

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR
D'ENGINYERIA AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



SÍNTESIS DE PERILENODIIMIDAS SOLUBLES EN AGUA COMO SENSORES FLUORESCENTES

TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

ALUMNO: PEDRO MONTES NAVAJAS

TUTORA ACADÉMICA: MARÍA JOSÉ BAÑULS POLO

COTUTORA EXTERNA: ÁNGELA SASTRE SANTOS

CURSO ACADÉMICO 2016-2017

VALENCIA, 23 DE JULIO DE 2017



RESUMEN

SÍNTESIS DE PERILENODIIMIDAS SOLUBLES EN AGUA COMO SENSORES FLUORESCENTES

Una de las herramientas más utilizadas de la Biotecnología son las moléculas sonda fluorescentes que permitan extraer información analítica, no sólo cualitativa sino sobre todo cuantitativa, de diferentes procesos biológicos. Desde el punto de vista químico, todos estos compuestos presentan unas características fisicoquímicas especialmente apropiadas para cada aplicación concreta, pero todas ellas deben presentar una alta solubilidad en medios acuosos y fluidos biológicos. En este sentido, la búsqueda de nuevos quimiosensores debe enfocarse, por un lado, al diseño y síntesis de moléculas altamente fluorescentes capaces de modificar sus propiedades fotofísicas al interactuar con analitos de importancia biológica y, por otro lado, aumentar su hidrosolubilidad y selectividad por los compuestos diana deseados. Por todo ello, la familia de derivados de perileno en general y las perilenodiimidias en particular presentan estos requisitos para poder ser aplicados en sistemas de detección biotecnológicos. Así, se pretende **sintetizar una perilenodiimida bifuncionalizada mediante la condensación de dos unidades perileno monoanhídrido diéster con cadenas pegiladas derivadas del etilenglicol que, por un lado, aumenten la solubilidad de la molécula en medios biológicos y, por otro lado, sirven para interactuar con cationes fisiológicamente importantes debido a interacciones con dichas cadenas.**

Palabras clave: Perilenodiimidias, Fluorescencia, Sensor, Funcionalización.

Alumno: Pedro Montes Navajas

Valencia, 23 de Julio de 2017

Tutora académico: Dra. María José Bañuls Polo

Cotutora externa: Dra. Ángela Sastre Santos

ABSTRACT

SYNTHESIS OF WATER-SOLUBLE PERYLENE-DIIMIDES AS FLUORESCENT SENSORS

One of the most used tools of biotechnology are fluorescent probe molecules which can extract, not only qualitative but mostly quantitative analytical information, about different biological processes. From the chemical point of view, all these compounds have the appropriate physicochemical features for each particular application, but all of them should have a high solubility in aqueous media and biological fluids. As a result, the search for new chemosensors should focus on the one hand, on the design and synthesis of highly fluorescent molecules capable to modify their photophysical properties at the time they interact with analytes of biological significance and, on the other hand, increase their water solubility and selectivity for desired target compounds. Therefore, the family of perylene derivatives in general and perylene-diimides in particular present these requirements to be applied in biotechnological systems detection. Thus, it is intended to **synthesize a bifunctionalized perylene-diimide by condensing two units of perylene-monoanhydride-diester with pegylated chains derived from ethylene glycol in order to, on the one hand, increase the solubility of the molecule in biological media and, on the other hand, serve to interact with physiologically important cations due to interactions with such chains.**

Keywords: Perylene-diimides, Fluorescence, Sensor, Functionalization

Student: Pedro Montes Navajas

Valencia, July 23rd 2017

Academic tutor: Dra. María José Bañuls Polo

External cotutor: Dra. Ángela Sastre Santos

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	PÁGINA
1. INTRODUCCIÓN	
1.1. Importancia de los sensores en Biotecnología	1
1.2. Diseño y síntesis de moléculas biosensoras	3
1.3. Moléculas de la familia de los Perilenos	5
1.4. Sensores biológicos basados en derivados de Perilenos	7
2. OBJETIVOS	11
3. MATERIALES Y MÉTODOS	
3.1. Materiales	
3.1.1. Reactivos	12
3.1.2. Instrumentación	12
3.2. Métodos	
3.2.1. Síntesis del bromuro del dietilenglicol monoetiléter	13
3.2.2. Síntesis del tosilato del dietilenglicol monoetiléter	14
3.2.3. Síntesis del perilenotetraéster del dietilenglicol monoetiléter	15
3.2.4. Síntesis del perilenomonoanhídridodiéster del dietilenglicol monoetiléter	16
3.2.5. Síntesis de la bisperilenomonoimida derivada del 1,3-diaminobenceno y el perilenomonoanhídridodiéster del dietilenglicol monoetiléter	17
3.2.6. Determinación de rendimientos cuánticos de fluorescencia	18
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
4.1. Síntesis y caracterización del bromuro del dietilenglicol monoetiléter	19
4.2. Síntesis y caracterización del tosilato del dietilenglicol monoetiléter	20
4.3. Síntesis y caracterización del perilenotetraéster del dietilenglicol monoetiléter	21
4.4. Síntesis y caracterización del perilenomonoanhídridodiéster del dietilenglicol monoetiléter	26
4.5. Síntesis y caracterización de la bisperilenomonoimida	29
4.6. Caracterización de las propiedades fotofísicas de los derivados de perileno sintetizados en diferentes disolventes	32
5. CONCLUSIONES	36
6. BIBLIOGRAFÍA	37

ÍNDICE DE FIGURAS Y ESQUEMAS

PÁGINA

1. INTRODUCCIÓN

Figura 1. Estructura esquemática y tipos de quimiosensores dependiendo de su modo de actuación	1
Figura 2. Ejemplos de estructuras químicas de diferentes receptores artificiales	3
Figura 3. Estructuras químicas de diferentes familias de compuestos orgánicos empleados como quimiosensores cromo- y fluorogénicos en sistemas de detección en Biotecnología	5
Figura 4. Estructura química de derivados de perileno más importantes en la síntesis de compuestos orgánicos policíclicos condensados para diferentes aplicaciones	6
Figura 5. Ejemplos de estructuras químicas derivadas de perileno diseñadas y sintetizadas para la detección de diferentes analitos de importancia biológica	8

2. OBJETIVOS

Esquema 1. Secuencia de reacciones químicas diseñadas para obtener la perilendiimida sensora fluorescente deseada	11
---	----

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Esquema 2. Bromación del éter monoetílico del etilenglicol para obtener el 1-(2-bromoetoxi)-2-(2-metoxietoxi)etano	13
Esquema 3. Tosilación del éter monoetilico del etilenglicol para obtener el 2-(2-etoxietoxi)etil-4-metilbencenosulfonato	14
Esquema 4. Condensación de los derivados sintetizados con PDA para proporcionar el tetrakis(2-(2-etoxietoxi)etil)perileno-3,4,9,10-tetracarboxilato P3 ..	15
Esquema 5. Formación del perilenumonoanhídridodiéster P4 derivado del tetrakis(2-(2-etoxietoxi)etil)perileno-3,4,9,10-tetracarboxilato	16
Esquema 6. Condensación de P4 con 1,3-diaminobenceno para obtener la molécula objetivo P5	17

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Figura 6. Espectro de ^1H -RMN del 1-(2-bromoetoxi)-2-(2-metoxietoxi)etano	19
Figura 7. Espectro de ^1H -RMN del 2-(2-etoxietoxi)etil-4-metilbencenosulfonato	20
Figura 8. Espectro de ^1H -RMN del tetrakis(2-(2-etoxietoxi)etil)perileno-3,4,9,10-tetracarboxilato sintetizado	21
Figura 9. Espectros de masas de una muestra de P3 disuelta en cloroformo y depositada sobre matriz de ditranol, ionizada mediante MALDI-TOF y registrado en modo negativo	22

Figura 10. Espectros UV-Visible para disoluciones acuosas de concentración creciente del perilenotetraéster derivado del dietilenglicol monoetiléter	23
Figura 11. Espectros de fluorescencia para disoluciones acuosas de concentración creciente del perilenotetraéster derivado del dietilenglicol monoetiléter	25
Figura 12. Espectros UV-Visible y de Fluorescencia para disoluciones de concentración creciente del perilenotetraéster derivado del dietilenglicol monoetiléter en cloroformo	25
Figura 13. Espectros de masas de una muestra del perilenomonoanhídridodiéster P4 disuelta en cloroformo y depositada sobre matriz de ditranol, ionizada mediante MALDI-TOF y registrados en modo negativo o positivo en presencia de NaCl	26
Figura 14. Espectros de absorción UV-Visible del perilenomonoanhídridodiéster derivado del dietilenglicol monoetiléter P4 registrados en agua y cloroformo a diferentes concentraciones	27
Figura 15. Espectros de fluorescencia para disoluciones acuosas de concentración creciente del perileno P4	28
Figura 16. Espectros de fluorescencia para disoluciones de concentración creciente del perileno P4 en CHCl ₃	28
Figura 17. Espectro de ¹ H-RMN del bisperilenomonoimidadiéster P5 registrado en CDCl ₃ donde se indican las integrales relativas de cada una de las señales de los protones asignados	29
Figura 18. Espectros de masas del bisperilenomonoimidadiéster P5 en ausencia (izquierda) y presencia (derecha) de NaCl	30
Figura 19. Espectros de absorción y emisión de fluorescencia correspondientes a disoluciones del perileno P5 tanto en agua como cloroformo	31
Figura 20. Espectros de absorción y emisión de fluorescencia normalizados a sus máximos correspondientes registrados para disoluciones de los derivados de perilenos P3, P4 y P5 en cloroformo, etanol, agua y mezclas etanol:agua en proporción 8:2, 6:4 y 3:7	33
Figura 21. Representación del área bajo el espectro de fluorescencia frente a la absorción correspondiente a cada una de las disoluciones tanto del patrón como de los diferentes perilenos sintetizados disueltos en y en agua	34

ÍNDICE DE TABLAS

PÁGINA

1. INTRODUCCIÓN

2. OBJETIVOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 1. Datos espectroscópicos obtenidos en la caracterización del producto sintetizado P1	13
Tabla 2. Datos espectroscópicos obtenidos en la caracterización del producto sintetizado P2	14
Tabla 3. Datos espectroscópicos obtenidos en la caracterización del producto sintetizado P3	15
Tabla 4. Datos espectroscópicos obtenidos en la caracterización del producto sintetizado P4	16
Tabla 5. Datos espectroscópicos obtenidos en la caracterización del producto sintetizado P5	17

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 6. Datos espectroscópicos registrados en diferentes disolventes para los perilenos sintetizados	35
---	----

ÍNDICE DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

δ	En ^1H -RMN, desplazamiento químico
\varnothing	Diámetro de la columna de cromatografía
ϵ	En espectroscopía UV-Visible, coeficiente de extinción molar
Φ_{FL}	En espectroscopía de fluorescencia, rendimiento cuántico de fluorescencia
λ_{max}	En espectroscopía UV-Visible, longitud de onda de máxima absorción
λ_{em}	En espectroscopía de fluorescencia, longitud de onda de máxima emisión
C1	Compuesto sensor de cationes Hg^{2+}
C2	Compuesto sensor de cationes Cu^{2+}
C3	Compuesto sensor de hidroperóxidos de lípidos
C4	Compuesto sensor de especies ROS
C5	Agente de funcionalización de fosfolipasa
C6	Agente de funcionalización de proteínas marcadas con poli-His
C7	Compuesto sensor de la reducción del glutatión
C8	Compuesto sensor de la lisozima
d	En ^1H -RMN, doblete
dm	En ^1H -RMN, doble multiplete
DMAP	4-dimetilaminopiridina
EM	Espectrometría de masas
Grad	Pendiente de las rectas intensidad de fluorescencia frente a densidad óptica
HOMO	Orbital molecular más alto ocupado
J	En ^1H -RMN, constante de acoplamiento
LUMO	Orbital molecular más bajo desocupado
m	En ^1H -RMN, multiplete
$[\text{M}^+]$	En EM, pico molecular detectado en modo positivo
$[\text{M}^-]$	En EM, pico molecular detectado en modo negativo
$[\text{M-H}^+]$	En EM, pico molecular protonado detectado en modo positivo
$[\text{M-Na}^+]$	En EM, aducto del pico molecular y un catión Na^+ detectado en modo positivo
$[\text{M-2NaCl-Na}^+]$	En EM, aducto del pico molecular, dos unidades de NaCl y un catión Na^+ detectado en modo positivo
MALDI-TOF	Ionización/desorción láser asistida por matriz-Tiempo de vuelo
n	Índice de refracción
PDA	Perilenodianhídrido
PDI	Perilenodiimida
PDI1	Perilenodiimida del 7-aminotridecano usada como patrón de fluorescencia
PMADE	Perilenomonoanhídridodiéster

PMIDE	Perilenomonoimidadiéster
PTE	Perilenotetraéster
q	En ^1H -RMN, cuadruplete
^1H -RMN	Resonancia magnética nuclear de núcleos de Hidrógeno
ROS	Especies reactivas de Oxígeno
S	En ^1H -RMN, singlete
t	En ^1H -RMN, triplete
TLC	Cromatografía en capa fina
TMS	Tetrametilsilano
TS	Grupo tosilo (p-toluensulfonilo)

1. INTRODUCCIÓN

1.1. IMPORTANCIA DE LOS SENSORES EN BIOTECNOLOGÍA

La Biotecnología es un área multidisciplinar basada en la aplicación tecnológica de sistemas biológicos, organismos vivos o alguno de sus productos derivados para la obtención o modificación de productos o procesos de uso específico (Secretariat of the Convention on Biological Diversity, 2005). A pesar de que la aparición de esta denominación como nueva ciencia es relativamente reciente (Kennedy, 1991), muchos de sus fundamentos teóricos se han practicado desde hace miles de años en campos como la agricultura y la ganadería. No obstante, es con el surgimiento de las nuevas y poderosas técnicas de manipulación genética cuando la Biotecnología adquiere su máxima expansión hasta el momento. Sin embargo, muchas de las herramientas de uso común en muchos laboratorios biotecnológicos han estado clásicamente ligadas a disciplinas científicas pertenecientes a la Química, la Física o la Biología. Así, una de estas metodologías importadas de los químicos analíticos para muchas aplicaciones biotecnológicas diarias es el uso de sensores de moléculas de interés biológico.

