz, 2H), 7.07 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H), 6.68 (d,  $J = 9.0$  Hz, 2H), 6.61 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H), 2.96 (s, 6H).

$^{13}\text{C}$  MNR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  149.92, 148.28, 145.64, 138.25, 135.88, 129.48, 129.26, 128.26, 128.07, 127.12, 114.83, 112.15, 81.95, 40.96.

HRMS (EI):  $m/z$  calculada para  $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{N}_2$   $[\text{M}-\text{OH}]^+$ : 301.1705  $[\text{M}-\text{OH}]^+$  encontrada: 301.1701

### Síntesis de (4-aminofenil)(fenil)(tiofen-2-il)metanol (R17)



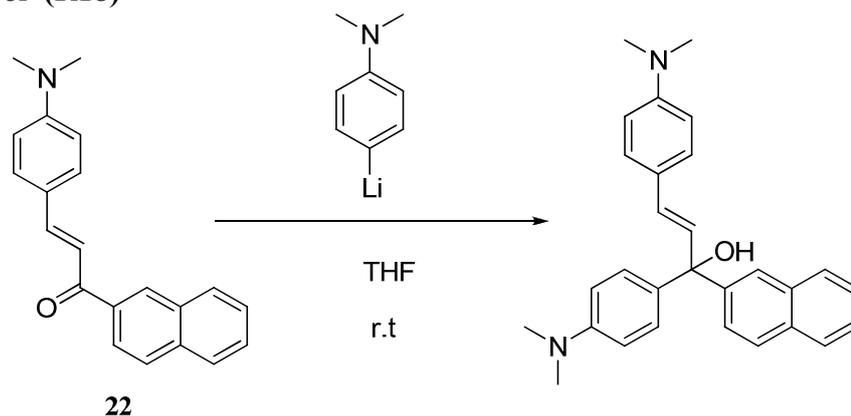
En un matraz de fondo redondo de 100 mL provisto de agitación magnética y atmósfera inerte se disuelve la 4-aminobenzofenona (**27**) (450 mg, 2.28 mmol) en 20 mL de THF seco recién destilado y se inyecta 2-tiofenil-litio 1M en THF (22.8 mL, 22.8 mmol). Se agita a temperatura ambiente durante 5 horas. Transcurrido este tiempo la mezcla de reacción se vierte sobre 100 mL de agua y se extrae con diclorometano ( $3 \times 20$  mL). La fase orgánica se lava con 20 mL de salmuera, se seca con  $\text{MgSO}_4$  anhidro y se concentra en el rotavapor obteniéndose un aceite de color marrón. El producto se purifica por cromatografía en columna empleando como fase estacionaria sílice que previamente ha sido basicada con trietilamina y como fase móvil una mezcla de hexano, acetato de etilo y  $\text{Et}_3\text{N}$ . Se obtienen 302 mg (47 %) en forma de aceite de color marrón.

$^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.43 (dd,  $J = 8.0, 1.8$  Hz, 2H), 7.38 – 7.30 (m, 3H), 7.28 (dd,  $J = 5.1, 1.2$  Hz, 1H), 7.13 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H), 6.96 (dd,  $J = 5.1, 3.6$  Hz, 1H), 6.76 (dd,  $J = 3.6, 1.2$  Hz, 1H), 6.58 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H).

$^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  153.52, 147.52, 146.10, 137.53, 128.97, 128.27, 127.73, 127.70, 126.99, 126.82, 125.75, 114.98, 80.26.

HRMS (EI):  $m/z$  calculada para  $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{NS}$   $[\text{M}-\text{OH}]^+$ : 264.0847  $[\text{M}-\text{OH}]^+$  encontrada: 264.0841

## Síntesis de (E)-1,3-bis(4-(dimetilamino)fenil)-1-(naftalen-2-il)prop-2-en-1-ol (R18)<sup>103</sup>



En un matraz de fondo redondo de 100 mL provisto de agitación magnética y atmósfera inerte se disuelve N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (332  $\mu$ L, 2.18 mmol) en 20 mL de éter dietílico, se inyecta n-butil-litio 1.3M en hexano (1.68 mL, 2.18 mmol) y se agita a temperatura ambiente durante 45 minutos para garantizar la formación del complejo BuLi-TMEDA. A esta disolución se le inyecta p-dimetilaminonaftilidencetona (**22**) (327 mg, 1.09 mmol) disuelta en 30 mL de THF y se agita durante 5 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se vierte sobre 100 mL de agua y se extrae con diclorometano (3  $\times$  20 mL). La fase orgánica se lava con 20 mL de salmuera, se seca con MgSO<sub>4</sub> anhidro y se concentra en el rotavapor obteniéndose un aceite amarillo. El aceite se agita con hexano y precipita el producto en forma de sólido de color verde (220 mg, 48%).

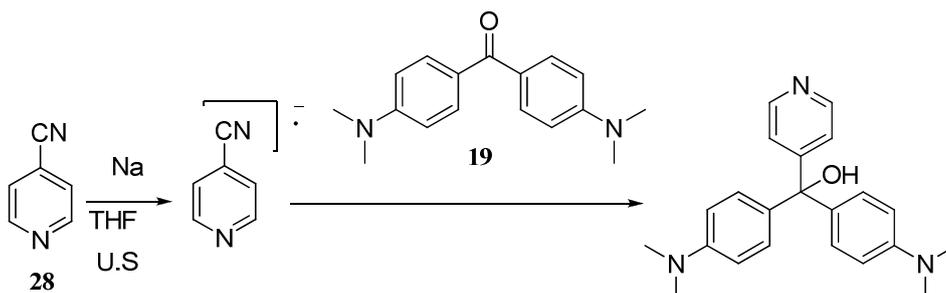
<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.91 (d,  $J$  = 1.7 Hz, 1H), 7.77 – 7.67 (m, 4H), 7.42 (dd,  $J$  = 8.6, 1.8 Hz, 1H), 7.40 – 7.35 (m, 2H), 7.23 (dd,  $J$  = 8.9, 3.6 Hz, 4H), 6.62 – 6.57 (m, 5H), 6.46 (d,  $J$  = 15.9 Hz, 1H), 2.87 (s, 6H), 2.86 (s, 6H).

<sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  150.56, 150.16, 144.58, 134.73, 133.46, 132.83, 131.83, 129.61, 128.72, 128.59, 128.06, 128.00, 127.88, 126.35, 126.31, 126.33, 126.18, 125.70, 125.31, 112.84, 112.46, 79.87, 40.96.

HRMS (EI):  $m/z$  calculada para C<sub>29</sub>H<sub>29</sub>N<sub>2</sub> [M-OH]<sup>+</sup>: 405.2331 [M-OH]<sup>+</sup> encontrada: 405.2334

<sup>103</sup> Gorman S. A., Hepworth J.D., Mason D., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **2000**, 1889.  
158

## Síntesis de bis(4-(dimetilamino)fenil(piridin-4-il)metanol (R19)<sup>104</sup>



En un matraz de fondo redondo de 100 mL provisto de agitación magnética y atmósfera inerte de argón se disuelve 4-cianopiridina (**28**) (870 mg, 8.36 mmol) en THF seco recién destilado (60 mL). Se añade sodio recién cortado en pequeñas piezas (400 mg, 17.39 mmol) y se somete la mezcla a ultrasonidos hasta que la disolución adquiere un color rojo intenso indicativo de la formación del radical anión. Se añade 4,4'-bis(dimetilamino)benzofenona (**19**) ( 2.58 g, 9.63 mmol) y se agita durante 24 horas. La mezcla de color marrón-rojizo se hidroliza con agua (20 mL). La mayor parte del producto precipita como un sólido blanco. El filtrado se extrae con diclorometano (3 × 20 mL), se seca la fase orgánica con MgSO<sub>4</sub> anhidro y se concentra en el rotavapor. El producto extraído se purifica por cromatografía en columna empleando alúmina como fase estacionaria y una mezcla de hexano: acetato de etilo (7:3) como fase móvil. En total se obtienen 2.6 g (90%) del producto en forma de sólido de color blanco.

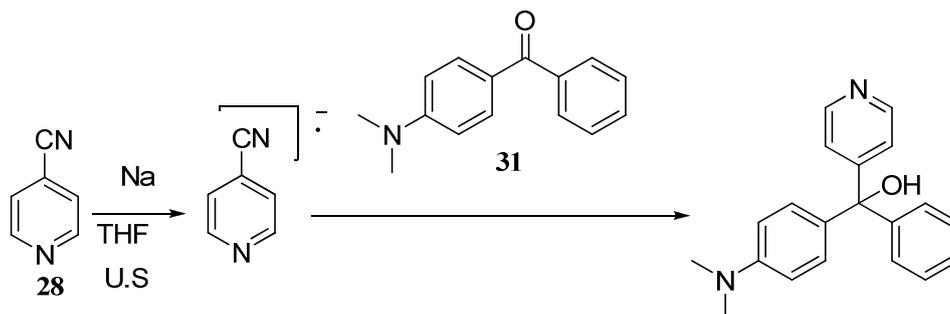
<sup>1</sup>H MNR (300 MHz, CD<sub>3</sub>CN) δ 8.84 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H), 7.61 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H), 7.40 (d, *J* = 9.4 Hz, 2H), 7.02 (d, *J* = 9.5 Hz, 2H), 3.33 (s, 6H).

<sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 157.29, 150.11, 149.35, 134.37, 129.13, 123.11, 112.16, 81.10, 40.85.

HRMS (EI): *m/z* calculada para C<sub>22</sub>H<sub>24</sub>N<sub>3</sub> [M-OH]<sup>+</sup>: 330.1970 [M-OH]<sup>+</sup> encontrada: 330.1971

<sup>104</sup> Zeng X., Cai J., Gu Y., *Tetrahedron Lett.*, **1995**, 36, 7275.