El término Sensor hace referencia a cualquier dispositivo sensible a un cambio en alguna propiedad fisicoquímica del sistema estudiado (luz, temperatura, concentración, etc) y que transmite una señal a un instrumento de control o medida; sin embargo, este concepto tiene matices diferentes para un químico, ya que englobaría a cualquier molécula receptora que interaccione con un analito produciendo un cambio fácilmente detectable en una propiedad (Doong et al., 2005; Fang et al., 1999; Anslyn, 2007). En el caso concreto en el que el sensor analítico esté compuesto por un material biológico inmovilizado o en contacto con un sistema adecuado que convierte una señal bioquímica en una señal eléctrica cuantificable se ha acuñado el término Biosensor (Mehrotra, 2016).

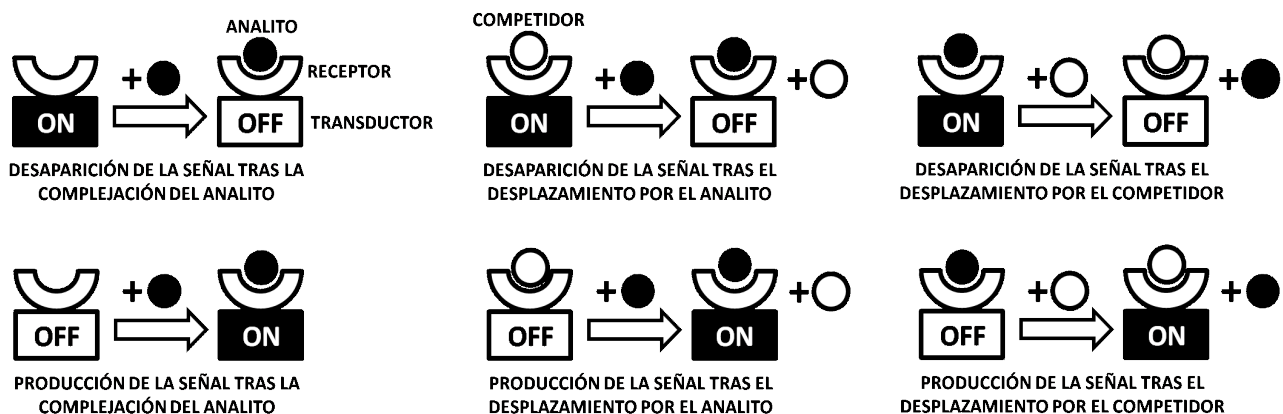


Figura 1. Estructura esquemática y tipos de quimiosensores dependiendo de su modo de actuación. En ella se representan tanto las partes de una molécula sensora prototípica (parte receptora y parte transductora), la sustancia diana para la cual está diseñado y un posible compuesto competidor por el sitio de unión del analito diana.

1. INTRODUCCIÓN

De forma esquemática, se podría decir que una molécula sensora está formado por dos partes: una denominada Receptor, que interactúa directamente con la molécula diana y es la responsable de la selectividad en la unión, y otra conocida como Transductor, capaz de convertir un determinado tipo de energía de entrada en otra diferente a la salida, y gracias al cual se produce una señal macroscópica medible debida a los cambios microscópicos que sufre la molécula sensora (Figura 1). Dependiendo de la naturaleza fisicoquímica de dicha señal, se pueden distinguir entre los sensores cromogénicos (Martínez-Mañez y Sacenon, 2003; Kim et al., 2011), fluorogénicos (Bergmann y Peppas, 2008; Chen et al., 2002) o electroquímicos (Fan et al., 2009) si es la absorción o emisión de luz o la interacción con la corriente eléctrica la que permite detectar, respectivamente, la presencia del analito diana.

La tecnología de moléculas marcadoras coloreadas y fluorescentes, en el que un compuesto cromo- o fluorogénico se combina con el objeto biológico para formar un complejo fácilmente detectable, ha sido ampliamente explotada en diferentes facetas de la Biotecnología debido, fundamentalmente, a que el mensaje del objeto biológico marcado se transfiere tanto cualitativa como cuantitativamente mediante la medida de la intensidad de la absorción de radiación o emisión de fluorescencia de una forma rápida, reproducible y con alta sensibilidad (Fei y Gu, 2009).

Con el desarrollo de la Biología Molecular, tanto los instrumentos ópticos como el diseño de moléculas sensoras empleados en Biotecnología ha sufrido un rápido desarrollo frente a los tradicionales marcadores biológicos radioactivos. Así, esta estrategia metodológica puede usarse para determinar diversos tipos de sustancias de interés biológico tanto dentro como fuera de las células, tales como contaminantes ambientales, fármacos, aminoácidos, moléculas quirales, nucleótidos. Se han empleado sondas fluorescentes para detectar las estructuras del ARN y del ADN, distinguir los ácidos nucleicos con diferente conformación, identificar el área activa de las proteínas o detectar su concentración a escala picomolar. Aplicaciones prácticas destacables de este abordaje son las técnica del Fluoroinmunoensayo, que se utiliza ampliamente para analizar proteínas, hormonas, antígenos virales y hibridaciones de ADN, o la Espectroscopia de Fluorescencia Inducida por Láser, la cual juega un papel importante en la identificación de células y fluidos corporales vivos, secuencias de bases de ADN y protómeros bacterianos (Wang y Peng, 2002). Sin embargo, su verdadera potencia como herramienta en Biotecnología se encuentra en la capacidad que tienen estos sensores para ser utilizadas en la identificación y el diagnóstico precoz en etapas tempranas de enfermedades y tratamientos de tumores malignos o en la detección de procesos celulares como la síntesis enzimática o la biosíntesis de proteínas, estudiar procesos de reparación de ADN dañado o la propia respuesta inmune (Chen et al., 2004).

1. INTRODUCCIÓN

1.2. DISEÑO Y SÍNTESIS DE MOLÉCULAS SENSORAS

El desarrollo de sensores químicos con un uso general en la detección y cuantificación de compuestos de interés biológico ha sido el objetivo de numerosos estudios básicos y aplicados de Química Orgánica, centrados principalmente en el diseño y síntesis de receptores artificiales. Así, la mayoría de sus aproximaciones han estado basadas durante mucho tiempo en el Principio de Fischer, esto es, centrando los recursos sintéticos en la consecución de receptores que tengan una respuesta fuerte y altamente selectiva para un compuesto biológico en particular (Modelo de llave-cerradura) (Palacios et al., 2007; Albert et al., 2000). Esta estrategia es especialmente apropiada cuando se requiere identificar un compuesto específico en presencia de interferencias preestablecidas en matrices sencillas; sin embargo, requiere típicamente un alto esfuerzo sintético y frecuentemente estos sensores muestran una solubilidad muy limitada en agua.

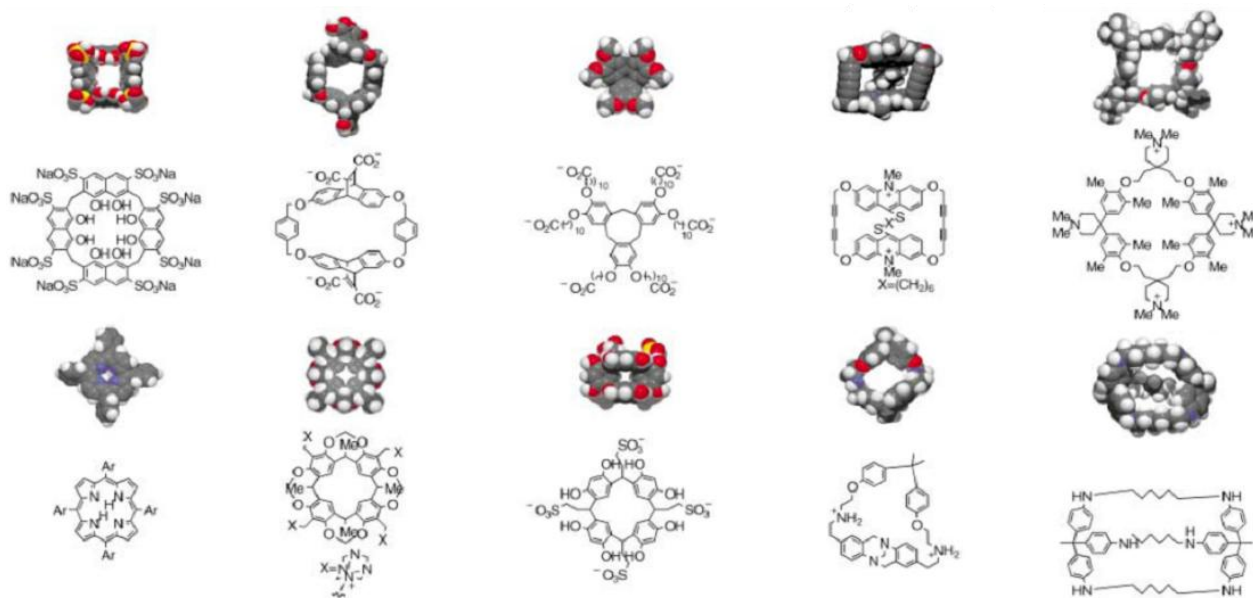


Figura 2. Ejemplos de estructuras químicas de diferentes receptores artificiales caracterizados por disponer de una cavidad especialmente diseñada para interactuar con analitos concretos.

La mayoría de los sitios de unión selectivos en la naturaleza están caracterizados frecuentemente por un alto grado de encapsulación del sustrato diana, lo cual hace que la incorporación total de las especies huésped en la cavidad de un hospedador sintético sea una fuente de inspiración para muchos químicos orgánicos (Schottel et al., 2008; Lehn, 1985; Gamez et al., 2007; Gale, 2006; Koybasyuk y Kraemer, 2004; Biros y Rebek, 2007). La búsqueda de estas estructuras con forma de cápsula que rodeen parcial o totalmente al huésped permitiría la preparación de receptores sintéticos con cavidades (semi)cerradas formadas por interacción entre dos o más componentes con grupos

1. INTRODUCCIÓN

funcionales complementarios. Como los macrociclos contienen cavidades intramoleculares delineadas por segmentos moleculares que pueden poseer varios sitios de unión y reacción, los aspectos más fascinantes de su química yacen en su habilidad para formar complejos de inclusión al incorporar en su interior sustratos. Así, el diseño y síntesis de estas moléculas receptoras ha dado como resultado una gran variedad de arquitecturas macro(poli)cíclicas que permiten el posicionamiento de los sitios de unión en las paredes de cavidades moleculares de modo que convergen hacia el sustrato, siendo éste último más o menos rodeado por el receptor, formando un complejo de inclusión (Figura 2) (MacGillivray y Atwood, 1999; Cram, 1988; Danil de Namor, 1990; Kilburn y Patel, 1994).

El concepto cardinal en el diseño de receptores es la organización, de forma que se seleccionen adecuadamente el tipo y número de sitios de unión a través de los cuales interacciona con el sustrato; el tipo, posición y número de sitios de unión tienen una influencia directa sobre la fuerza de la asociación ligando-sustrato y deben disponerse de forma apropiada en la estructura orgánica para asegurar un tamaño de la cavidad que se adapte al sustrato. Con estos principios, se obtienen complejos altamente estables cuando el ligando contiene el máximo de sitios de unión apropiados rodeando al sustrato. Por otro lado, la naturaleza de la estructura orgánica en cuanto a lipofilia o hidrofilia juega un papel fundamental en las características de solubilidad de los ligandos y sus complejos. De hecho, pueden unirse cadenas laterales al ligando para variar su solubilidad, de forma que la funcionalización con cadenas laterales alquílicas aumentará la lipofilia, y la unión de brazos con grupos funcionales permitirán la unión con otras entidades como polímeros o materiales orgánicos.

La mayoría de los receptores sintéticos descritos a lo largo de la historia han sido estudiados ampliamente en disolvente orgánicos. Este hecho entra en contradicción con que todos los eventos de reconocimiento molecular en la Naturaleza tengan lugar en medio acuoso. El agua proporciona el ambiente para la vida ya que media, regula y controla muchos procesos naturales (Henry, 2002a; Henry, 2002b; Mallamace et al., 1996). Por tanto, uno de los principales objetivos de la Química Orgánica es la creación de receptores sintéticos que tengan tanto gran afinidad como alta selectividad para la unión de huéspedes en agua al igual que lo hacen receptores naturales como las enzimas y los anticuerpos. Este tipo de biomoléculas muestra una complejación hospedador-huésped fuerte y selectiva a través de múltiples interacciones no covalentes débiles en medio acuoso. En contraste, el número de familias de hospedadores sintéticos que presentan el rango de afinidades, selectividades o actividades catalíticas de las biomoléculas, en disolución acuosa, está. Por esta razón, el diseño y síntesis de sensores artificiales solubles en medio acuoso presenta dos desafíos principales: cómo ganar mayor solubilidad en agua y cómo evitar, minimizar o explotar la fuerte interacción del agua en procesos biológicos. Así se

1. INTRODUCCIÓN

busca, en primer lugar, que el hospedador sea hidrosoluble, lo cual limita severamente el tipo de unidades estructurales constitutivas que pueden ser utilizados para su construcción, y además, deben elegirse aproximaciones e interacciones especiales que permita superar la influencia competitiva del agua (Oshovsky et al., 2007; Norgaard y Bjornholm, 2005; Bhattacharyya, 2003).

1.3. MOLÉCULAS DE LA FAMILIA DE LOS PERILENO

Los principales colorantes fluorescentes aplicados en el etiquetado biológico se dividen usualmente en dos clases principales en términos de las modalidades de marcaje entre el colorante fluorescente y los materiales biológicos marcados (Figura 3).

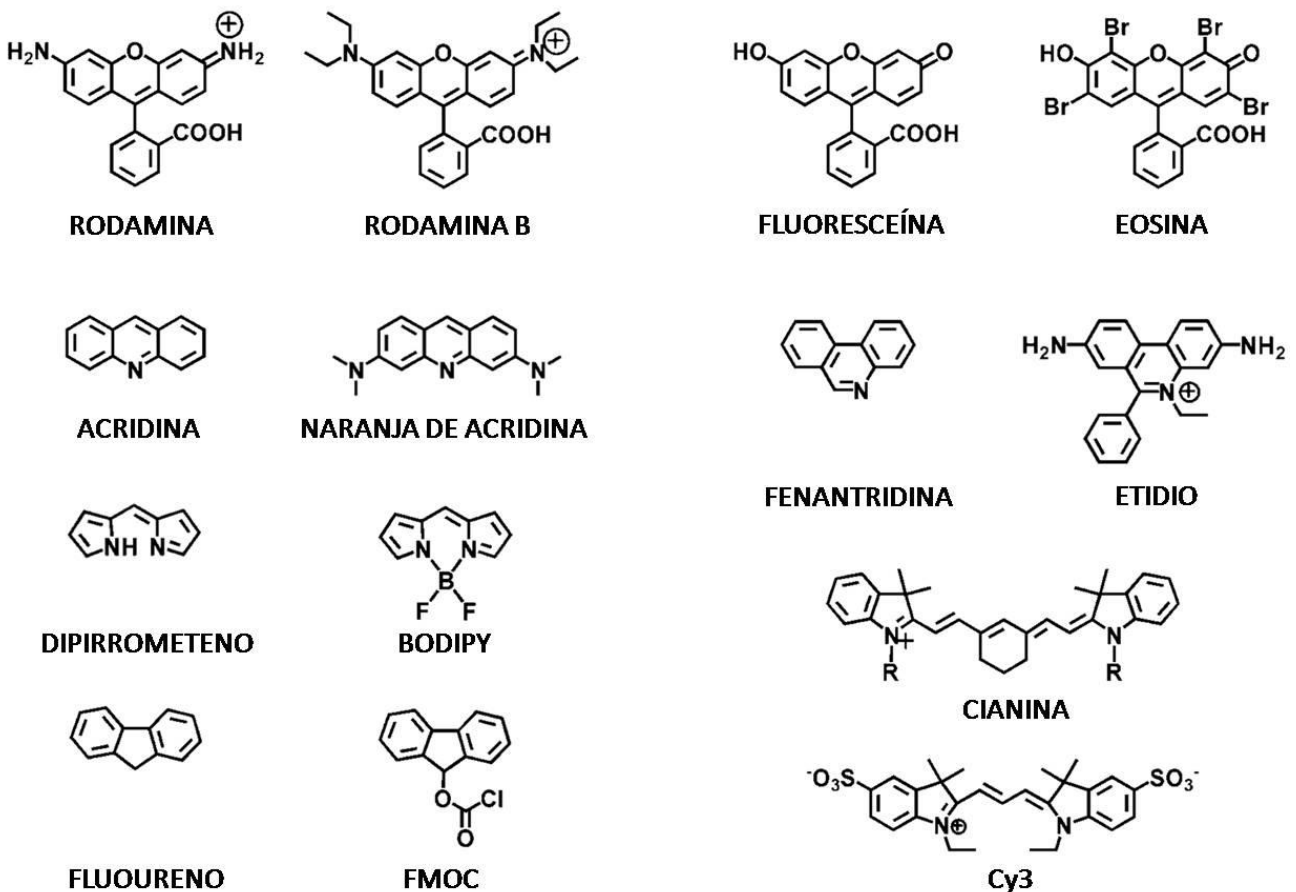


Figura 3. Estructuras químicas de diferentes familias de compuestos orgánicos empleados como quimiosensores cromo- y fluorogénicos en sistemas de detección dentro del campo de la Biotecnología.

Por un lado se encuentran aquellos tales como derivados de rodamina, fluoresceína, dipirrometeno, acridina y fluorenos, donde la unión de la sonda fluorescente unida al compuesto marcado se realiza mediante un grupo funcional reactivo. Por otro lado, la otra opción de marcaje es la inserción de sondas fluorescentes que se intercalan en la estructura de biomoléculas o bioestructuras

1. INTRODUCCIÓN

como proteínas, lípidos o el propio ADN por afinidad; tal es el caso de moléculas sensoras tan conocidas como aquellas basadas en estructuras de fenantrina o cianina. En comparación con los anteriores, esta última clase tiene muchas ventajas, tales como fluorescencia prácticamente nula antes de insertarse en la estructura biológica y sin interferencia de fondo en el proceso de detección. De este modo, cuando por ejemplo se insertan en una molécula de ADN, especialmente en forma de doble hélice, la intensidad de fluorescencia se puede mejorar más de 1000 veces, y más de 3000 veces cuando se inserta en ARN (Rye et al., 1992).

Los perilenos son moléculas orgánicas compuestas, formalmente, por dos anillos de naftaleno condensados a través de sus posiciones alfa y que incluye varios derivados carboxílicos como ésteres, anhídridos e imidas, con gran variedad de propiedades y aplicaciones e interconvertibles entre ellos mediante reacciones orgánicas relativamente sencillas. De entre todos ellos, los derivados más conocidos son las diimidias del ácido perileno-3,4,9,10-tetracarboxílico o más comúnmente denominadas Perilenodiimidias (PDI), debido a que la mayoría de ellos son pigmentos y colorantes orgánicos aceptores de electrones con altas estabilidad química, térmica y fotofísica (Herbst, 1997). De hecho, dependiendo de los sustituyentes y de las posiciones donde se introducen, se pueden variar propiedades como la solubilidad, la absorción UV-Visible o la fluorescencia (Li y Wonneberger, 2012; Huang y Marder, 2011).

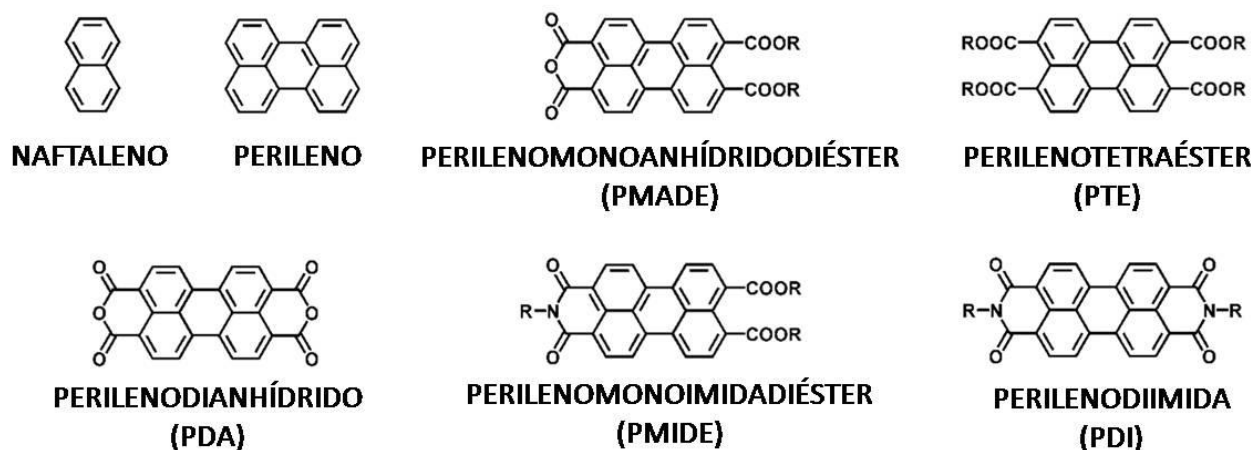


Figura 4. Estructura química de derivados de perileno más importantes en la síntesis de compuestos orgánicos policíclicos condensados para diferentes aplicaciones.

La mayoría de los miembros de la familia derivada del perileno presentan, debido a su estructura policíclica condensada. Esta propiedad estructural los hace bastante poco solubles en disolventes orgánicos por su tendencia a agregarse debido a interacciones π - π que llevan al apilamiento de los planos de los anillos aromáticos de diferentes unidades de perileno. Sin embargo, los enlaces C-C

1. INTRODUCCIÓN

que unen las dos unidades de naftaleno de los derivados de perileno permiten cierta distorsión de la estructura policíclica, lo cual es ventajosa para la solubilidad de los compuestos ya que tiene un fuerte impacto en las fuerzas intermoleculares de atracción tanto en estado sólido como en disolución. No obstante, se puede aumentar su solubilidad al introducir ciertos sustituyentes tanto en las posiciones internas del núcleo aromático como sobre el nitrógeno de las imidas. Normalmente esta funcionalización no afecta a la planariedad de la molécula, pero sí a la forma en la que se empaqueta, por lo que las variaciones en sus espectros de absorción pueden ser atribuidas a la forma en la que se ordenan las moléculas (Graser y Hädicke, 1980; Zugenmaier et al., 2000; Schenider et al., 2000).

Por otro lado, las propiedades espectroscópicas de todos estos compuestos están determinadas también por el sistemas de electrones π en su estructura policíclica condensada. Así, la mayoría de derivados de perileno son intensamente coloreados (debido a la alta deslocalización electrónica) y fuertemente fluorescentes (debido a la rigidez de los anillos aromáticos planos). Los espectros de absorción UV-visible de la mayoría de PDIs prácticamente no varían en función de los sustituyentes que se introducen en las posiciones imida debido, principalmente, a los nodos electrónicos situados sobre el átomo de nitrógeno tanto en el Orbital Molecular más Alto Ocupado (HOMO) como en el Orbital Molecular más Bajo Desocupado (LUMO) que reducen al mínimo el acoplamiento entre el anillo de PDI y los sustituyentes (Langhals et al., 1988a). Estos compuestos presentan intensas bandas de absorción con máximos alrededor de los 525 nm, de ahí su color rojo-naranja característico. Además, presentan rendimientos cuánticos de fluorescencia (ϕ_{FL}) cercanos a la unidad que no se ven afectados por la presencia de O_2 , lo cual los convierte en buenos patrones para usarlos como referencia a la hora de calcular el ϕ_{FL} de otros compuestos. Sin embargo, si los sustituyentes no se encuentran en el mismo plano que el núcleo de perileno, el rendimiento cuántico de fluorescencia disminuye drásticamente (Langhals et al., 1998b; Würthner, 2004).

1.4. SENSORES BIOLÓGICOS BASADOS EN DERIVADOS DE PERILENO

En general, los colorantes fluorescentes solubles en disolventes polares como el agua, son especialmente favorables para ser usados en análisis biológicos. Así, las propiedades de los perilenodiimidas son especialmente interesantes para el campo de la Biotecnología ya que presentan un gran potencial para análisis de alta sensibilidad debido a su intensa fluorescencia en el rango completo del visible con una elevada fotoestabilidad. Estas dos características, sobre todo, han contribuido a la aplicación de los derivados de perileno en la detección selectiva de analitos de importancia biológica (Figura 5).

1. INTRODUCCIÓN

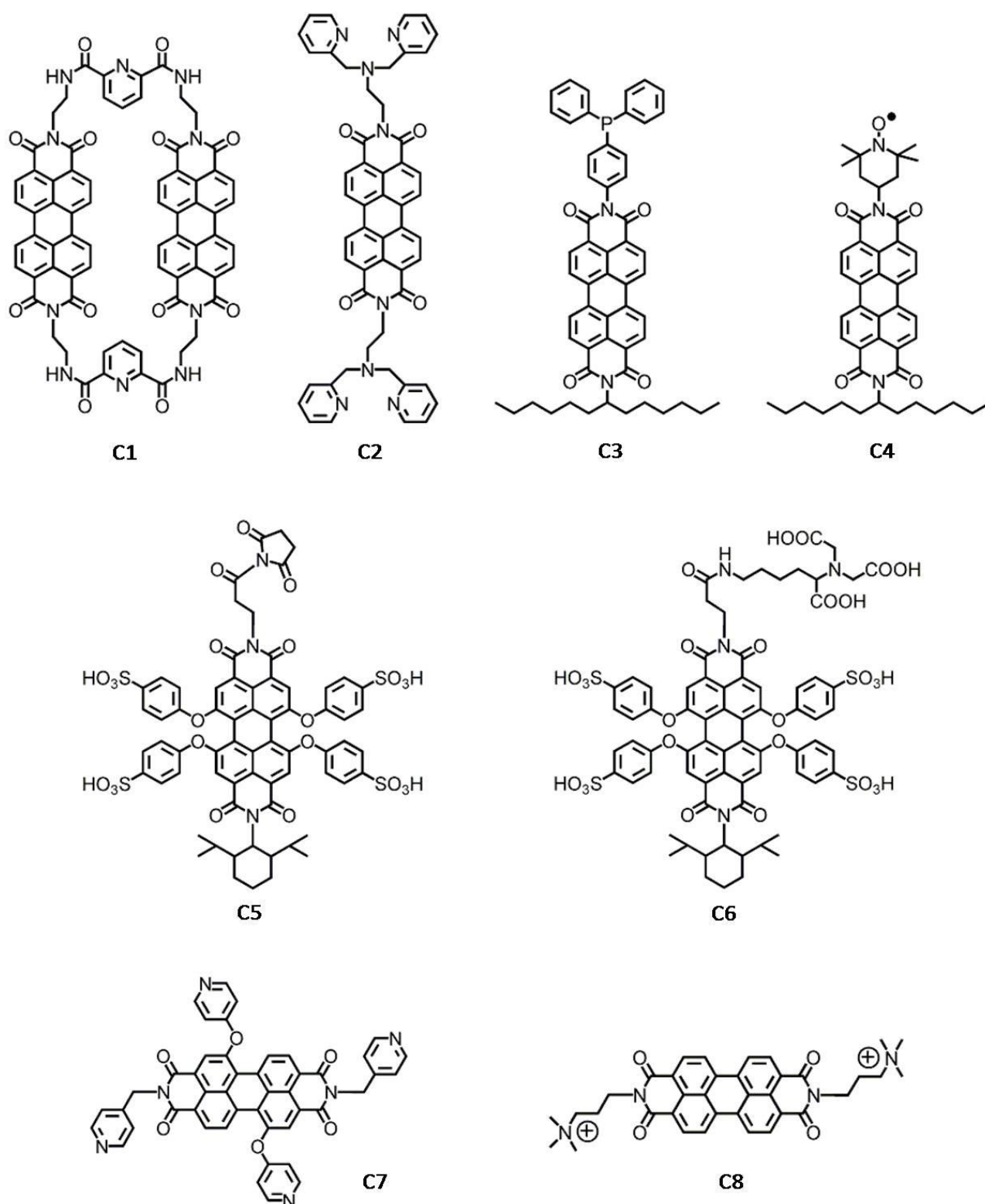


Figura 5. Ejemplos de estructuras químicas derivadas de perileno diseñadas y sintetizadas para la detección de diferentes analitos de importancia biológica como cationes metálicos (C1 y C2), peróxidos lipídicos (C3) y especies ROS (C4), para la funcionalización de biomoléculas como proteínas (C5 y C6) o la detección de proteínas (C7 y C8).