## Síntesis de (4-(dimetilamino)fenil)(fenil)(piridin-4-il)metanol (R20)



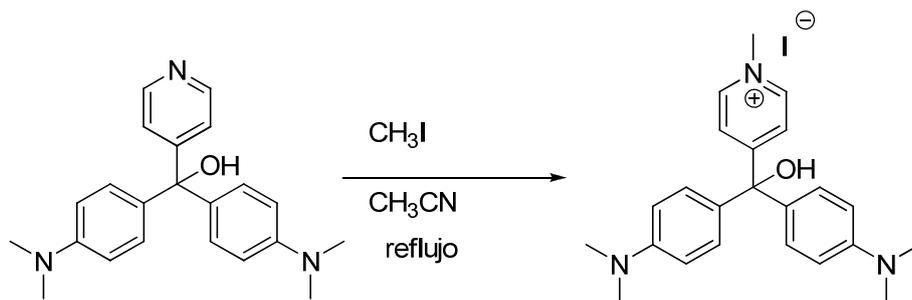
En un matraz de fondo redondo de 100 mL provisto de agitación magnética y atmósfera inerte de argón se disuelve 4-cianopiridina (**28**) (1.02g, 9.8 mmol) en THF seco y recién destilado (60 mL). Se añade sodio recién cortado en pequeñas piezas (470 mg, 20.4 mmol) y se somete la mezcla a ultrasonidos hasta que la disolución adquiere un color rojo intenso indicativo de la formación del radical anión. Se añade la 4-dimetilaminobenzofenona (**31**) ( 2.76 g, 12.25 mmol) y se agita durante 24 horas. La mezcla de color verde oscuro se hidroliza con agua (20 mL). El producto precipita en forma de sólido de color blanco. Se filtra con un embudo Büchner y se lava con acetona. Se seca en estufa a 60 °C obteniéndose 3.0 g (80%).

<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.50 (dd, *J* = 4.5, 1.6 Hz, 2H), 7.31 – 7.25 (m, 7H), 7.03 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 6.63 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 2.93 (s, 6H).

<sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 156.37, 150.39, 149.79, 146.38 133.70, 129.21, 128.46, 128.11, 127.88, 123.06 , 112.16, 77.61, 40.77.

HRMS (EI): *m/z* calculada para C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O [M]<sup>+</sup>: 304.1576 [M+H]<sup>+</sup> encontrada: 305.1650

## Síntesis de yoduro de bis(4-(dimetilamino)fenil(4-piridinio)metanol (R21)



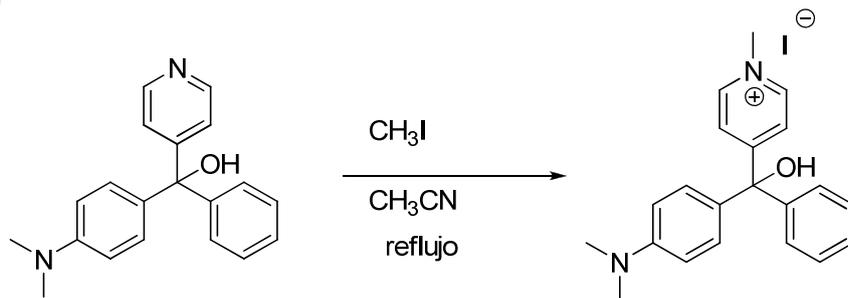
En un matraz de fondo redondo de 100 mL provisto de agitación magnética y refrigerante se disuelve bis(4-(dimetilamino)fenil(piridin-4-il)metanol (139 mg, 0.40 mmol) en acetonitrilo anhidro (30 mL) y se añade yoduro de metilo (27.5  $\mu\text{L}$ , 0.44 mmol, 1.1 equivalentes). La disolución verde resultante se refluja durante 16 horas. Pasado este tiempo se concentra en el rotavapor para eliminar el disolvente y el exceso de yoduro de metilo empleado obteniéndose un aceite de color verde. Se purifica por cromatografía en columna empleando alúmina como fase estacionaria y una mezcla de acetato de etilo y metanol (9:1) como fase móvil. Se obtienen 154 mg (79%) del producto en forma de aceite de color verde.

$^1\text{H RMN}$  (300 MHz, MeOD)  $\delta$  8.77 (d,  $J = 6.8$  Hz, 2H), 8.02 (d,  $J = 6.9$  Hz, 2H), 7.15 (d,  $J = 9.0$  Hz, 4H), 6.73 (d,  $J = 9.0$  Hz, 4H), 4.37 (s, 3H), 2.93 (s, 12H).

$^{13}\text{C RMN}$  (75 MHz, MeOD)  $\delta$  169.73, 152.05, 146.30, 134.13, 131.98, 130.46, 127.68, 113.71, 82.11, 48.79, 41.23.

**HRMS (EI):**  $m/z$  calculada para  $\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{N}_3\text{O}^+$   $[\text{M}]^+$ : 362.2232  $[\text{M}]^+$   
encontrada: 362.2235

### Síntesis de ioduro de (4-(dimetilamino)fenil)(fenil)(4-piridinio)metanol (R22)



En un matraz de fondo redondo de 100 mL provisto de agitación magnética y refrigerante se disuelve (4-(dimetilamino)fenil)(fenil)(piridin-4-il)metanol (145 mg, 0.48 mmol) en acetonitrilo anhídrido (30 mL) y se añade ioduro de metilo (149  $\mu\text{L}$ , 2.38 mmol, 5 equivalentes). La disolución amarilla resultante se refluja durante 16 horas. Pasado este tiempo se concentra en el rotavapor para eliminar el disolvente y el exceso de ioduro de metilo empleado obteniéndose un sólido de color amarillo. Se purifica por cromatografía en columna empleando alúmina como fase estacionaria y una mezcla de acetato de etilo y metanol (9:1) como fase móvil. Se obtienen 100 mg (47%) del producto en forma de aceite de color amarillo.

$^1\text{H RMN}$  (300 MHz, MeOD)  $\delta$  8.79 (d,  $J = 6.7$  Hz, 2H), 8.07 (d,  $J = 7.0$  Hz, 2H), 7.41 – 7.34 (m, 5H), 7.12 (d,  $J = 9.1$  Hz, 2H), 6.76 (d,  $J = 9.1$  Hz, 2H), 4.39 (s, 3H), 2.96 (s, 6H).

$^{13}\text{C RMN}$  (75 MHz, MeOD)  $\delta$  169.23, 152.32, 146.59, 146.38, 133.56, 130.45, 129.81, 129.55, 129.44, 127.82, 113.65, 82.07, 48.65, 41.07.

**HRMS (EI):**  $m/z$  calculada para  $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}$   $[\text{M}]^+$ : 319.1810  $[\text{M}]^+$  encontrada: 319.1814

**Capítulo 5. Detección cromogénica de simulantes de agentes nerviosos mediante el control del transporte de masa a la superficie de nanopartículas de sílice bifuncionalizadas.**

## **Capítulo 5. Detección cromogénica de simulantes de agentes nerviosos mediante el control del transporte de masa a la superficie de nanopartículas de sílice bifuncionalizadas.**

### ***5.1 Introducción***

#### **5.1.1 Materiales híbridos orgánico-inorgánicos.**

La obtención de sensores químicos altamente selectivos es un campo de interés dentro de la química supramolecular. Esta alta selectividad es en ocasiones muy difícil de alcanzar mediante procedimientos sintéticos normales. Por ello, en los últimos años, se han empezado a unir conceptos de química supramolecular con la química de los materiales inorgánicos con el objetivo de obtener materiales híbridos sensores con mejores selectividades y aplicabilidad. En estos materiales híbridos no sólo es posible controlar el tamaño, la forma o el área superficial sino que permiten un control de las propiedades químicas y físicas de la superficie. Así se abre la posibilidad de preparar “materiales a la carta” aplicables a cualquier área científica.

La incorporación de sensores de base molecular en superficies sólidas presenta diversas ventajas respecto al reconocimiento en disolución ya que los ligandos pueden alinearse en una disposición paralela formando monocapas más o menos densas. Como consecuencia de dicha ordenación se produce una restricción de movimiento y la aparición de procesos colectivos inducidos por la preorganización que favorecen el reconocimiento. Además, sobre los materiales inorgánicos se pueden llevar a cabo sucesivas etapas de funcionalización, lo que permite introducir moléculas orgánicas diferentes en un mismo material y así modular sus propiedades a voluntad.

Así, una línea especialmente interesante, dentro del campo de los materiales híbridos orgánico-inorgánicos, es el diseño de nuevos protocolos supramoleculares de señalización.

Como ya se comentó en el Capítulo 1 el proceso de señalización supramolecular comprende dos pasos: (i) coordinación selectiva de una especie con la unidad coordinante y (ii) transducción de este fenómeno mediante la modulación de un proceso físico o químico dentro de una sonda que actúa como unidad indicadora. Tradicionalmente, este concepto general de señalización supramolecular ha sido aplicado para el desarrollo de

quimiosensores cromo-fluorogénicos siguiendo la aproximación “unidad coordinante-unidad indicadora”. Aunque este protocolo presenta muchas características atractivas, como la posibilidad de desarrollar un quimiosensor hecho a medida para una especie determinada también presenta algunas limitaciones, especialmente con respecto a la amplificación de la señal y con la dificultad de conseguir un patrón de reconocimiento para pequeñas moléculas orgánicas de interés. Con el objetivo de superar las limitaciones de la aproximación “unidad coordinante-unidad indicadora” se ha empezado recientemente a estudiar la aplicación de los materiales híbridos orgánico-inorgánicos en aplicaciones de señalización. Como veremos a continuación, estos sistemas híbridos normalmente aprovechan la combinación de los materiales inorgánicos con los principios clásicos supramoleculares. Este concepto simple ha permitido crear materiales híbridos para el reconocimiento de varios aniones,<sup>105</sup> cationes<sup>106</sup> y especies neutras<sup>107</sup>. En estos materiales híbridos la selectividad es más alta que la conseguida por otros métodos convencionales.

A continuación se presentarán algunos materiales híbridos orgánico-inorgánicos que han sido publicados recientemente y que presentan efectos sinérgicos que mejoran la capacidad de reconocimiento y de detección de ciertas especies. El objetivo final es que podamos entender las bases para el diseño del material híbrido para la detección cromogénica de simulantes de agentes nerviosos mediante el control del transporte de masa a la superficie de nanopartículas de sílice bifuncionalizadas que mostraremos más adelante. Los casos discutidos en los siguientes apartados sugieren que la combinación acertada de los principios supramoleculares y materiales inorgánicos 2D o 3D conduce a estrategias de reconocimiento originales con una adecuación sin precedentes de las propiedades de los sólidos y por tanto a nuevas perspectivas de aplicabilidad de conceptos supramoleculares en relación con la señalización. Se prestará especial atención a los casos donde la combinación funcional de las herramientas de la química supramolecular tradicional, como la topología y la disposición de grupos funcionales, con estructuras sólidas preorganizadas da como resultado un sistema que es capaz de mostrar un aumento en la respuesta o la selectividad.

---

<sup>105</sup> E. Climent, R. Casasús, M. D. Marcos, R. Martínez-Máñez, F. Sancenón, J. Soto, *Dalton Trans.*, **2009**, 4806; C. Coll, M. D. Marcos, R. Martínez-Máñez, F. Sancenón, J. Soto, *Angew. Chem. Int Ed.*, **2007**, 46, 1675.

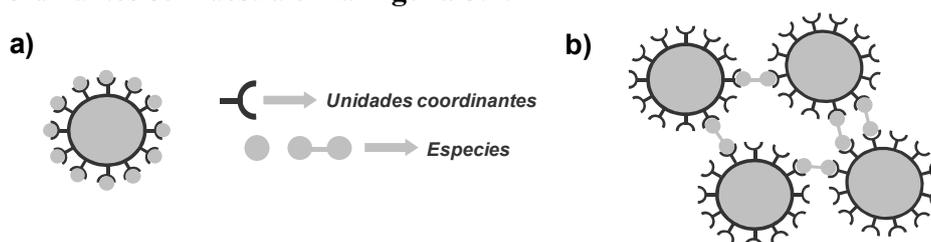
<sup>106</sup> J. V. Ros-Lis, R. Casasús, M. Comes, C. Coll, M. D. Marcos, R. Martínez-Máñez, F. Sancenón, J. Soto, P. Amorós, J. El Haskouri, N. Garró, K. Rurack, *Chem. Eur. J.*, **2008**, 14, 8267.

<sup>107</sup> E. Climent, P. Calero, M. D. Marcos, R. Martínez-Máñez, F. Sancenón, J. Soto, *Chem. Eur. J.* **2009**, 15, 1816.

## 5.1.2 Materiales híbridos orgánico-inorgánicos funcionales en superficies 2D.

### *Nanopartículas de oro*

Una de las formas más empleadas para obtener materiales híbridos a escala nanoscópica es organizar, por medio de un proceso de anclaje, ciertas unidades moleculares funcionales en la superficie de estructuras inorgánicas nanoscópicas como son las nanopartículas. De hecho, los procesos de funcionalización de nanopartículas (de oro o de sílice) son hoy bien conocidos y, por tanto, es posible elegir un gran número de moléculas comercialmente disponibles para la modificación química de las superficies con varios grupos orgánicos diferentes. Desde un punto de vista supramolecular se observa, que tras la funcionalización de la superficie con unidades coordinantes específicas hay un aumento del reconocimiento de la especie de interés. Este aumento deriva de la preorganización de las unidades coordinantes en la superficie que da como resultado una mejora significativa de la coordinación en términos de constantes de coordinación, cuando se comparan con las del receptor libre en disolución. Se han descrito ejemplos del aumento de reconocimiento asistido por la superficie principalmente para nanopartículas de oro (AuNPs) conteniendo determinados receptores. Un esquema general de la coordinación de especies con nanopartículas con superficie funcionalizada con unidades coordinantes se muestra en la **Figura 5.1**.

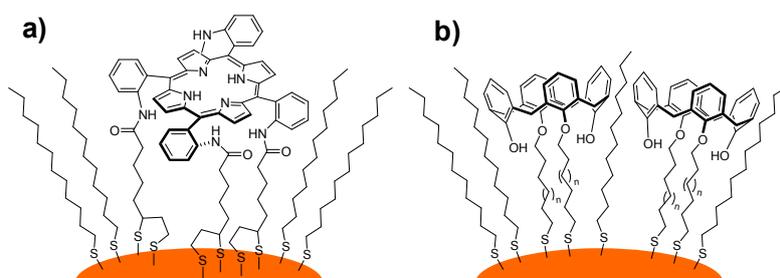


**Figura 5.1** Representación esquemática de nanopartículas de oro (AuNPs) funcionalizadas: a) AuNPs con una alta densidad de unidades coordinantes en su superficie y b) coordinación multidentada con AuNPs.

Este incremento de las constantes de coordinación debido a la preorganización de las unidades coordinantes en la superficie se puede observar en un ejemplo de Beer y colaboradores. Ambos investigadores prepararon unas nanopartículas híbridas de oro funcionalizadas con metaloporfirinas de zinc (**Figura 5.2**, a).<sup>108</sup> Estas AuNPs híbridas coordinan aniones cloruro y dihidrógeno fosfato en DMSO con unas constantes de

<sup>108</sup> P. D. Beer, D. P. Cormode, J. J. Davis, *Chem. Commun.*, **2004**, 414.

asociación (log K) de 4.3 y 4.1, respectivamente. Estas constantes de asociación son dos órdenes de magnitud superiores a las obtenidas para las metaloporfirinas libres en presencia de cloruros (< 2) y dihidrógeno fosfato (2.5). El mismo efecto se observa en AuNPs funcionalizadas con derivados de calix[4]arenos y sales de amonio cuaternario (**Figura 5.2**, b).<sup>109</sup> Los calix[4]arenos son anclados a la superficie de las nanopartículas mediante el uso de alcanotioles con longitudes de cadena diferentes. Además, se preparan nanopartículas híbridas con dos contenidos diferentes de calix[4]arenos. Las valoraciones realizadas mediante <sup>1</sup>H-RMN en cloroformo de las diferentes nanopartículas híbridas preparadas con cationes amonio cuaternario muestra que la coordinación es más fuerte que cuando los calix[4]arenos están en disolución. Los autores también observaron que la eficiencia en la coordinación mejora al incrementar el número de calix[4]arenos anclados en la superficie. El aumento en la longitud del espaciador entre la superficie de AuNPs y los calix[4]arenos también induce una mejora considerable en la capacidad de reconocimiento en disolventes de polaridad media como el cloroformo. En un trabajo más reciente, los mismos autores preparan unas nanopartículas híbridas funcionalizadas con alcanotioles que contienen calix[4]arenos y cadenas de sulfanilalquil oligo (etilen glicol) que funciona en medios acuosos.<sup>110</sup>



**Figura 5.2** Representación esquemática de las nanopartículas de oro funcionalizadas con a) metolaporfirinas y b) calix[4]arenos.

Los aumentos en la capacidad de reconocimiento son debidos, básicamente, a factores entrópicos relacionados con la preorganización de las unidades coordinantes en la superficie que reduce la flexibilidad conformacional de los receptores y aumenta su concentración efectiva. Desde el punto de vista molecular, la funcionalización de la superficie crea un entorno de coordinación multidentado que presenta grandes ventajas en

<sup>109</sup> A. Arduini, D. Demuru, A. Pochini, A. Secchi, *Chem. Commun.*, **2005**, 645.

<sup>110</sup> T. R. Tshikhudo, D. Demuru, Z. Wang, M. Brust, A. Secchi, A. Anduini, A. Pochini, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2005**, 44, 2913.

relación a la coordinación del receptor molecular. Este efecto ha sido llamado “efecto quelato de superficie” y no es una característica única de las superficies funcionalizadas con unidades coordinantes ya que también se ha observado en dendrímeros que muestran un “efecto dendrítico positivo”. Este efecto está relacionado con la capacidad de estas macromoléculas de conseguir un aumento en la capacidad de reconocimiento en cuanto aumenta la generación de los dendrímeros.<sup>111</sup>

Las nanopartículas de oro no sólo favorecen el reconocimiento por la acumulación de unidades coordinantes en superficie sino que tienen capacidad de mostrar cambios de color notables tras procesos de agregación inducidos por alguna especie de interés. La modulación del color observada tras la agregación es debida al acoplamiento de los dipolos que da como resultado un desplazamiento de la banda del plasmón hacia el rojo cuando la distancia interpartícula en los agregados disminuye menos que el promedio de los radios de las partículas.<sup>112,113</sup> Basándose en este fenómeno, se ha empezado a utilizar las AuNPs en protocolos de detección de analitos por agregación/desagregación. Centraremos la atención en trabajos relacionados con la detección de analitos inorgánicos o pequeñas-moléculas.

La base del funcionamiento se muestra en el siguiente ejemplo diseñado para la detección de  $K^+$  y  $Na^+$ . Las AuNPs son funcionalizadas con el macrociclo 15-corona-5 conteniendo grupos alcanotiol. La suspensión inicial de las nanopartículas es de color rojo indicando que estas no están agregadas. La adición de  $K^+$  induce la agregación de las nanopartículas, con un cambio de color de rojo a azul, debido a la formación de complejos de tipo sándwich con estequiometría 2:1 entre los macrociclos y el catión alcalino. Empleando estas nanopartículas se evita la interferencia del catión  $Na^+$  ya que este no tiene tendencia a formar complejos tipo sándwich y no induce la agregación (**Figura 5.3**). Los mismos autores mejoraron el sistema mediante el anclaje, sobre la superficie de las nanopartículas, del ácido tióctico y el macrociclo 15-corona-5 (para la detección de  $K^+$ ) o 12-corona-4 (para  $Na^+$ ). Aparentemente, la introducción de grupos carboxilato en la superficie mejoró, de forma significativa, la coordinación del catión por fuerzas electrostáticas cooperativas. Ambos materiales son también analizados bajo condiciones realistas para la detección colorimétrica de  $K^+$  y  $Na^+$  en muestras de orina.<sup>114,115</sup>

---

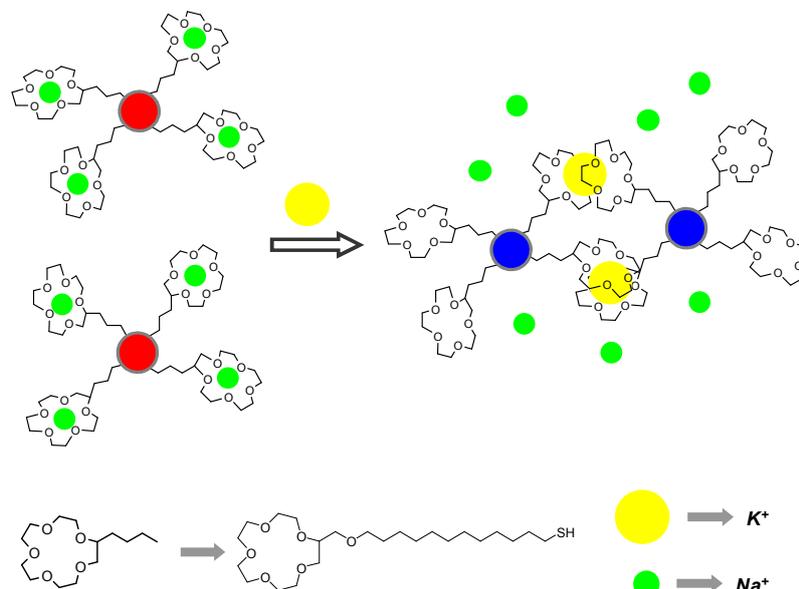
<sup>111</sup> D. Astruc, M.-C. Daniel, J. Ruiz, *Chem. Commun.*, **2004**, 2637.