1. INTRODUCCIÓN

Inicialmente se sintetizaron compuestos basados en unidades derivadas de perileno para la detección selectiva de iones como Hg^{2+} o Cu^{2+} . Por ejemplo, el compuesto C1, formado por dos fluoróforos PDI unidos por dos receptores no macrocíclicos de 2,6-bis(aminoetil)piridina, funciona como receptor de iones Hg^{2+} , llegando a un límite de detección de 10 nM, mediante un mecanismo de desactivación de la fluorescencia de las unidades de perileno: cuando este ión es reconocido por la molécula sensora, la fluorescencia a 365 nm aumenta a la par que la correspondiente a 557 nm se desactiva eficientemente (Feng, 2007). Otro ejemplo de sensores biológicos de iones basado en anillos de perileno sería el quimiosensor fluorescente C2 diseñado para la detección de Cu^{2+} , un ión cuya abundancia en ellos sistemas biológicos juega un importante papel en diferentes procesos fisiológicos. Este compuesto presenta dos unidades dipicoliletilenodiamina para el reconocimiento selectivo de este catión metálico, de forma que el sensor muestra coloración rosada cuando une Cu^{2+} . De este modo, el compuesto C2 funciona como un sensor dual colorimétrico y fluorimétrico de iones Cu^{2+} (Liwei et al., 2009).

No obstante, se ha visto que la incorporación de unidades de PDI en la estructura de moléculas sensoras también puede ser útil para la detección de diferentes biomoléculas. Así, el compuesto C3 muestra un reactivo fluorescente para la detección de hidroperóxidos de lípidos, los productos primarios de la peroxidación lipídica y unos marcadores importantes del estrés oxidativo, mediante una estrategia basada en una reacción oxidativa de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Soh et al., 2006; Soh et al., 2007; Ito et al., 2008). Otro ejemplo del uso de sensores basados en PDIs sería el compuesto C4, un quimiosensor para la detección de diferentes especies ROS como el radical hidroxilo (OH), particularmente reactivo y causante del daño a biomoléculas en sistemas celulares (Maki et al., 2009).

Por otro lado, se han aplicado unidades de PDI en la construcción de reactivos químicos para el marcaje de proteínas, un proceso importante para la elucidación de la función proteica. Así, se han descritos moléculas derivadas de perilenodiimida con un grupo éster succinimida (compuesto C5) o maleimida para el marcado covalente de proteínas como la fosfolipasa (Peneva et al., 2008a). También se han sintetizado sensores fluorescentes para el marcaje selectivo de proteínas de unión a etiquetas de Histidina (His-tags), uno de los marcadores de proteínas recombinantes más ampliamente utilizados en ingeniería genética. En este sentido, un ejemplo sería el compuesto C6, cuyas propiedades fotofísicas permanecen inalteradas cuando se une a Ni^{2+} , de forma que se puede aplicar a una gran variedad de proteínas recombinantes marcadas con polihistidinas (Peneva et al., 2008b). Finalmente, mencionar el compuesto C7 como ejemplo de sensor basado en PDI empleado para la detección de la reducción de glutatión; la fluorescencia de este compuesto es desactivada eficientemente cuando se une a

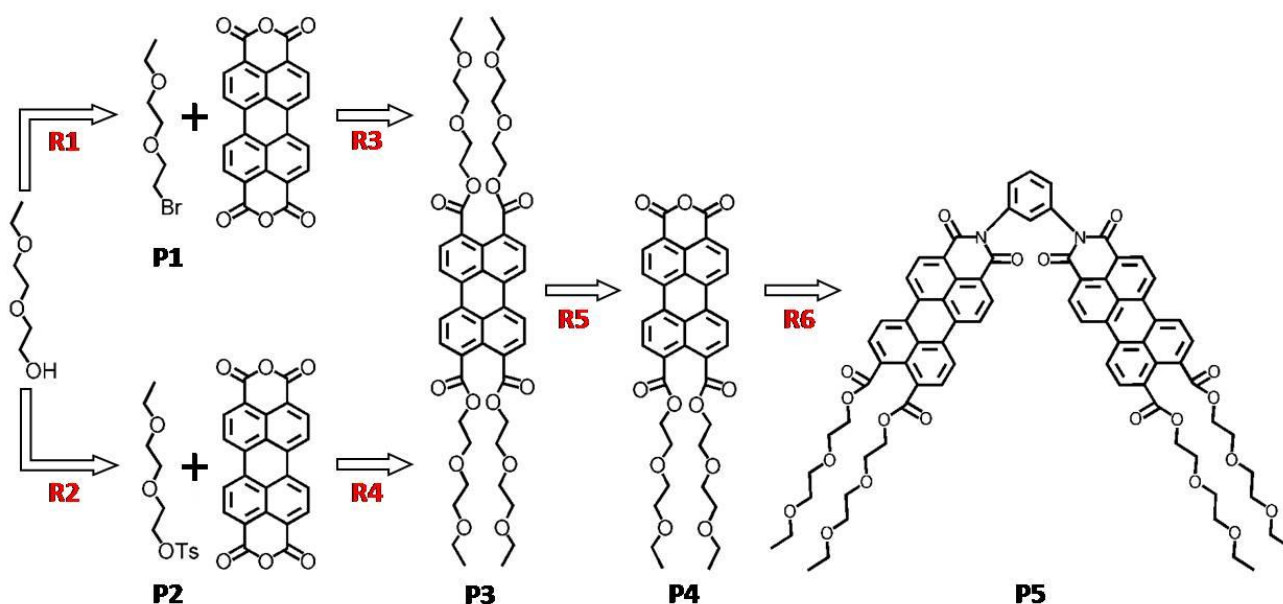
1. INTRODUCCIÓN

nanopartículas de oro, de forma que cuando se añade la glutatión reductasa, el glutatión oxidado puede ser reducido a glutatión reducido rápidamente y coordinarse a las nanopartículas de oro eficientemente, desplazando al compuesto C7 y, como resultado, producir su intensa fluorescencia (He et al., 2007).

Los sistemas de detección de proteínas también se han basado en la propiedad de agregación que presentan los PDIs. El compuesto C8 presenta una alta tendencia a agregarse a través de interacciones de apilamiento π - π debida a la estructura aromática del anillo de perileno (Wang, 2010). Sin embargo, las dos cadenas laterales cargadas positivamente producen interacciones repulsivas que tienden a disminuir dicho apilamiento. Como resultado de este balance, este sensor existe en equilibrio entre la forma agregada y monomérica libre en solución acuosa a temperatura ambiente, lo cual se puede aprovechar para la detección ultrasensible de lisozima, ya que se alcanza un límite de detección de 70 pM gracias a un mecanismo de desplazamiento: cuando se añade el aptámero anti-lisozima, su interacción electrostática repulsiva con el compuesto C8 disminuye la intensidad de su fluorescencia, de forma que cuando se adiciona la lisozima, su unión selectiva con el aptámero disminuye su interacción con el sensor y, como resultado, se recupera la forma monomérica de C8 con la consecuente recuperación de la fuerte fluorescencia del perileno.

2. OBJETIVOS

Tal como se ha presentado en la introducción, y dadas las excelentes características fotofísicas junto con sus propiedades fisicoquímicas altamente estables, los derivados de perileno son unos candidatos idóneos para el diseño y síntesis de moléculas sensoras de biomoléculas con interés en Biotecnología. Sin embargo, su insolubilidad en medio acuoso limita el número de miembros de esta familia de compuestos orgánicos susceptibles de una aplicación real a las determinaciones de fluidos biológicos. En este sentido, el presente trabajo final de grado pretende el diseño y síntesis de un dímero de perilenodiimida soluble en agua derivada de la funcionalización del núcleo perilenodianhídrido comercial con cadenas oxoetilénicas capaces, por un lado, de aumentar la hidrofilia de la molécula objetivo para poder aplicarse a la determinación biológica y, por otro lado, de unir covalentemente la parte estructural receptora de posibles cationes de importancia biotecnológica. De este modo, el esquema general de reacción que se diseñó sería el siguiente:



Esquema 1. Secuencia de reacciones químicas diseñadas para obtener la perilenodiimida sensora fluorescente deseada:

Reacción R1: Bromación del éter monoetilico del etilenglicol para obtener el bromuro P1.

Reacción R2: Tosilación del éter monoetilico del etilenglicol para obtener el alcohol tosilado P2.

Reacciones R3 y R4: Condensación de cada derivado P1 y P2 con el perilenodianhídrido para proporcionar el perilenotetraéster P3.

Reacción R5: Formación del perilenomonoanhídridodiestéer P4.

Reacción R6: Condensación del derivado P4 con 1,3-diaminobenceno para obtener el producto final P5.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES

3.1.1. REACTIVOS

Los reactivos utilizados, tanto orgánicos como inorgánicos, fueron suministrados por casas comerciales especializadas y se utilizaron, siempre que no se indique lo contrario, sin ningún tipo de purificación adicional. Los disolventes empleados se utilizaron en todos los casos en grado de pureza denominado "Síntesis" y, cuando se estimó necesario, se purificaron o secaron mediante los métodos habituales en cada caso.

El seguimiento de las reacciones de síntesis se llevó a cabo mediante Cromatografía en Capa Fina principalmente con el empleo de cromatofolios de gel de sílice (Tipo 60F254), aunque en algunos casos se necesitó el uso de cromatofolios de gel de Alúmina (Tipo 60A), ambas con un espesor de capa de 0.2 mm sobre soportes de aluminio o poliéster, respectivamente. Para el revelado se utilizó una lámpara UV-visible (254 y 365 nm) modelo Vilder Lourmat bien de forma directa sobre las placas de TLC o tras la aplicación de alguna solución de revelado como el Ácido Fosfomolíbico o Permanganato potásico.

La separación y purificación de los diversos productos se llevó a cabo mediante Cromatografía en Columna a baja presión en la que se emplearon como fases estacionarias SiO_2 (Tipo 60A, tamaño de partícula de 40-63 μm) o Al_2O_3 (Tipo neutra, tamaño de partícula de 63-200 μm) y como eluyente diferentes disolventes orgánicos, puros o en forma de mezclas, indicados en cada caso.

3.1.2. INSTRUMENTACIÓN

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (^1H -RMN) se registraron en un espectrómetro BRUKER AC-300 empleado cloroformo deuterado (CDCl_3) como disolvente y tetrametilsilano (TMS) como referencia interna en todos los experimentos. Los valores de los desplazamientos químicos δ se expresaron en ppm mientras que las constantes de acoplamiento se expresaron en Hz.

La determinación de las masas moleculares se llevó a cabo mediante Espectrometría de Masas utilizando un equipo de Desorción/Ionización Láser Asistida por Matriz acoplada a un detector de Tiempo de Vuelo (MALDI-TOF) usando como matrices 1,8,9-antraceno-1,8,9-triol (Ditranol), tanto en modo de ionización positivo como negativo.

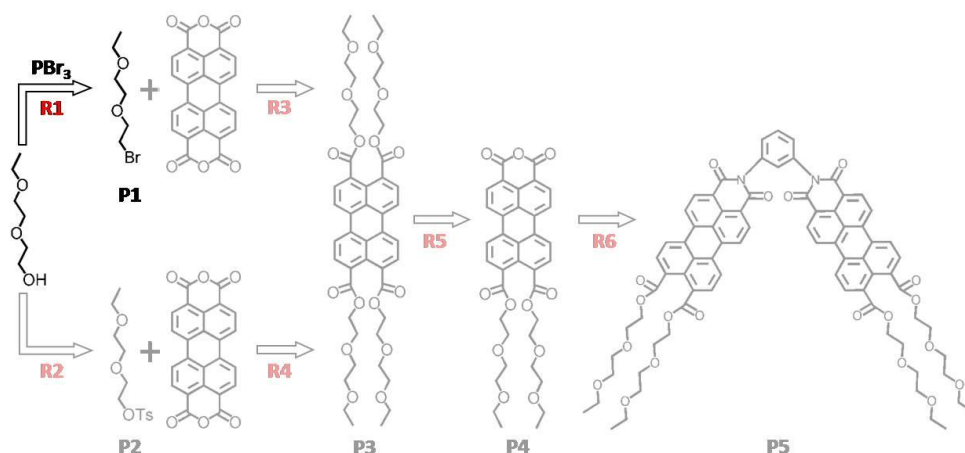
Los espectros de absorción UV-visible en disolución se registraron en un espectrofotómetro Helios Gamma, mientras que los espectros de emisión de Fluorescencia se obtuvieron mediante el empleo de un espectrofluorímetro PTI LPS-220B. En ambos casos se emplearon disolventes con pureza "Grado Espectroscópico" y una cubeta de cuarzo Suprasil de 1 cm de paso óptico.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2. MÉTODOS

3.2.1. SÍNTESIS DEL BROMURO DEL DIETILENGLICOL MONOETILÉTER (REACCIÓN R1)

Las condiciones de reacción y purificación fueron adaptadas de la publicación de Huesmann y colaboradores (2011). Se disuelven 10 mL (73.6 mmol) de dietilenglicol monoetiléter en 20 mL de cloroformo seco bajo atmósfera de Argón en un matraz de fondo redondo de tres bocas acoplado, por un lado, a un embudo de adición compensada y, por otro lado, a un sistema de condensación. La adición del 7 mL de PBr_3 (73.6 mmol) se realiza gota a gota bajo agitación magnética constante y en baño de hielo debido a que la reacción de bromación es muy exotérmica. Una vez completada la mezcla de reactivos se procede a calentar el matraz a reflujo durante toda la noche. Transcurrido el tiempo de reacción, la mezcla se enfría a temperatura ambiente antes de añadirla sobre un baño con hielo y neutralizarla con 150 mL de NaOH 1 M. La fase orgánica resultante se extrae tres veces con 150 mL de agua destilada, una cuarta vez con 150 mL de una disolución saturada de NaCl y se procede a secarla sobre Na_2SO_4 anhidro. El producto final 1-(2-bromoetoxi)-2-(2-metoxietoxi)etano (P1) se obtiene con un rendimiento del 93% (13.7 g) en forma de líquido incoloro viscoso tras la evaporación del disolvente a vacío.