<sup>112</sup> M. -C. Daniel, D. Astruc, *Chem. Rev.*, **2004**, 104, 293.

<sup>113</sup> U. Kreibitz, M. Vollmer, *Optical Properties of Metal Clusters*, Springer, Berlin, **1998**.

<sup>114</sup> S. -Y. Lin, S. -W. Liu, C. -M. Lin, C. -H. Chen, *Anal. Chem.*, **2002**, 74, 330.

<sup>115</sup> S. -Y. Lin, C. -H. Chen, M. -C. Lin, H. F. Hsu, *Anal. Chem.*, **2005**, 77, 4821.



**Figura 5.3** Agregación selectiva inducida por el catión potasio de las AuNPs funcionalizadas con éteres corona mediante la formación de complejos tipo sándwich.

Los mismos autores también emplean AuNPs funcionalizadas con ácido tióctico y el macrociclo 15-corona-5, conteniendo grupos alcanotiol, para la detección colorimétrica del catión metálico tóxico  $\text{Pb}^{2+}$  en mezclas metanol/agua. En este medio, las AuNPs funcionalizadas están agregadas debido a la aparición de interacciones por enlaces de hidrógeno entre los grupos carboxílicos terminales de la superficie. La adición de  $\text{Pb}^{2+}$  da como resultado la coordinación de dicho catión con el éter corona y por tanto la dispersión debido a la repulsión electrostática entre las cargas positivas de las nanopartículas.<sup>116</sup> Se han descrito también otros ejemplos para la detección colorimétrica de cationes metálicos tóxicos como el  $\text{Hg}^{2+}$ .<sup>117</sup>

El uso de AuNPs funcionalizadas para la detección de aniones es menos común. Un ejemplo muestra que la adición de ciertos aniones como el dihidrógenofosfato, hidrógenosulfato, acetato, nitrato, cloruro, bromuro y/o yoduro causan un cambio drástico en la banda del plasmón (disminuye la intensidad y ligero desplazamiento hacia las longitudes de onda del rojo) de nanopartículas de oro funcionalizadas con amidas. Los cambios de color se asignan a la formación de enlaces de hidrógeno entre los aniones y los grupos amida de la superficie de las nanopartículas. Los autores observan un efecto de amplificación química notable y una disminución del límite de

<sup>116</sup> S. -Y. Lin, S. H. Wu, C. -H. Chen, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, 45, 4948.

<sup>117</sup> C. -C. Huang, H. -T. Chang, *Chem. Commun.*, **2007**, 1215.

detección de alrededor de tres ordenes de magnitud para dichos aniones si se compara con los medidos para el receptor libre.<sup>118</sup> En un trabajo relacionado, Kubo y colaboradores usan AuNPs recubiertas de isotiouronio-alcanotiol para la detección selectiva de aniones como el acetato y el  $\text{HPO}_4^{2-}$  en disoluciones metanol/agua.<sup>119</sup>

### *Nanopartículas de sílice.*

Algunos de los ejemplos descritos en esta introducción muestran un claro efecto de amplificación de la señal derivada de una respuesta colectiva de los grupos anclados. Un ejemplo ilustrativo de este efecto fue descrito por Montalti y colaboradores, quienes prepararon nanopartículas de sílice con grupos dansilo anclados en la superficie y las emplearon como sensor de pH.<sup>120</sup> La protonación de unas pocas unidades dansilo da como resultado una importante desactivación de la fluorescencia no sólo de los fluoróforos protonados sino también de los que están en los alrededores. Esto indica claros signos de amplificación química. A su vez, Montalti y colaboradores desarrollaron otro ejemplo representativo usando nanopartículas de sílice funcionalizadas con una dansilopoliamina anclada como unidad indicadora y coordinante.<sup>121</sup> En este caso la adición de los iones metálicos  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  y  $\text{Ni}^{2+}$  da como resultado una fuerte desactivación de la fluorescencia del dansilo en concentraciones nanomolares ya que la coordinación induce la desactivación de la emisión de muchos fluoróforos situados en los alrededores más próximos. La amplificación de señal queda demostrado por el hecho que un simple catión  $\text{Cu}^{2+}$  es capaz de causar la desactivación de la fluorescencia de 13 dansilos de la superficie.

Desde un punto de vista supramolecular, aparecen efectos cooperativos adicionales asociados con el anclaje independiente de unidades coordinantes y unidades indicadoras en las proximidades de la superficie del soporte. Esto permite la coordinación de las especies de interés en las unidades coordinantes que inducen a su vez una desactivación del fluoróforo que esta cercano a su posición sobre la superficie silícea (**Figura 5.4**). Esta aproximación permite una fácil selección de la proporción ligando-fluoróforo para optimizar la respuesta final del material híbrido. Además esta aproximación elimina los problemas sintéticos asociados a la preparación convencional de receptores complejos y, al mismo tiempo, proporciona un método para el uso de estrategias combinatorias y la

---

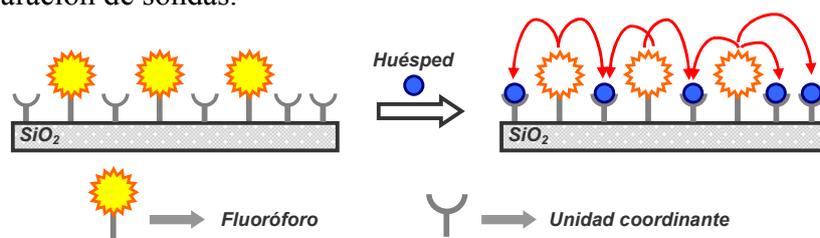
<sup>118</sup> S. Watanabe, M. Sonobe, M. Arai, Y. Tazume, T. Matsuo, T. Nakamura, K. Yoshida, *Chem. Commun.*, **2002**, 2866.

<sup>119</sup> Y. Kubo, S. Uchida, Y. Kemmochi, T. Okubo, *Tetrahedron Lett.*, **2005**, 46, 4369.

<sup>120</sup> M. Montalti, L. Prodi, N. Zaccheroni, G. Falini, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124, 13540.

<sup>121</sup> M. Montalti, L. Prodi, N. Zaccheroni, *J. Mater. Chem.*, **2005**, 15, 2810.

selección de moléculas comercialmente disponibles o de fácil síntesis para la preparación de sondas.



**Figura 5.4** Una superficie difuncionalizada asegura la proximidad espacial necesaria para la comunicación entre las unidades coordinantes y los fluoróforos. Las flechas rojas indican la desactivación inducida por la presencia del huésped.

Esta estrategia ha sido usada por Tecilla y Tonellato para el desarrollo de un sensor fluorimétrico para  $\text{Cu}^{2+}$ . En este caso los autores usan nanopartículas funcionalizadas con ligandos como derivados de la picolinamida para la coordinación selectiva de  $\text{Cu}^{2+}$  y colorantes fluorescentes como la dansylamida.<sup>122</sup> La coordinación de  $\text{Cu}^{2+}$  en los ligandos anclados conduce a una desactivación fuerte de la fluorescencia, permitiendo la detección de  $\text{Cu}^{2+}$  en disoluciones DMSO-agua en concentraciones por debajo del nivel nanomolar. Como en el caso anterior, los autores también confirman que la coordinación de un simple ión metálico conduce a la desactivación de más de 10 grupos fluorescentes alrededor de la unidad receptora, produciendo una amplificación de la señal.

Una variación de esta aproximación consiste el uso de nanopartículas de sílice dopadas con dansilo sintetizadas por cocondensación de tetraetoxisilano y un derivado del dansilo conteniendo grupos trietoxisilano. La adición de  $\text{Cu}^{2+}$  da como resultado la coordinación del metal con los grupos silanol de la superficie y la desactivación de fluorescencia de los dansilos contenidos en la nanopartícula.<sup>123</sup> Un método similar ha sido también usado en films de sol-gel.<sup>124</sup> El efecto del aumento de la señal por la preorganización independiente de los ligandos y las unidades indicadoras no es único de las nanopartículas de sílice ya que han detectado efectos similares en nanopartículas poliméricas,<sup>125</sup> sistemas micelares,<sup>126</sup> y en

<sup>122</sup> E. Rampazzo, E. Brasola, S. Marcuz, F. Mancin, P. Tecilla, U. Tonellato, *J. Mater. Chem.*, **2005**, 15, 2687.

<sup>123</sup> M. Arduini, S. Marcuz, M. Montolli, E. Rampazzo, F. Mancin, S. Gross, L. Armelao, P. Tecilla, U. Tonellato, *Langmuir*, **2005**, 21, 9314.

<sup>124</sup> M. Montalti, L. Prodi, N. Zaccheroni, G. Battistini, S. Marcuz, F. Mancin, E. Rampazzo, U. Tonellato, *Langmuir*, **2006**, 22, 5877.

<sup>125</sup> R. Méallet-Renault, R. Pansu, S. Amigoni-Gerbier, C. Larpent, *Chem. Commun.*, **2004**, 2344.

superficies como monocapas bifuncionalizadas autoensambladas o films Langmuir-Blodgett.<sup>127</sup>

## 5.2 Diseño del material híbrido sensor

Teniendo en cuenta lo comentado anteriormente y el interés en el diseño de nuevos materiales híbridos orgánico-inorgánicos como sondas,<sup>128</sup> se llevó a cabo el diseño y la preparación de un nuevo material híbrido para la detección óptica de simulantes de agentes nerviosos. Este nuevo material está basado en el control del transporte de masa a la superficie de nanopartículas de sílice funcionalizadas.

El enfoque que se llevó a cabo para la detección cromogénica implica el uso de nanopartículas de sílice funcionalizadas con dos subunidades diferentes, grupos tiol (SH) y alcoholes alifáticos (OH) que como se describió en el **Capítulo 2** reaccionan con los simulantes de agentes de guerra química mediante una sustitución nucleofílica del halógeno o grupo ciano correspondiente. El papel de los grupos tiol (inhibidor) es actuar como grupo reactivo frente a un colorante que actúa como indicador. El colorante elegido, capaz de reaccionar con los grupos tiol, fue una escuaridina *N,N*-disustituida con cadenas de tipo poliéter que facilitan una mayor solubilidad en medios acuosos. La reacción entre ambos grupos, escuaridina y tiol, ocurre de forma selectiva debido al ataque nucleofílico del tiol al anillo central de 4 carbonos deficiente en electrones de la escuaridina provocando una pérdida de aromaticidad que se traduce en una pérdida del color azul de las disoluciones de escuaridina.<sup>129</sup>

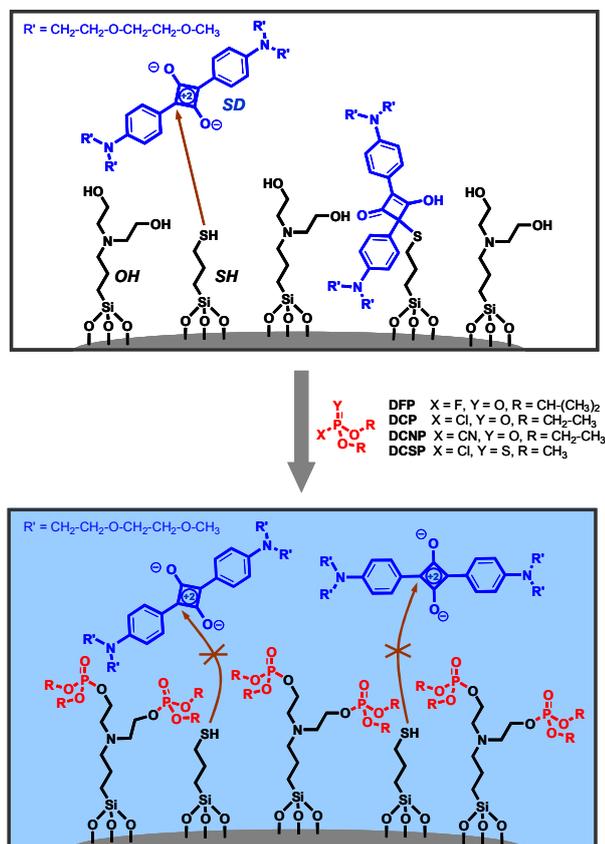
---

<sup>126</sup> E. L. Doyle, C. A. Hunter, H. C. Philips, S. J. Webb, N. H. Williams, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 4593.

<sup>127</sup> Y. Zheng, J. Orbulescu, X. Ji, F. M. Andreopoulos, S. M. Pham, R. M. Leblanc, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 2680.

<sup>128</sup> a) M. Comes, G. Rodríguez-López, M. D. Marcos, R. Martínez-Mañez, F. Sancenón, J. Soto, L. A. Villaescusa, P. Amorós, D. Beltrán, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 2918; b) R. Casasús, E. Aznar, M. D. Marcos, R. Martínez-Mañez, F. Sancenón, J. Soto, P. Amorós, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 6661.

<sup>129</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.* **2004**, *126*, 4064.



**Figura 5.5** Protocolo colorimétrico para la detección de simulantes de agentes nerviosos. Arriba: las nanopartículas bifuncionalizadas **N1** en ausencia de simulantes son capaces de reaccionar con la escuaridina (**SD**, la disolución se vuelve incolora). Abajo: la reacción de los simulantes con los grupos hidroxilos inhibe la reacción de los grupos tiol con la escuaridina (la disolución permanece azul).

El protocolo de reconocimiento está basado en el principio de que la reacción de fosforilación de los grupos OH con ciertos simulantes de agentes nerviosos debería inhibir la reacción entre los grupos tiol y la escuaridina (**SD**), resultando así en un reconocimiento cromogénico (ver **Figura 5.5**). Aunque ambas reacciones están basadas en un ataque nucleofílico, los grupos tiol, que son mucho más nucleofílicos, son los únicos capaces de reaccionar con la escuaridina, mientras que el gran tamaño de los grupos SH dificulta su reacción con el átomo electrofílico de fósforo de los simulantes. El control del transporte de masa a la superficie de sólidos híbridos orgánico-inorgánicos ha sido estudiado poco en procesos de señalización.<sup>130,131,132</sup>

<sup>130</sup> M. Sugawara, K. Kojima, H. Sazawa, Y. Umezawa, *Anal. Chem.* **1987**, 59, 2842.

### 5.3 Síntesis y caracterización de las nanopartículas y de la escuaridina

Para preparar las nanopartículas híbridas bifuncionalizadas con 3-[bis(2-hidroxietil)amino]propiltrióxido de silicio y 3-mercaptopropiltrióxido de silicio se siguió el procedimiento descrito por Montalti y colaboradores.<sup>16</sup> Para ello se suspendieron las nanopartículas de sílice (disolución Ludox al 30 %) en una mezcla de ácido acético/agua/etanol (1:1:2) y se añadieron los reactivos anteriormente mencionados. La mezcla se calentó a 80° C durante 48 horas y posteriormente se eliminaron los disolventes volátiles a presión reducida en el rotavapor. Las nanopartículas precipitan en la disolución acuosa y se separan por filtración a vacío, se lavan 2 veces con acetona y se liofilizan para eliminar el agua y restos de disolventes que puedan quedar ocluidos.

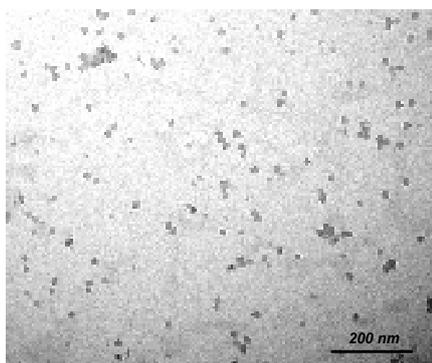


Figura 5.6 Imagen de TEM de las nanopartículas N1-1 sintetizadas.

Tabla 5.1 Contenidos en tiol y alcohol de las nanopartículas de sílice.

Material	mmol tiol /g SiO <sub>2</sub>	mmol alcohol/g SiO <sub>2</sub>	Distancia (Å)
N1-1	0.41	2.74	3.5 <sup>a</sup>
N1-2	0.06	0.44	8.3 <sup>a</sup>
N2	0.55	-	7.8 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Distancia promedio entre los grupos tiol y alcohol

<sup>b</sup> Distancia promedio entre los grupos tiol

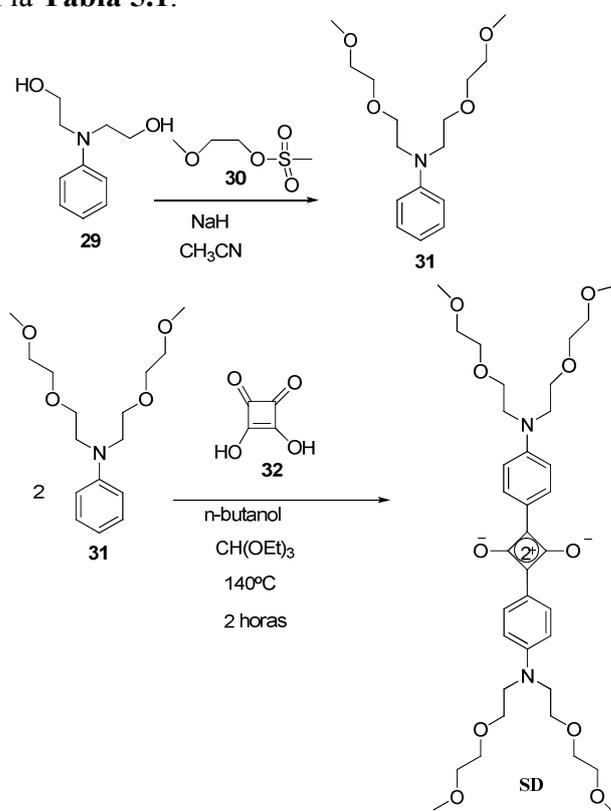
El sólido bifuncionalizado N1-1 fue caracterizado utilizando procedimientos estándar. El contenido de tiol y grupos hidroxilo fue

<sup>131</sup> E. Climent, P. Calero, M. D. Marcos, R. Martínez-Máñez, F. Sancenón, J. Soto, *Chem. Eur. J.* **2009**, 15, 1816.

<sup>132</sup> E. Climent, R. Casasús, M. D. Marcos, R. Martínez-Máñez, F. Sancenón, J. Soto, *Chem. Commun.* **2008**, 6531.

determinado mediante análisis elemental y medidas termogravimétricas, resultando ser de 0.41 y 2.74 mmol/g SiO<sub>2</sub> respectivamente. En la **Figura 5.6** se puede observar una fotografía de Microscopía de Transmisión Electrónica (TEM) que indica que el tamaño promedio de las nanopartículas es de unos 20 nm. Teniendo en cuenta el contenido orgánico y la superficie de las nanopartículas silíceas (200 m<sup>2</sup>/g), la fracción ocupada por el tiol y la *N,N*-dihidroxiethylpropilamina es de 9.48 moléculas/nm<sup>2</sup>, estando ambas a una distancia media de 3.5Å. Una de las ventajas del uso de nanopartículas de sílice frente a partículas de sílice de mayor tamaño en protocolos de detección en disolución es la posibilidad de preparar suspensiones estables que permiten monitorizar los cambios de color sin necesidad de filtrar.