Esquema 2. Bromación del éter monoetilico del etilenglicol para obtener el 1-(2-bromoetoxi)-2-(2-metoxietoxi)etano.

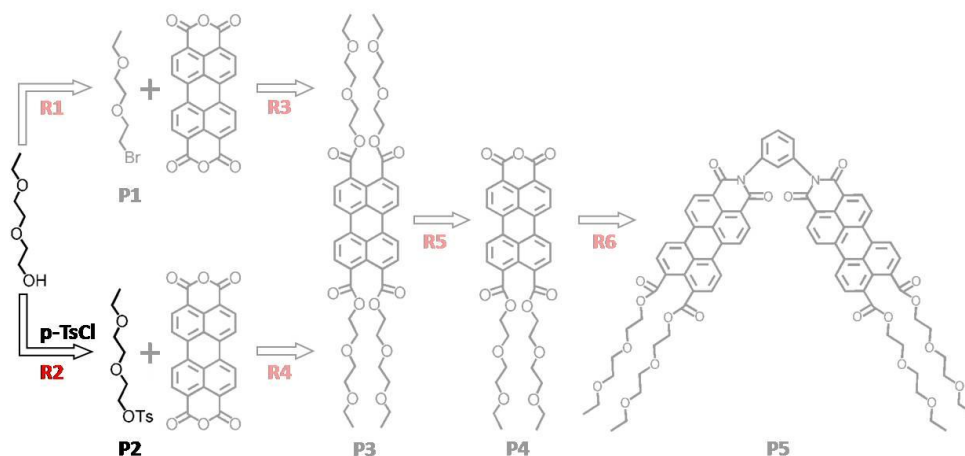
Tabla 1. Datos espectroscópicos obtenidos en la caracterización del producto sintetizado P1.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3 , 25 °C) δ (ppm)	3.82 (2H, t, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{Br}$, $J = 3.8$ Hz); 3.64 (4H, dm, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$) 3.54 (2H, q, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$, $J = 3.8$ Hz); 3.48 (2H, t, CH_2Br , $J = 3.8$ Hz) 1.22 (3H, t, CH_3 , $J = 3.8$ Hz)
---	--

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.2. SÍNTESIS DEL TOSILATO DEL DIETILENGLICOL MONOETILÉTER (REACCIÓN R2)

Las condiciones de la síntesis y purificación fueron adaptadas de la referencia de Wittmeyer y colaboradores (2016). Sobre una solución refrigerada en baño de hielo en la que se disuelven 19.71 g (100 mmol) de dietilenglicol monoetiléter en 55 mL de THF se adicionan lentamente, y bajo agitación magnética constante, 30 mL de NaOH 5 M (95 mmol, 18.11 g). Por otro lado se disuelven 17,97 g (95 mmol) de cloruro de p-toluensulfonilo en 30 mL de THF y se procede a la adición gota a gota sobre la mezcla anterior con ayuda de un embudo de adición compensada. La solución resultante se agita a temperatura ambiente durante dos horas antes de proceder al aislamiento del 2-(2-etoxietoxi)etil-4-metilbencenosulfonato (P2) mediante el lavado de la fase orgánica con agua (3 × 50 mL) para eliminar los restos de reactivos, secado sobre Na₂SO₄ anhidro y posterior evaporación del THF a vacío para proporcionar 14 g (Rendimiento = 42%) de un líquido viscoso incoloro.



Esquema 3. Tosilación del éter monoetilico del etilenglicol para obtener el 2-(2-etoxietoxi)etil-4-metilbencenosulfonato.

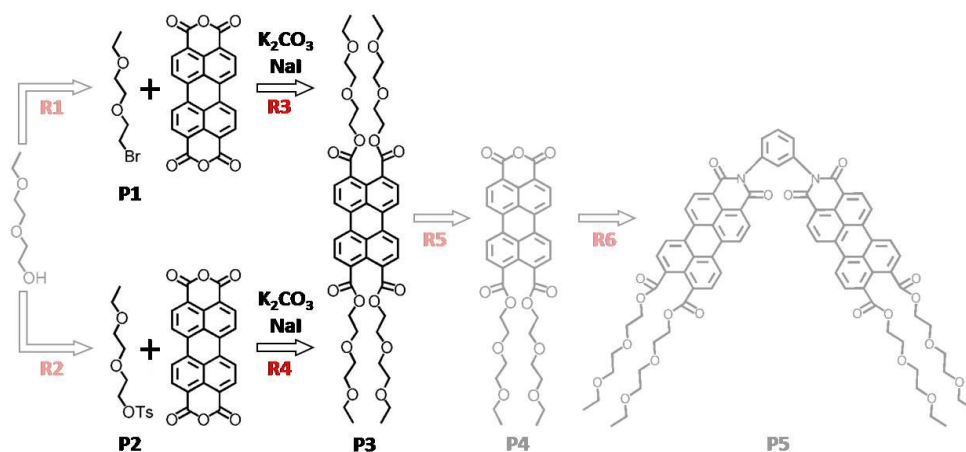
Tabla 2. Datos espectroscópicos obtenidos en la caracterización del producto sintetizado P2.

¹ H-RMN (300 MHz, CDCl ₃ , 25 °C) δ (ppm)	
	7.66 (2H, d, ArH, J = 7.6 Hz); 7.22 (2H, d, ArH, J = 7.6 Hz)
	4.04 (2H, t, CH ₂ OTs, J = 3.8 Hz); 3.56 (2H, q, CH ₂ CH ₂ OTs, J = 3.8 Hz)
	3.42 (4H, dm, OCH ₂ CH ₂ O); 3.35 (2H, q, CH ₃ CH ₂ O, J = 3.8 Hz)
	2.31 (3H, s, ArCH ₃); 1.06 (3H, t, CH ₃ , J = 3.8 Hz)

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.3. SÍNTESIS DEL PERILENOTETRAÉSTER DEL DIETILENGLICOL MONOETILÉTER (REACCIONES R3 Y R4)

La síntesis y purificación fueron adaptadas del artículo científico de Arnaud y colaboradores (2004). Pesamos en un matraz de fondo redondo de 25 mL todos los reactivos: 1.77 g de perilenodianhídrido (PDA, 4.5 mmol), 4.32 g de etilenglicol monoetiléter (32.16 mmol), 1,77 g de K_2CO_3 (12.79 mmol) y 30.45 mmol del agente esterificante (Bromuro P1, 6 g; Tosilato P2, 10.69 g). Se añade una pequeña cantidad de NaI, se conecta un sistema de condensación y se calienta la mezcla a 70 °C durante 24 h. A continuación se añaden 100 mL de $CHCl_3$ al crudo de cada reacción para disolver el sólido gris metálico que ha aparecido y las soluciones se filtran a vacío en placa con Decalite. El líquido de color naranja intenso recogido en cada una de ellas se lavó con agua destilada (2 × 50 mL) y finalmente con 50 mL de una disolución saturada de NaCl. Tras la eliminación a vacío del disolvente de las fases orgánicas se realizó la deposición del sólido resultante en la cabeza de sendas columnas cromatográficas ($\varnothing = 5$ cm) con gel de sílice como fase estacionaria y cloroformo:etanol 9:1 como fase móvil. En ambos casos, el aislamiento de las diferentes fracciones proporcionaron el tetrakis(2-(2-etoxietoxi)etil)perileno-3,4,9,10-tetracarboxilato (P3) en forma de un aceite de apariencia muy viscosa de color naranja con la suficiente pureza (P1: 1.89 g, Rendimiento = 47%; P2: 281.4 mg, Rendimiento = 7%) como para continuar con la ruta sintética propuesta.



Esquema 4. Condensación de los derivados sintetizados con PDA para proporcionar el tetrakis(2-(2-etoxietoxi)etil)perileno-3,4,9,10-tetracarboxilato P3.

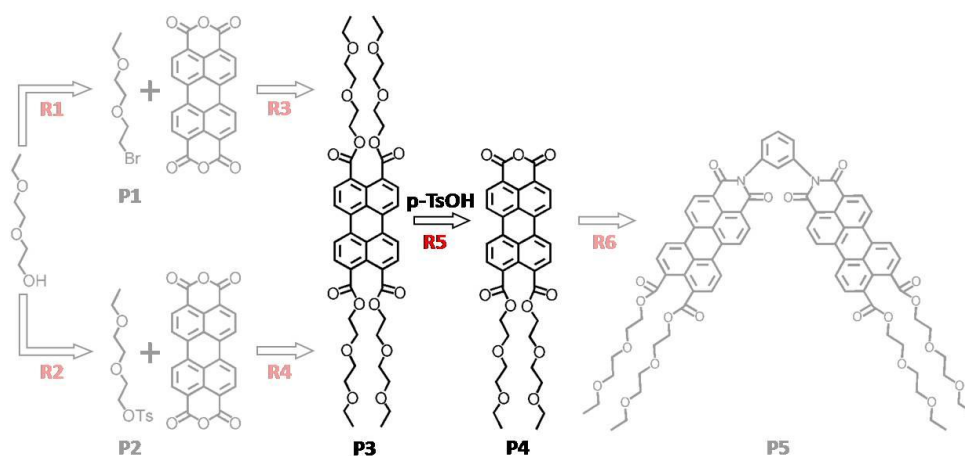
Tabla 3. Datos espectroscópicos obtenidos en la caracterización del producto sintetizado P3.

1H -RMN (300 MHz, $CDCl_3$, 25 °C) δ (ppm)	7.80 (4H, d, PerilenoH, J = 7.6 Hz); 7.35 (4H, d, PerilenoH, J = 7.6 Hz) 4.17 (4H, t, CH_2OOC Perileno, J = 4.16 Hz) 3.75-3.46 (36H, m, $CH_2OCH_2CH_2OCH_2$); 1.19 (12H, m, CH_3 , J = 3.8 Hz)
EM (MALDI-TOF, Ditranol)	m/z = 892.476 [M ⁺]; calculado = 829.39
UV-Visible ($CHCl_3$) λ_{max} (nm) [ϵ ($mol^{-1} \cdot L \cdot cm^{-1}$)]	420 [1294 ± 6], 444 [2535 ± 9], 473 [2991 ± 10]
Fluorescencia ($CHCl_3$) λ_{em} (nm) [ϕ_{FL}]	490, 520 [0.18]

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.4. SÍNTESIS DEL PERILENOMONOANHÍDRIDIÉSTER DEL DIETILENGLICOL MONOETILÉTER (REACCIÓN R5)

Las condiciones de reacción y aislamiento del producto fueron adaptadas de la referencia de Xue y colaboradores (2009). En un matraz de fondo redondo de 5 mL se disuelven 953.8 mg (1.12 mmol) del perilenotetraéster P3 en 1.5 mL de n-dodecano y 0.3 mL de tolueno mediante agitación magnética hasta conseguir una solución de color rojizo. A continuación se calenta la mezcla a 95 °C antes de añadir 221.8 mg (1.12 mmol) de ácido p-toluensulfónico sólido. Transcurridas 5 h de reacción, se deja enfriar la mezcla a temperatura ambiente antes de decantar el sobrenadante amarillo y recuperar 486.4 mg (Rendimiento = 51%) de un sólido rojo resultante mediante centrifugación en tolueno (3 × 4 mL) seguida de secado a vacío durante toda la noche.



Esquema 5. Formación del perilenomonoanhídridiéster P4 derivado del tetrakis(2-(2-etoxietoxi)etil)perileno-3,4,9,10-tetracarboxilato previamente sintetizado.

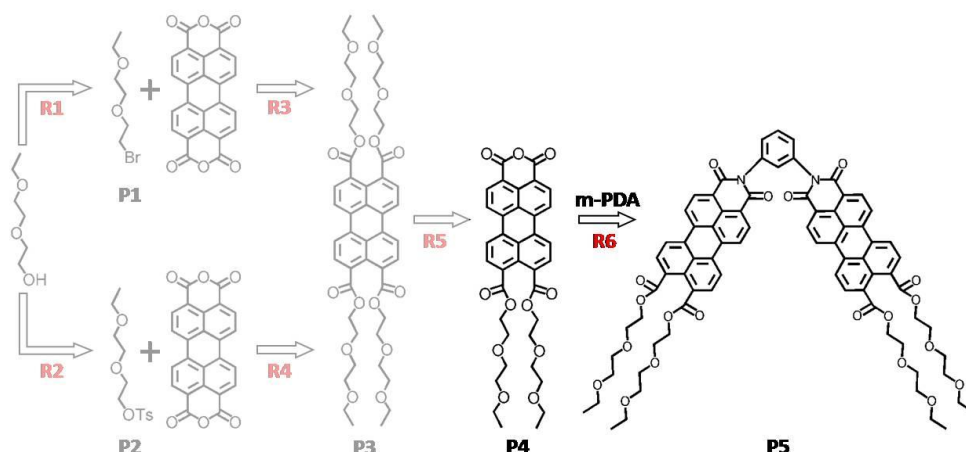
Tabla 4. Datos espectroscópicos obtenidos en la caracterización del producto sintetizado P4.