También se sintetizaron y caracterizaron, mediante los mismos procedimientos, otros dos tipos de nanopartículas bifuncionalizadas. Una de ellas contiene las dos subunidades en distinta proporción tiol/hidroxilos (**N1-2**), mientras que las otras nanopartículas solo contienen grupos tiol (**N2**). Los contenidos de grupo tiol y dialcohol de estas nanopartículas se muestran en la **Tabla 5.1**.

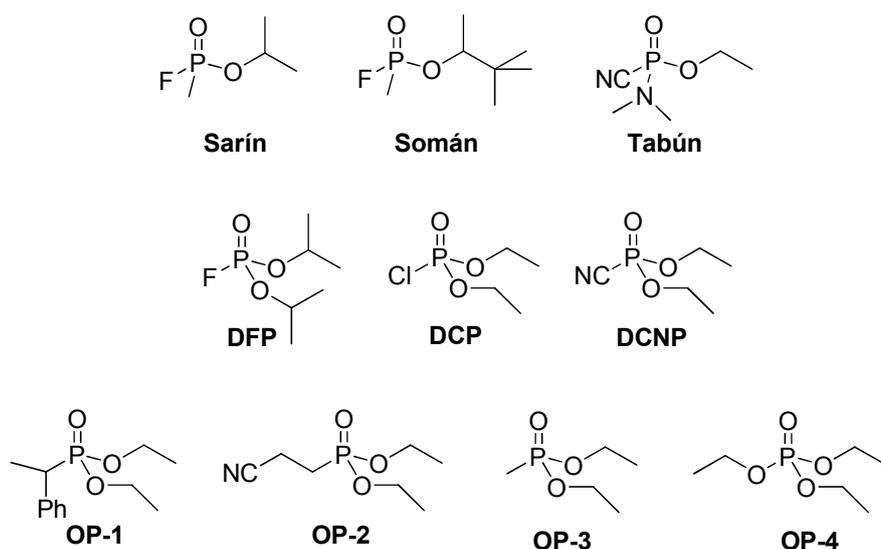


**Figura 5.7** Ruta sintética seguida para la obtención de la escuaridina **SD**.

La escuaridina **SD** se sintetizó siguiendo la ruta que se muestra en la **Figura 5.7**, para ello se calentó a reflujo durante 2 horas una mezcla de ácido estuárico, *N,N*-bis(2-(2-metoxietoxi)etil)anilina y trietilortoformiato disueltos en *n*-butanol y posteriormente se precipitó el producto **SD** añadiendo hexano. La *N,N*-bis(2-(2-metoxietoxi)etil)anilina se obtuvo por reacción de la *N*-fenildietanolamina con 2-metoxietilmetano sulfonato en acetonitrilo seco en presencia de NaH. La escuaridina **SD** se caracterizó por técnicas de resonancia magnética nuclear, de  $^1\text{H}$  y de  $^{13}\text{C}$ , y por análisis de masas (MS) (para más detalles ver apartado 5.5).

#### 5.4 Estudios de detección de simulantes de agentes nerviosos.

Los estudios de detección se llevaron a cabo utilizando los simulantes de agentes nerviosos DCP, DFP, DCNP y otros compuestos organofosforados (**OP-1-4** en **Figura 5.8**).



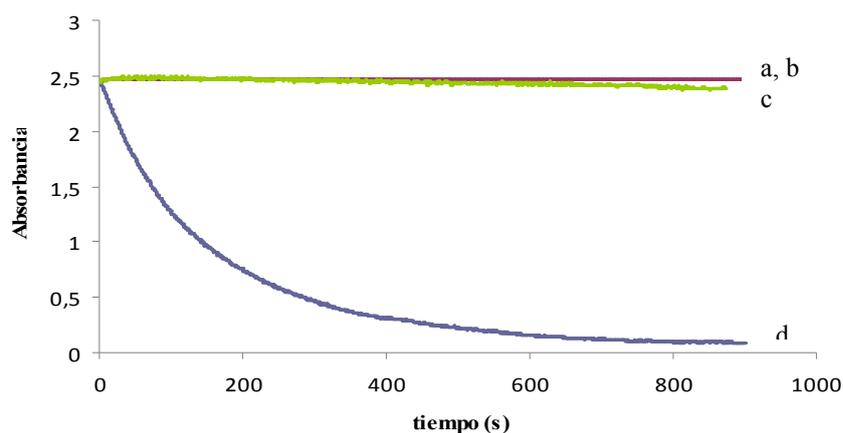
**Figura 5.8** Estructura química de Sarín, Somán y Tabún, sus simulantes y diferentes compuestos organofosforados.

##### 5.4.1 Estudios de detección en disolución.

Se estudió el comportamiento del material nanoparticulado bifuncionalizado en ausencia y en presencia de simulantes de gases nerviosos mediante la monitorización de la intensidad de la banda de absorbancia del colorante escuaridina centrada a 641 nm en acetonitrilo. En

un experimento preliminar se mezcló 0.2 mL de una suspensión de nanopartículas **N1-1** (3.7 g en 125 mL de tampón fosfato 0.01 M a pH 7.0) con 19.8 mL de acetonitrilo obteniéndose una suspensión relativamente homogénea. Posteriormente se tomaron 2.7 mL de esta suspensión y se añadieron 0.15 mL de una disolución de escuaridina  $1.0 \times 10^{-4}$  M en acetonitrilo, observando una decoloración de la suspensión con el transcurso del tiempo debido a la reacción entre la escuaridina presente en la disolución y los tioles anclados en el soporte nanoparticulado. No obstante, cuando se suspendieron 0.2 mL de **N1-1** en 19.8 mL de una disolución de DCP  $5.0 \times 10^{-3}$  M en acetonitrilo no se observó ésta decoloración con el transcurso del tiempo manteniéndose la suspensión coloreada durante horas. La misma experiencia se realizó con DCNP y DFP obteniéndose los mismos resultados.

En la **Figura 5.9** se puede observar la absorbancia registrada a 641 nm en función del tiempo en acetonitrilo y en presencia de los simulantes DCP, DCNP y DFP en concentración 0.005 M. La permanencia del colorante en la disolución se debe a la inhibición de la reacción de la escuaridina con los grupos tiol anclados en el sólido **N1-1** debido a que los simulantes de agentes neurotóxicos son capaces de reaccionar con los grupos hidroxilo anclados en **N1-1** y así impedir el acceso de la escuaridina a los grupos tiol anclados en la superficie. Se modula así el acceso de la escuaridina a los tioles por la presencia de los simulantes en la disolución.

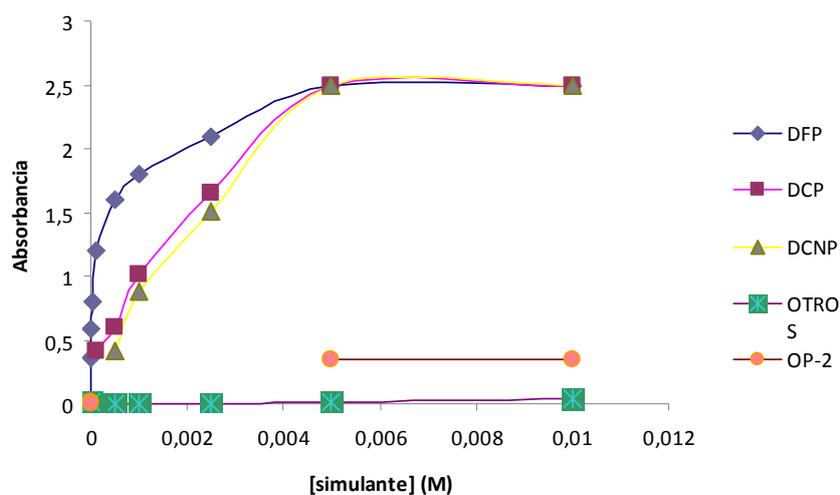


**Figura 5.9** Absorbancia a 643 nm (máximo de la banda de absorción del colorante escuaridina) en función del tiempo para suspensiones de las nanopartículas **N1-1**. (a) **N1-1** y **SD** en presencia de DFP, (b) **N1-1** y **SD** en presencia de DCP, (c) **N1-1** y **SD** en presencia de DCNP en acetonitrilo, y (d) sólo **N1-1** y **SD**.

Las experiencias con los compuestos organofosforados **OP-1-4** mostraron los mismos resultados que la experiencia de **N1-1** y escuaridina

sólos debido a que no se forman los esteres fosfóricos por la falta de buenos grupos salientes en los sustratos organofosforados. Como ya se ha comentado, la respuesta observada se debe a la reacción entre los simulantes de agentes neurotóxicos y los grupos hidroxilo anclados en el soporte nanoparticulado que permite la formación de una densa monocapa de esteres de fosfato sobre la superficie de las nanopartículas que impide el acceso de la escuaridina a los grupos tiol. Para corroborar el mecanismo propuesto se preparó el sólido híbrido **N2** que fue funcionalizado únicamente con grupos tiol. La adición de una disolución del colorante escuaridina a una suspensión de **N2** en acetonitrilo induce una rápida decoloración de la disolución tanto en ausencia como en presencia de los simulantes empleados. Esto confirma el papel crucial de los grupos hidroxilo en la respuesta del material híbrido sensor.

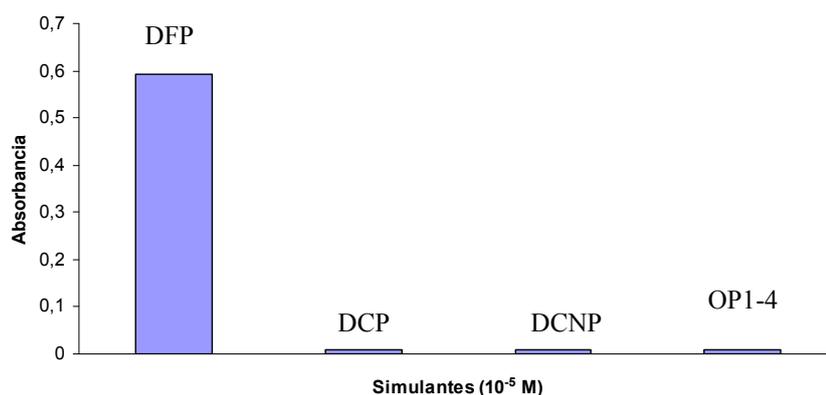
A continuación se estudió el efecto de la concentración de los distintos simulantes empleados. Para ello se realizaron múltiples experiencias en cada una de las cuales se mezclaron 19.8 mL de una disolución de cada simulante con una determinada concentración con 0.2 mL de una suspensión acuosa de las nanopartículas **N1-1** (tamponada a pH 7.0 con tampón fosfato 0.01 M). Después se tomaron alícuotas de 2.7 mL de cada disolución y se mezclaron con 0.15 mL de una disolución del colorante escuaridina en acetonitrilo ( $1.0 \times 10^{-4}$  M). Transcurridos 10 minutos se midió la absorbancia a 643 nm. La **Figura 5.10** muestra que la reacción entre los simulantes y los grupos hidroxilo modula la reactividad entre la escuaridina y los grupos tiol y que esta modulación depende, como cabría esperar, de la concentración de los simulantes.