EM (MALDI-TOF, Ditranol)	$m/z = 642.137 [M]$; calculado = 642.21
UV-Visible (CHCl_3)	447 [3892 ± 18], 477 [6619 ± 37], 504 [7413 ± 39]
λ_{max} (nm) [ϵ ($\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$)]	447 [3892 ± 18], 477 [6619 ± 37], 504 [7413 ± 39]
Fluorescencia (CHCl_3)	488, 529, 565 [0.34]
λ_{em} (nm) [ϕ_{FL}]	488, 529, 565 [0.34]

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.5. SÍNTESIS DE LA BISPERILENOMONOIMIDA DERIVADA DEL 1,3-DIAMINOBENCENO Y EL PERILENOMONOANHÍDRIDODIÉSTER DEL DIETILENGLICOL MONOETILÉTER (REACCIÓN R6)

Las condiciones de reacción y aislamiento del producto fueron adaptadas de la referencia de Xue y colaboradores (2009). Se pesan 201.5 mg (0.311 mmol) del perilenomonoanhíridodiestéer P4 junto con 17.3 mg (0.155 mmol) de 1,3-diaminobenceno, 1.86 g de imidazol y 39.1 mg de DMAP (4-dimetilaminopiridina) en un matraz de fondo redondo de 5 mL. Para que la reacción de condensación tenga lugar en un sistema de reflujo, se calienta la mezcla de reactivos en atmósfera de Argón hasta 130 °C para que se funda el imidazol, produciendo una solución de color cereza que se mantiene con agitación magnética durante 5 h. Transcurrido el tiempo de reacción, se enfría la mezcla y antes de que solidifique se añade, lentamente y con agitación vigorosa, 3 mL de CHCl₃. El aislamiento de la perilenodiimida P5 se realizó mediante cromatografía en columna ($\varnothing = 5$ cm) con gel de sílice como fase estacionaria y cloroformo:metanol 8:2 como fase móvil. La identificación de las fracciones eluidas de la columna en las que se encuentra el producto deseado se realizó mediante TLC utilizando la misma fase móvil. Finalmente, se reúnen todas las fracciones donde se detecta el producto P5 y se evapora el disolvente a vacío para obtener 48.7 mg (Rendimiento = 23%) de un sólido de color rojizo.



Esquema 6. Condensación de P4 con 1,3-diaminobenceno para obtener el dímero bisperilenomonoimidadiéster P5.

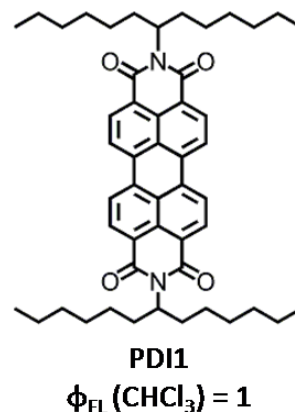
Tabla 5. Datos espectroscópicos obtenidos en la caracterización del producto sintetizado P5.

¹ H-RMN (300 MHz, CDCl ₃ , 25 °C) δ (ppm)	8.27 (4H, d, PerilenoH, J = 8.3 Hz); 7.92-7.82 (10H, m, PerilenoH, ArH) 7.31 (1H, t, ArH, J = 7.31 Hz); 6.75 (5H, m, PerilenoH, ArH) 4.54, 3.93, 3.75, 3.62 (32H, m, CH ₂ OCH ₂ CH ₂ OCH ₂) 3.52 (8H, q, CH ₃ CH ₂ O, J = 3.51 Hz); 1.19 (12H, m, CH ₃ , J = 3.5 Hz)
EM (MALDI-TOF, Ditranol)	m/z = 1357.953 [M ⁺]; calculado 1357.41
UV-Visible (CHCl ₃) λ _{max} (nm) [ε (mol ⁻¹ ·L·cm ⁻¹)]	450 [15021 ± 49], 478 [30750 ± 158], 507 [38538 ± 415]
Fluorescencia (CHCl ₃) λ _{em} (nm) [Φ _{FL}]	526, 562 [0.07]

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.6. DETERMINACIÓN DE RENDIMIENTOS CUÁNTICOS DE FLUORESCENCIA

Para la determinación experimental del rendimiento cuántico de fluorescencia relativo generalmente existen dos aproximaciones, aunque ambas se basan en la comparación del área integrada bajo la curva de los espectros de emisión de fluorescencia de la muestra desconocida con la de un estándar (Oter et al, 2007). El método del punto único, el cual emplea un solo valor de la emisión de la muestra y otro para el estándar, es rápido pero no siempre es fiable debido a las posibles fuentes de error. La segunda aproximación es un método comparativo mucho más prolongado en el tiempo pero que proporciona mayor exactitud al comparar las intensidades de fluorescencia integrada y la absorción de la muestra y la referencia (Williams et al, 1983). Éste último fue el seleccionado para la determinación de los rendimientos cuánticos de fluorescencia de todas las muestras analizadas en este trabajo. Para ello se registraron los espectros de absorción UV-Visible y de emisión de fluorescencia corregidos para seis concentraciones diferentes tanto de la referencia (perilenodiimida del 7-aminotridecano PDI1) como de las muestras problema. Las intensidades de fluorescencia integradas se representaron frente a sus correspondientes densidades ópticas tanto para la referencia como para las muestras, de forma que el gradiente de cada representación es proporcional al rendimiento cuántico de las moléculas estudiadas. Para evitar el efecto del filtro interno, las densidades ópticas de todas las soluciones se mantuvieron por debajo de 0.1 a la longitud de onda de excitación. Además, para corregir las diferencias que surgen de los índices de refracción se aplica la siguiente ecuación:



$$\Phi_M = \Phi_E \left(\frac{\text{Grad}_M}{\text{Grad}_E} \right) \left(\frac{n_M^2}{n_E^2} \right)$$

donde E y M designan el estándar y la muestra, respectivamente, Grad es la pendiente de la recta intensidad de fluorescencia vs densidad óptica y n es el índice de refracción del disolvente.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DEL BROMURO DEL DIETILENGLICOL MONOETILÉTER

La primera etapa de la síntesis de la perilenodiimida objetivo consistió en una reacción de sustitución del grupo hidroxilo primario del dietilenglicol monoetiléter comercial con el objetivo de obtener un derivado de la cadena pegilada que sea más reactivo que el propio alcohol. Para ello se seleccionó la formación del bromuro correspondiente como primera alternativa debido a la mayor reactividad de los haluros de alquilo ante reacciones de condensación debido a que el bromuro es un buen grupo saliente en durante el transcurso de la reacción. Son muchas las condiciones de bromación disponibles en la literatura especializada, pero las principales se basan en la reacción de alcoholes con Br_2/PPh_3 o PBr_3 . Mientras que la primera de estas dos alternativas no proporcionó el producto deseado con un rendimiento apreciable, la segunda de ellas sí que funcionó correctamente en las condiciones de reacción ensayadas, suministrando el producto bromado con un rendimiento cercano al 95%. La identificación del líquido transparente obtenido tras la purificación como el compuesto P1 se llevó a cabo mediante ^1H -RMN tal como se muestra en la Figura 6, donde se puede comprobar, por un lado, las señales de los protones presentes en la estructura química del 1-(2-bromoetoxi)-2-(2-metoxietoxi)etano, y por otro lado, la pureza del producto puesto que no se aprecian señales debidas a restos de reactivos en el registro obtenido.

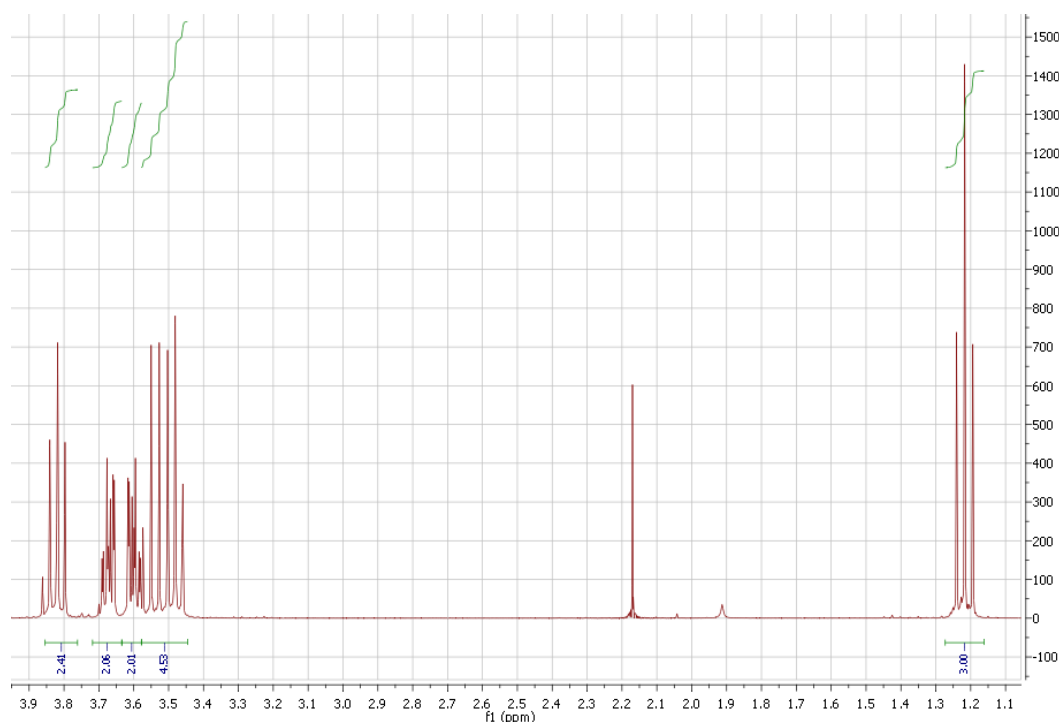


Figura 6. Espectro de ^1H -RMN del 1-(2-bromoetoxi)-2-(2-metoxietoxi)etano.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.2. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DEL TOSILATO DEL DIETILENGLICOL MONOETILÉTER

Una alternativa al uso de bromuros alifáticos como agentes alquilantes en reacciones de condensación son los derivados tosilados análogos, obtenidos por la reacción de sustitución nucleófila que sufren los alcoholes en presencia de cloruro de p-toluensulfonilo. La ventaja de esta reacción frente a la bromación realizada sobre el alcohol de partida es que las condiciones de reacción son mucho más suaves, tanto en relación con los reactivos empleados como por la temperatura y ausencia de atmósfera inerte. Sin embargo, el rendimiento hacia el 2-(2-etoxietoxi)etil-4-metilbencenosulfonato P2 alcanza un leve 42%, prácticamente la mitad del alcanzada en el caso de la bromación. De este modo, esta diferencia tan significativa en la preparación de los productos P1 y P2 reside, a su vez, en las propias condiciones de reacción.

La caracterización espectroscópica de este producto se realizó mediante RMN, analizando las señales de los núcleos de H de su estructura química. Como se puede apreciar en la Figura 7, el líquido transparente aislado tras el proceso de purificación está constituido, prácticamente en forma pura, por el derivado tosilado buscado; sin embargo, y a diferencia de la reacción de bromación anterior, el espectro muestra señales de restos de reactivos, lo cual indica que esta alternativa de síntesis, además de proporcionar menor cantidad de producto, también se encuentra más contaminado.

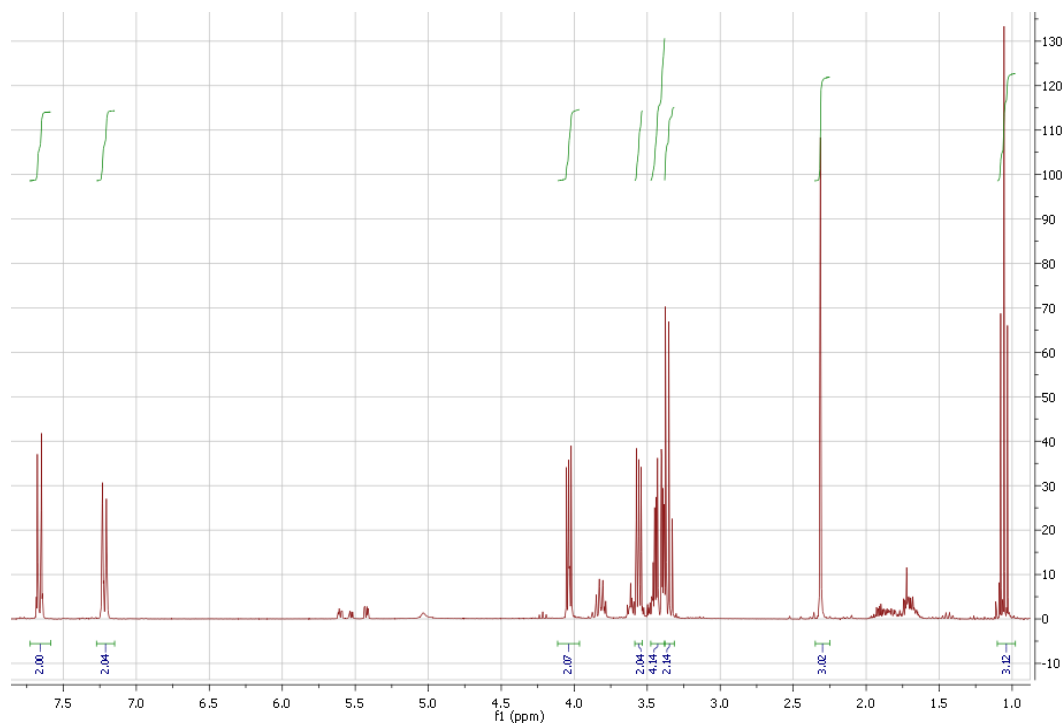


Figura 7. Espectro de ^1H -RMN del 2-(2-etoxietoxi)etil-4-metilbencenosulfonato.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DEL PERILENOTETRAÉSTER DEL DIETILENGLICOL MONOETILÉTER

El compuesto P3 es el primer producto sintetizado en este trabajo que presenta en su estructura la unidad de perileno. Como se ha comentado, para su síntesis se ha empleado la reacción de condensación del precursor de toda la familia de derivados, el perilenodianhídrido PDA, con el bromuro o el tosilato del dieteilenglicol monoetiléter sintetizados en las dos etapas anteriores. Con el fin de comparar su eficiencia en la funcionalización del PDA, en ambos casos se emplearon las mismas condiciones de reacción. Si bien el producto de las dos condensaciones es el mismo, en el caso de utilizarse el derivado bromado se alcanza un rendimiento significativamente superior al caso de realizar la reacción con el tosilato, 47% y 7% respectivamente. Esta diferencia en el avance de la reacción dependiendo de la fuente de cadenas oxoetilénicas para la condensación puede asignarse a la mayor reactividad del bromuro frente al tosilato de partida a pesar de que, en términos generales, el p-toluensulfonato es mejor grupo saliente que el bromuro. Si se tienen en cuenta los rendimientos conjuntos de las dos primeras etapas para la síntesis de P3 a partir de dieteilenglicol monoetiléter mostradas en el Esquema 1 (R1 + R3 por un lado y R2 + R4 por otro lado), se obtiene puede concluir que la ruta a través del derivado bromado es unas 15 veces mejor que la alternativa con el tosilato análogo.

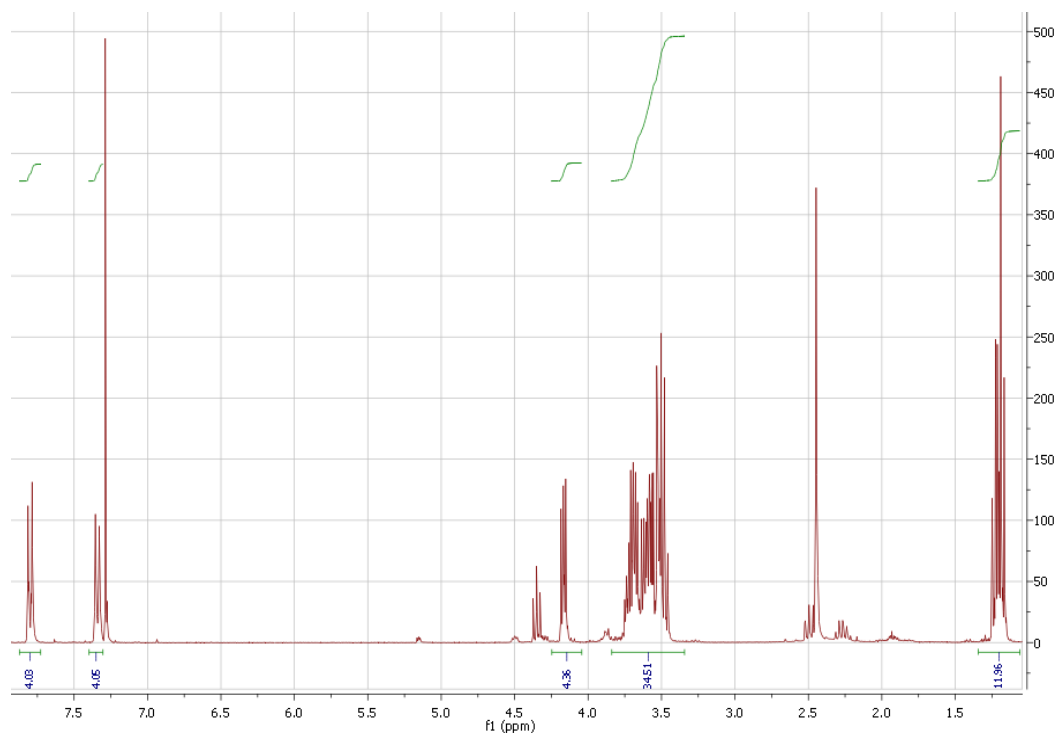


Figura 8. Espectro de ^1H -RMN del tetrakis(2-(2-etoxietoxi)etil)perileno-3,4,9,10-tetracarboxilato sintetizado.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La caracterización de este producto se realizó utilizando diferentes técnicas espectroscópicas. La primer de ellas fue la resonancia magnética nuclear, cuyo espectro se muestra en la Figura 8; en él se puede comprobar cómo aparecen bastante resueltas las diferentes señales correspondientes a los hidrógeno del perilenotetraéster obtenido. De este modo se comprueba tanto la eficacia del método de síntesis ensayado como del proceso de purificación del producto mediante cromatografía en columna con gel de sílice. Sin embargo, y a la vista del mismo espectro, se pueden apreciar un conjunto de señales de baja intensidad debidas, posiblemente, a impurezas que hayan podido ser extraídas de la fase estacionaria del proceso cromatográfico debido a la alta polaridad del eluyente. Por ello, se planteó repetir la columna pero empleando alúmina neutra como medio con menor retención de analitos polares en comparación con la SiO_2 . De este modo, se consiguió purificar el producto empleando como fase móvil una mezcla de acetona:cloroformo 5:95. La comprobación de la estructura aislada se realizó mediante espectrometría de masas empleando la técnica de ionización MALDI-TOF debido al elevado peso molecular del compuesto. El registro obtenido se muestra en la Figura 9, y en él se confirma la presencia del pico molecular de P3.

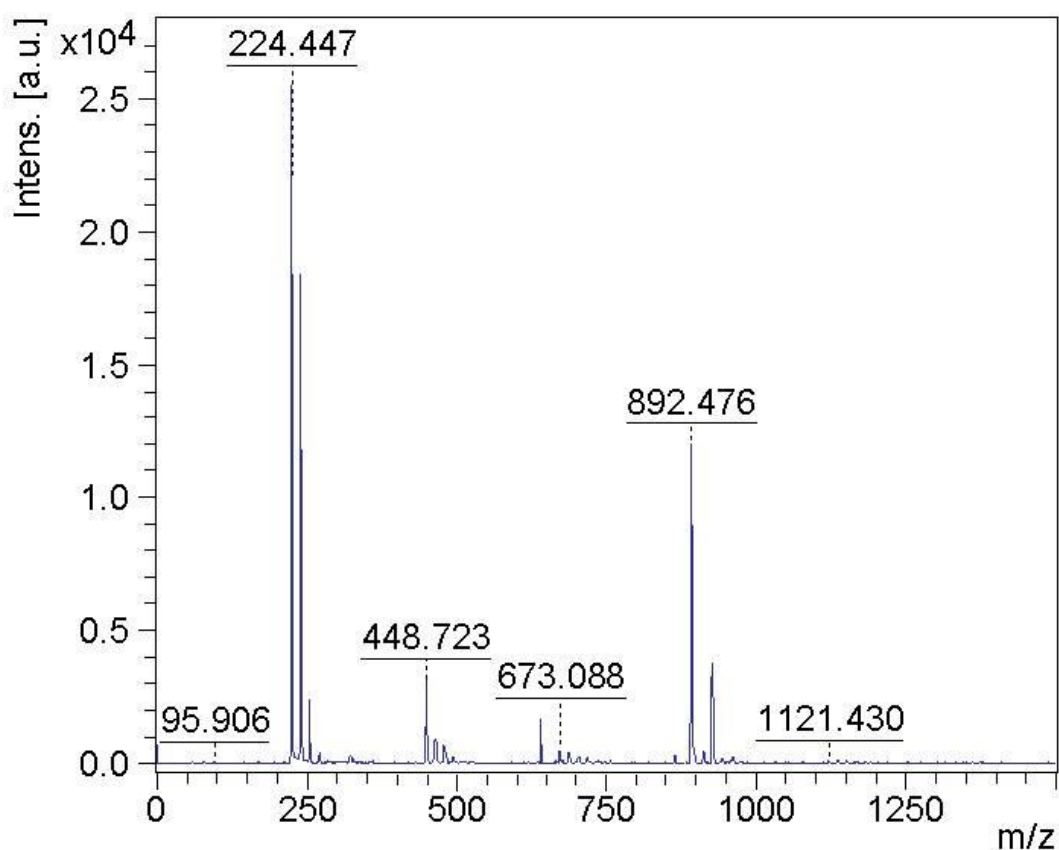


Figura 9. Espectros de masas de una muestra de P3 disuelta en cloroformo y depositada sobre matriz de ditranol, ionizada mediante MALDI-TOF y registrado en modo negativo.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Puesto que se trata de un compuesto coloreado fluorescente, se llevó a cabo el registro del espectro de absorción UV-Visible en medio acuoso para diferentes concentraciones del perilenotetraéster sintetizado. La Figura 10 muestra las variaciones de densidad óptica de la disolución conforme aumenta la concentración del colorante. Cabe destacar el hecho de que la proporcionalidad esperada según la Ley de Lambert-Beer se cumple para concentraciones de P3 por debajo de 0.1 mM, lo cual indica que en dicho intervalo la solubilidad en agua de esta molécula permanece inalterada. Sin embargo, se puede apreciar que por encima de dicho límite, las absorbancias se desvían positivamente de la linealidad predicha por la ley de la absorción de radiación. Si bien esta observación aparece cuando se supera valores de 1.0-1.5 unidades de absorbancia debido al efecto de filtro interno producido por disoluciones concentradas, en el caso de P3 en medio acuoso se puede deber presumiblemente a fenómenos de agregación de las moléculas planas de perileno ya que la absorbancia se mantiene por debajo de 0.3. Fenómenos similares se han descrito para otras moléculas orgánicas con sistemas de anillos aromáticos planos, pero en el caso de derivados de la familia del perileno, este efecto hiperocrómico ha sido ampliamente documentado en la bibliografía, tal como se ha presentado en la introducción del presente trabajo.

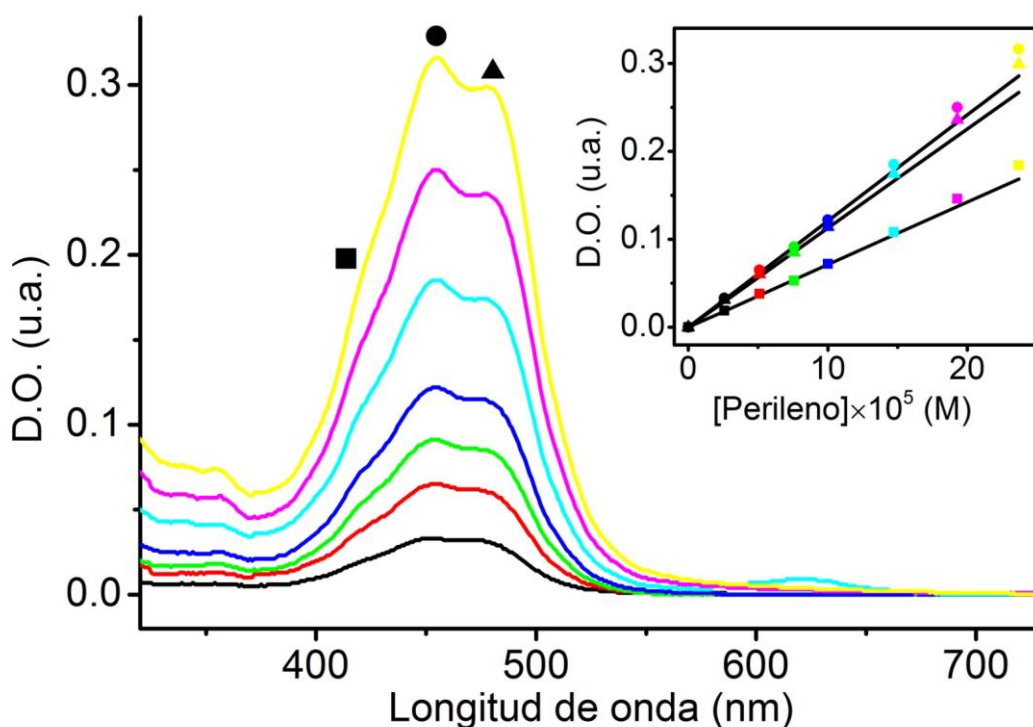


Figura 10. Espectros UV-Visible para disoluciones acuosas de concentración creciente del perilenotetraéster derivado del dietilenglicol monoetiléter. La gráfica interior muestra la variación de densidad óptica a 420 (■), 454 (●) y 478 nm (▲) en función de su concentración indicada por el mismo código de colores que los espectros correspondientes.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Si bien los espectros de absorción UV-Visible se ven afectados por los fenómenos de agregación molecular, los correspondientes registros de la emisión de fluorescencia suelen servir como una herramienta espectroscópica mucho más potente para confirmar dichas observaciones. La fluorescencia es un fenómeno muy sensible a cambios en el entorno en el que se encuentra cualquier fluoróforo; así, cambios en la polaridad, temperatura, concentración o presencia de otras sustancias hacen que este mecanismo de desactivación radiativa de la energía se vea modificado de manera mucho más acusada que la propia absorción. El registro simultáneo de la fluorescencia de las disoluciones acuosas utilizadas para los espectros de absorción de P3 proporcionó los resultados mostrados en la Figura 11. En ella se muestra, por un lado, los cambios en la emisión de fluorescencia en función de la concentración de la disolución y, por otro lado, el aumento tanto del área bajo la curva del espectro como la intensidad de fluorescencia a diferentes longitudes de onda. Como se puede comprobar, la emisión de radiación aumenta a medida que lo hace la concentración de P3 en la disolución, pero la forma del espectro varía con dicha progresión, llegando incluso a invertirse la intensidad relativa de los máximos de emisión (inset B); esta observación es indicativa de la presencia de fenómenos moleculares relacionados con el parámetro que varía, es decir, con la cantidad de unidades de perileno presentes en el medio. Es más, la relación entre la absorción y emisión total de radiación, cuantificada mediante el área bajo la curva, no sigue una tendencia lineal como cabría esperar si las moléculas emisoras de luz fueran independientes unas de otras (inset A). De este modo, el registro de los espectros de emisión no sólo permite comprobar las observaciones realizadas mediante la absorción UV-Visible sobre la agregación del perilenotetraéster en agua, sino que incluso la mayor sensibilidad de esta técnica sitúa el valor de concentraciones en el que comienzan dichos fenómenos por debajo de 25 μM .