**Figura 5.10** Absorbancia a 643 nm (banda de la escuaridina) para suspensiones de **N1-1**, **SD**, y su variación con la concentración de DFP, DCP, DCNP, OP-2 y los otros compuestos organofosforados (OP-1, OP-3 y OP-4).

Como se puede observar en la **Figura 5.10** la reacción entre los grupos tiol anclados en la superficie de las nanopartículas **N1-1** y la escuaridina (**SD**) está muy inhibida en presencia de los simulantes DFP, DCP y DCNP mientras que la adición de OP-2 dificulta parcialmente la reacción a concentraciones mayores de 0.003 M. La presencia de los otros simulantes (OP-1, OP-3 y OP-4) no provoca ningún efecto incluso a altas concentraciones.

La **Figura 5.10** también muestra que la respuesta cromogénica para el DFP difiere claramente de las que se obtiene al adicionar DCP y DCNP porque la inhibición selectiva de la reacción entre los grupos tiol y el colorante escuaridina se observa incluso a bajas concentraciones del simulante. La **Figura 5.11** muestra la absorbancia de la disolución de escuaridina a 643 nm en presencia de todos los simulantes cuando se evaluaron a una concentración  $1.0 \times 10^{-5}$  M. Sólo el DFP fue capaz de inhibir parcialmente la reacción entre la escuaridina con los grupos tiol a concentraciones bajas, mientras que la disolución se hizo incolora en presencia de DCP, DCNP y los otros simulantes empleados (OP1-4). Este efecto esta claramente relacionado con el hecho de que el DFP tiene grupos isopropilo, más voluminosos que los etilo presentes en el DCP y el DCNP. Este mayor volumen hace que la inhibición de la reacción entre la escuaridina y el tiol se observe a concentraciones más bajas cuando se emplea el DFP.

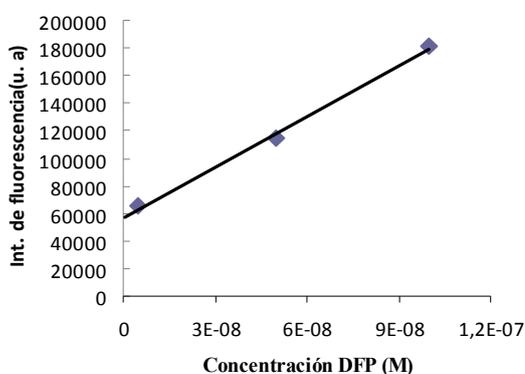


**Figura 5.10** Absorbancia a 643 nm (banda de la escuaridina) en suspensiones de **N1-1** junto con escuaridina para concentraciones  $1.0 \times 10^{-5}$  M de los simulantes DFP, DCP, DCNP y OP1-4 en acetonitrilo.

Para probar la aplicabilidad de las nanopartículas **N1-1** en la detección y cuantificación de agentes nerviosos en muestras reales se realizaron experimentos en mezclas acuosas. Se confirmó que las

propiedades de detección del soporte **N1-1** se mantenían en presencia de un 10% de agua. Bajo estas condiciones experimentales el límite de detección para el DFP obtenido mediante medidas de fluorescencia ( $\lambda_{\text{exc}} = 643 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 670 \text{ nm}$ ) fue de  $5.0 \times 10^{-6} \text{ M}$ .

Aunque los simulantes de agentes nerviosos podían ser detectados mediante cambios de color con las nanopartículas **N1-1**, se comprobó que empleando las nanopartículas **N1-2**, que contienen una menor cantidad de grupos funcionales (ver **Tabla 5.1**), se mejoraban significativamente los límites de detección. La respuesta cromogénica de las suspensiones de las nanopartículas **N1-2** fue claramente semejante a la observada con las nanopartículas **N1-1**. Así, la presencia de los simulantes de agentes nerviosos inhibía la reacción entre la escuaridina y los grupos tiol. Sin embargo, las suspensiones de **N1-2** que contenían hasta un 10 % de agua respondieron a los simulantes de agentes nerviosos, como se muestra en la **Figura 5.11**, con un límite de detección de  $1.0 \times 10^{-8} \text{ M}$  (2 ppt) mediante medidas de fluorescencia.



**Figura 5.11** Curva de calibrado para la detección de DFP con las nanopartículas **N1-2**.

El material **N1-2** también mostró respuesta colorimétrica frente a los simulantes DFP, DCP y DCNP incluso en presencia de un 50 % de agua y con un bajo límite de detección de  $5.0 \times 10^{-7} \text{ M}$  para el DFP mediante medidas de fluorescencia (100 ppt). Este límite de detección es comparable a los obtenidos mediante polímeros de impresión molecular (50 ppt)<sup>55</sup> o polímeros luminiscentes de europio (7-100 ppt)<sup>56</sup> y son mucho menores que los límites de detección medidos para sondas moleculares fluorogénicas para DFP (entre 6 ppb y 15 ppm).<sup>44-53</sup>

Finalmente se estudió la respuesta de suspensiones de las nanopartículas **N1-2** (acetonitrilo-agua 1:1 v/v) en presencia de especies

interferentes (alquilantes y acilantes) que puedan reaccionar con los grupos hidróxilo o tiol presentes en la superficie de las nanopartículas. Se comprobó que la presencia de sulfato de dimetilo, anhídrido acético o cloruro de acetilo (en concentraciones  $1.0 \times 10^{-5}$  M) no indujeron cambios apreciables en la curva de respuesta cinética de la reacción del material **N1-2** y el colorante escuaridina.

#### 5.4.2 Estudios de detección en fase vapor.

Aunque el protocolo de detección descrito anteriormente puede resultar laborioso para ciertas aplicaciones se evaluó también la posibilidad de utilizar un material silíceo bifuncionalizado depositado sobre una lámina de tereftalato de polietileno (PET) para la detección de agentes de guerra química en fase vapor. Las tiras reactivas fueron preparadas sumergiendo una placa de cromatografía (18 cm x 18 cm) de Silicagel 60 F<sub>254</sub> (Merck) en un vaso de precipitados de 1L, conteniendo 750 mL de acetonitrilo con 1.17 mmol del dialcohol [bis(2-hidroxietil)amino]propiltrióxido de silicio (0.5926 mL) y 0.233 mmol de mercaptopropiltrióxido de silicio (56.29 mL), dejándolo reaccionar a temperatura ambiente durante 72h. Estas tiras reactivas fueron caracterizadas utilizando procedimientos estándar. El contenido de tiol y grupos hidroxilo fue determinado mediante análisis elemental, microscopia electrónica de barrido (SEM) y medidas termogravimétricas, resultando ser de 0.045 y 0.226 mmol/g SiO<sub>2</sub> respectivamente. Teniendo en cuenta el contenido orgánico y la superficie específica de las tiras reactivas (520 m<sup>2</sup>/g), la fracción ocupada por el tiol y el dialcohol es de 0.56 moléculas/nm<sup>2</sup>, estando a una distancia de 17.8 Å. Para realizar los estudios que se describen a continuación la placa de cromatografía se cortó en pequeñas tiras de 1 x 2 cm.

Con la finalidad de corroborar que la reactividad de los grupos hidroxilo presentes en las tiras reactivas seguía siendo la misma que en disolución, se realizaron estudios de microscopia electrónica de barrido (SEM), estimando el contenido de fósforo presentes en las tiras una vez expuestas en atmósfera de fluorofosfato de diisopropilo (DFP). Se estimó un contenido de 0.15 mmol/g SiO<sub>2</sub>, corroborando que el 66% de los grupos hidroxilo habían reaccionado con el simulante.

Los ensayos se realizaron exponiendo dichas tiras reactivas a una atmósfera de aire con una concentración de DFP de 5 ppm durante 15 minutos. Después se sumergió la tira reactiva en una disolución de la escuaridina **SD** ( $2.6 \times 10^{-6}$  M) en acetonitrilo y se observó que la disolución de escuaridina permanecía de color azul al contrario que sucedía si se sumergía dicha tira sin haber estado expuesta a la atmósfera de aire que

contenía 5 ppm de DFP (**Figura 5.12**), ya que en este caso la disolución decoloraba por la reacción entre el colorante (**SD**) y los grupos tiol.

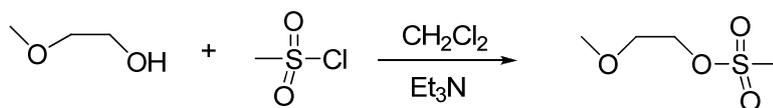


**Figura 5.12** Fotografía de las tiras reactivas (1 x 2 cm) sumergidas en una disolución de escuridina ( $2.6 \times 10^{-6}$  M) en acetonitrilo. La tira sumergida en el vial de la izquierda fue previamente expuesta a aire que contenía una concentración de DFP de 5 ppm. La tira sumergida en el vial de la derecha fue sumergida directamente en la disolución de escuridina.

Estos resultados indican que el DFP es capaz de reaccionar con los grupos alcohol anclados en las partículas de sílice que están depositadas sobre la película de PET, abriendo así la posibilidad de utilizar este material o alguno similar como dosímetro para la evaluación de ambientes que hayan podido sufrir una exposición de vapores de agentes nerviosos.

## 5.5 Procedimientos experimentales

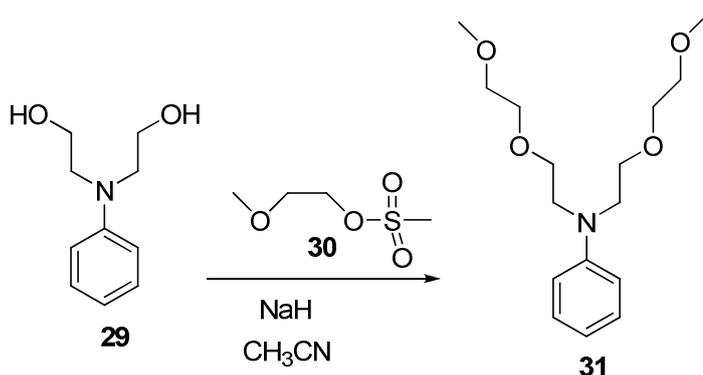
### Síntesis de 2-metoxietilmetano sulfonato



En un matraz esférico de 500 mL provisto de agitación magnética, embudo de adición de presión compensada, atmósfera de Ar y baño de hielo se disuelven 7.91 mL de 2-metoxietanol (99.8%) (0.1 mol) y 41.8 mL de trietilamina (0.3 mol) en 150 mL de diclorometano seco. Se agita la mezcla durante 10 minutos y a continuación se adicionan, gota a gota, a 0 °C, durante 30 minutos y mediante el embudo de adición de presión compensada 15.8 mL de cloruro de metansulfonilo (0.2 mol) disueltos en 30 mL de diclorometano seco. Después de finalizar la adición la mezcla 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 agita durante 30 minutos y se separan las fases. La fase acuosa se extrae con diclorometano (3 × 20 mL) y la reunión de fases orgánicas se lava con salmuera (3 × 30 mL), se seca con MgSO<sub>4</sub> anhidro, se filtra y se concentra a presión reducida en rotavapor. El producto se obtiene puro (15.42 g, 100%) en forma de aceite de color amarillo.

<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 4.33 – 4.28 (m, 2H), 3.63 – 3.58 (m, 2H), 3.34 (s, 3H), 3.01 (s, 3H).

<sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 70.14, 69.06, 58.85, 37.44.



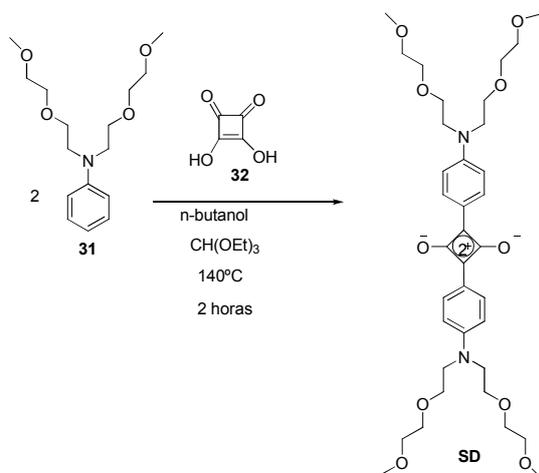
En un matraz de 250 mL de tres bocas provisto de atmósfera de Ar, agitación magnética, embudo de adición de presión compensada y refrigerante se disuelven 3.76 g de *N*-fenildietanolamina (97%) (20.1 mmol) en 70 mL de acetonitrilo anhidro. A continuación y a temperatura ambiente se añaden, en pequeñas porciones y por espacio de 60 minutos 1.21 g de NaH (50.25 mmol). Una vez formada la sal disódica de la *N*-fenildietanolamina se calienta a reflujo y se adiciona mediante el embudo de adición de presión compensada 7.75 g de 2-metoxietilmetano sulfonato (50.25 mmol) disueltos en 20 mL de acetonitrilo anhidro. A continuación se deja 16 horas a reflujo. Pasado este tiempo se filtra el crudo, el sólido se lava con abundante acetonitrilo y la reunión de fases orgánicas se concentra en el rotavapor. Se obtiene un aceite de color naranja que se purifica mediante cromatografía en columna empleando alúmina como fase estacionaria y diclorometano como fase móvil. Se obtienen 4.5g (75%) del producto en forma de aceite anaranjado.

<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.17 (dd, *J* = 8.9, 7.2 Hz, 2H), 6.69 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 6.63 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 3.65 – 3.52 (m, 16H), 3.35 (s, 6H).

<sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 147.58, 129.08, 115.84, 111.53, 71.81, 68.90, 68.28, 58.88, 50.76.

<sup>133</sup> J. V. Ros-Lis, R. Martínez-Mañez, F. Sancenón Galarza, J. Soto, M. Spieles, K. Rurack, *Chem. Eur. J.* **2008**, 14, 10101.

**Síntesis de 4,4'-[bis-{*N,N*-bis(2-(2-metoxietoxi)etil)-amino}fenil]escuaridina (SD)**



En un matraz esférico de 100 mL provisto de agitación magnética, atmósfera inerte de Ar y refrigerante de reflujo se disuelve *N,N*-bis(2-(2-metoxietoxi)etil)anilina (**31**) (300 mg, 1 mmol) en 11 mL de n-BuOH y se añade ácido estuárico (**32**) (58 mg, 0.5 mmol). Sobre esta mezcla se añade trietilortoformiato (1.38 mL, 8.26 mmol). Se calienta a 140 °C durante 2 horas. Transcurrido este tiempo se deja enfriar y se adiciona sobre la disolución de color azul 70 mL de hexano. El sólido formado se aísla por filtración obteniéndose en forma de cristales 67 mg (20%) del producto **SD** puro.

<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, DMSO) δ 8.12 (d, *J* = 9.2 Hz, 4H), 7.02 (d, *J* = 9.4 Hz, 4H), 3.76 (t, *J* = 5.3 Hz, 8H), 3.64 (t, *J* = 5.4 Hz, 8H), 3.53 (dd, *J* = 5.8, 3.4 Hz, 8H), 3.42 (dd, *J* = 6.1, 3.3 Hz, 8H), 3.23 (s, 12H).

<sup>13</sup>C RMN (75 MHz, DMSO) δ 186.45, 181.78, 154.10, 131.71, 119.02, 113.49, 71.39, 69.94, 68.00, 58.16, 50.88.

**HRMS (EI):** *m/z* calculada para C<sub>36</sub>H<sub>52</sub>N<sub>2</sub>O<sub>10</sub> [M]<sup>+</sup>: 673.3622 [M]<sup>+</sup> encontrada: 673.3684

## 6. Conclusiones y perspectivas

El desarrollo de sistemas de detección ópticos para agentes nerviosos, como se ha comentado en la Introducción de esta tesis doctoral, ha sufrido un gran auge en la última década debido al posible uso por parte de grupos terroristas de estas sustancias químicas altamente tóxicas. Los reactivos colorimétricos requieren una instrumentación por lo general económica y extensamente usada y ofrecen la posibilidad de detección “a simple vista” para una determinación rápida y semicuantitativa. El trabajo realizado en esta tesis doctoral ha permitido desarrollar nuevos receptores cromogénicos para agentes nerviosos que permiten el reconocimiento visual de dichas sustancias.

Así, en el **Capítulo 2** se han sintetizado reactivos cromogénicos para la detección de gases nerviosos aplicando un protocolo de reconocimiento basado en la modulación de un proceso de transferencia de carga mediante una reacción de ciclación intramolecular. Se ha comprobado que tres de los reactivos sintetizados son capaces de reconocer simulantes de gases nerviosos mediante un cambio de color en acetonitrilo y en mezclas acetonitrilo/agua. De cara a una posible aplicación de estos receptores en un sistema para monitorizar la presencia de estos gases nerviosos se han preparado dispersiones de los reactivos sintetizados en un soporte inorgánico (sílice). Estos materiales son capaces de detectar simulantes en

medios acuosos y en fase gas mediante un cambio de color. El sistema de recepción diseñado y evaluado con éxito que se describe en este capítulo ha sido y esta siendo empleado por otros miembros del grupo de investigación para el desarrollo de sondas fluorogénicas, cromogénicas y electroquímicas.

En el **Capítulo 3** se describe la síntesis y evaluación de reactivos cromogénicos para la detección de agentes nerviosos aplicando un protocolo de reconocimiento basado en la modulación de un proceso de transferencia de carga mediante la reacción de fosforilación de piridinas. Se ha comprobado que los reactivos sintetizados son capaces de reconocer simulantes de agentes nerviosos mediante un cambio de color en acetonitrilo y en mezclas agua/acetonitrilo. Uno de los reactivos sintetizados es capaz de reconocer específicamente el simulante del agente nervioso Tabún. Dicho reactivo inmovilizado en una membrana polimérica de poliuretano es capaz de detectar simulantes en fase gas. El sistema de recepción diseñado y evaluado con éxito que se describe en este capítulo puede ser empleado para el desarrollo de sondas fluorogénicas, cromogénicas y electroquímicas.

En el **Capítulo 4** se ha descrito una familia de reactivos colorimétricos que permiten la detección de agentes nerviosos mediante un nuevo sistema de reconocimiento. En este caso se trata de reactivos cromogénicos basados de diaril y triarilmetanotes. Estos receptores son incoloros ya que no hay conjugación entre los anillos aromáticos de su estructura. Al adicionar los simulantes de gases nerviosos se produce la fosforilación del hidroxilo y la posterior eliminación de un fosfato generando un carbocatión coloreado. Esto permite la detección visual de los simulantes de gases de guerra.

Finalmente, en el **Capítulo 5**, se ha preparado un material híbrido orgánico-inorgánico para la detección óptica de simulantes de gases nerviosos mediante el acceso competitivo de un colorante a una superficie. Para ello se funcionaliza la superficie de nanopartículas de sílice (18 nm de diámetro) con dos unidades: (i) una unidad reactiva como son grupos hidroxilo y (ii) un inhibidor colorimétrico como son los grupos tiol. En ausencia de simulantes, y al añadir a una suspensión de las nanopartículas bifuncionalizadas un colorante azul (escuaridina), se produce una decoloración de la disolución debido a la reacción del colorante con el tiol. Al adicionar en primer lugar un simulante y después la escuaridina la disolución permanece azul ya que se inhibe la reacción entre el colorante y el tiol debido a la fosforilación de los hidroxilos. De esta forma se consigue detectar visualmente los simulantes de gases nerviosos. El material híbrido también ha sido empleado con éxito en para la detección de estas especies en fase gas.