El apilamiento de moléculas aromáticas planas está gobernado por el tipo de fuerzas intermoleculares que se establecen entre de forma competitiva entre las propias moléculas del compuesto que se agrega y el disolvente. Por ello, cualquier cambio en el balance entre estos dos componente hace que se vea afectado el ordenamiento molecular y se refleje en sus propiedades fotofísicas. En este sentido, el registro de los espectros de absorción y emisión en disolventes de diferente polaridad permite analizar con más detalle el comportamiento microscópico de agregados moleculares. Así, la Figura 12 presenta los resultados de la caracterización espectroscópica del perilenotetraéster P3 en cloroformo; como se puede apreciar, tanto la absorbancia como la fluorescencia siguen una relación perfectamente lineal en todo el rango de concentraciones ensayado para el caso de utilizarse agua como disolvente. Esta diferencia de comportamiento de P3 en medios polares y apolares apoya las observaciones previas sobre su agregación en medio acuoso.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

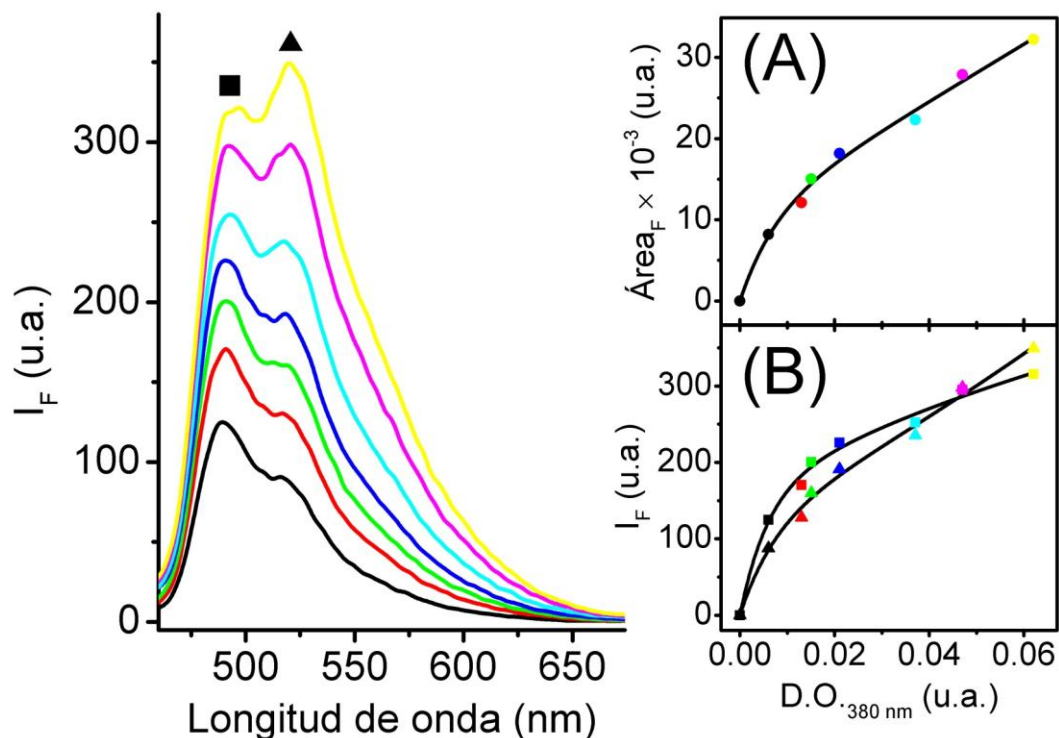


Figura 11. Espectros de fluorescencia para disoluciones acuosas de concentración creciente del perileno tetraéster derivado del dietilenglicol monoetiléter. Las gráficas menores muestran (A) el cambio en la intensidad total emitida (Área_F) y (B) la variación de la emisión de fluorescencia a 490 (■) y 520 nm (▲) con respecto a la absorción a la longitud de onda de excitación ($\lambda_{\text{ex}} = 380$ nm), indicados por el mismo código de colores que los espectros correspondientes.

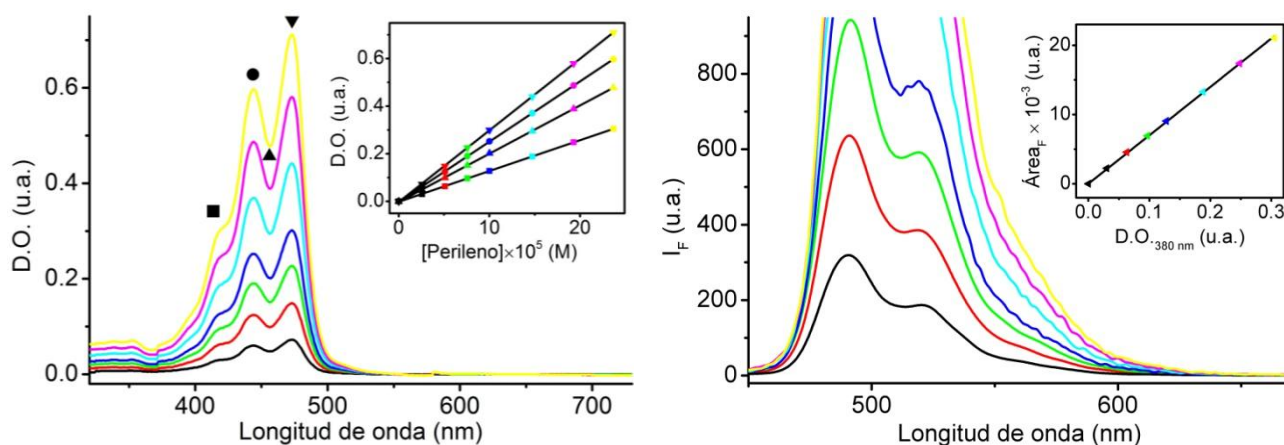


Figura 12. Espectros UV-Visible (izquierda) y de Fluorescencia (derecha) para disoluciones de concentración creciente del perileno tetraéster derivado del dietilenglicol monoetiléter en cloroformo. Las gráficas interior muestran tanto (A) la variación de densidad óptica a 420 (■), 444 (●), 456 (▲) y 472 nm (▼) en función de su concentración como (B) el aumento proporcional del área bajo las curvas de emisión en función de la absorción a la longitud de onda de excitación ($\lambda_{\text{ex}} = 380$ nm), indicada por el mismo código de colores que los espectros correspondientes.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En cuanto a la espectroscopía UV-Visible, las curvas de absorción en agua y cloroformo del perilenomonoanhídridodiéster aislado, y que se representan en la Figura 14, muestran el comportamiento lineal que predice la ley de Lambert-Beer para disoluciones de concentración creciente en las que las moléculas son independientes unas de otras. De este modo, esta técnica de caracterización revela un comportamiento similar para P4 en ambos disolventes, hecho que contrasta con las observaciones presentadas para su precursor, el perilentetraéster P3. Resulta destacable el hecho de que el rango lineal en el caso del monoanhídridodiéster es casi cuatro veces más reducido al compararlo con el correspondiente al tetraéster, es decir, la solubilidad del compuesto P4 en ambos disolvente es significativamente menor que en el caso de P3. Los espectros en la Figura 14, además de presentar los cambios en el perfil de las transiciones electrónicas dependiendo de la polaridad del disolvente, confirman indirectamente la menor solubilidad de P4; el aumento progresivo de la intensidad de la línea base, tal como ocurre en soluciones no transparentes de sustancias en suspensión, puede asociarse a fenómenos de dispersión de radiación por partículas no disueltas.

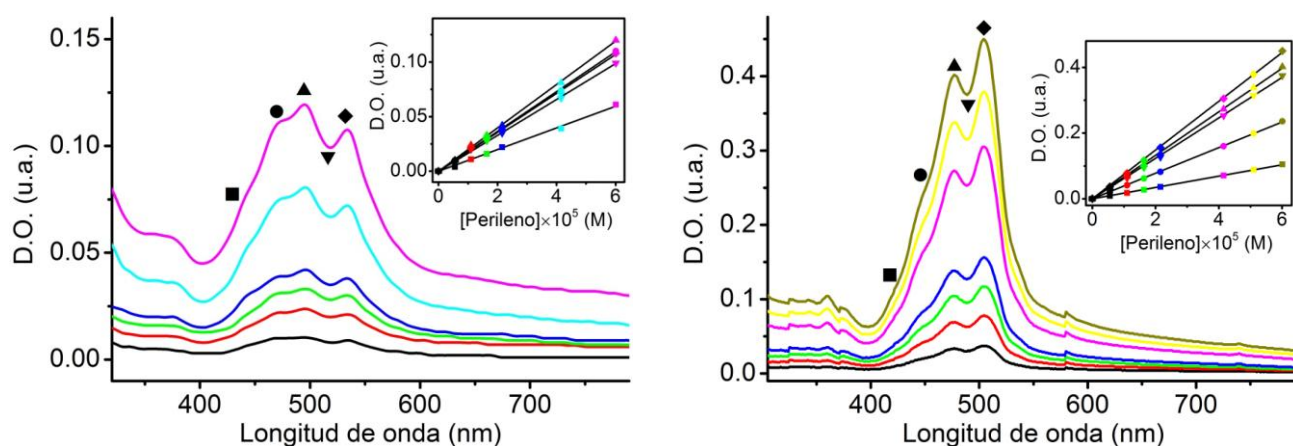


Figura 14. Espectros de absorción UV-Visible del perilenomonoanhídridodiéster derivado del dietilenglicol monoetiléter P4 registrados en agua (izquierda) y cloroformo (derecha) a diferentes concentraciones. Las gráficas interiores muestran, en ambos casos, el cumplimiento de la ley de Lambert-Beer por debajo de $60 \mu\text{M}$ a diferentes longitudes de onda.

Por otro lado, los espectros de emisión de fluorescencia correspondientes a las disoluciones anteriores sugieren una inversión del comportamiento entre los perilenos P4 y P3: la proporcionalidad directa entre fluorescencia y absorción para las disoluciones acuosas del monoanhídridodiéster contrastan con la curvatura de los mismos registros cuando se realizan idénticas medidas en cloroformo (Figuras 15 y 16). De ello se deduce que la agregación del perilenomonoanhídridodiéster se favorece al reducir la polaridad del medio. Estos resultados, comparados con los correspondientes al tetraéster P3, son un reflejo de la influencia que la modificación de la estructura química entre estos dos miembros de la familia de los perilenos tiene sobre los fenómenos de agregación molecular en disolución.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

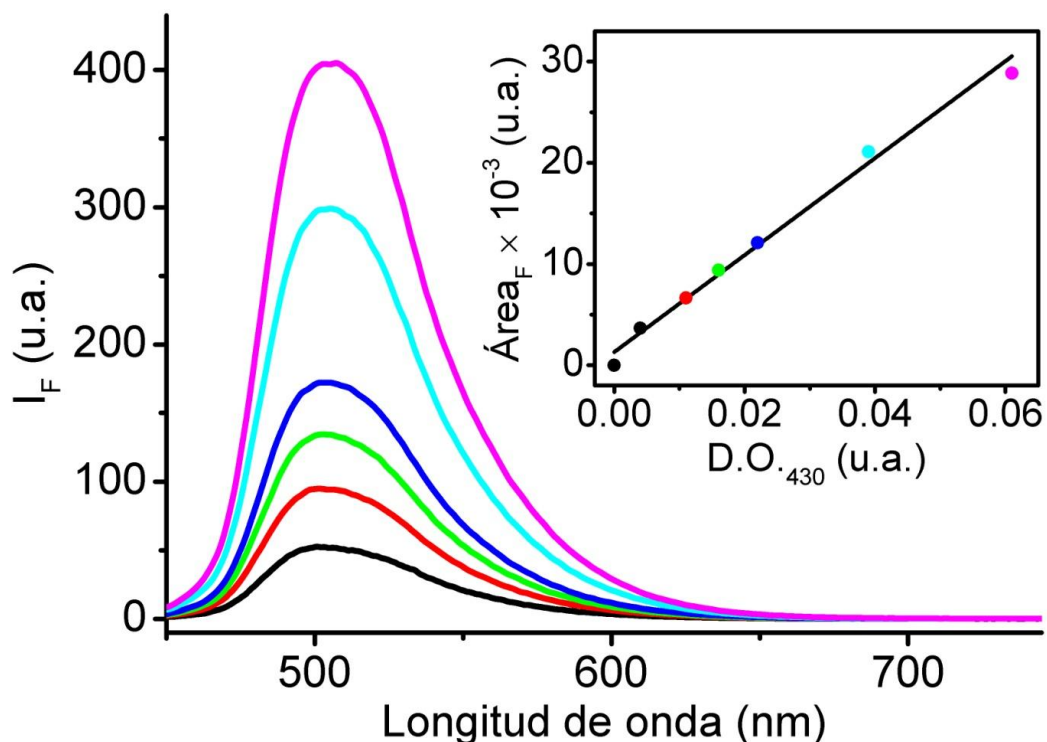


Figura 15. Espectros de fluorescencia para disoluciones acuosas de concentración creciente del perileno P4. La gráfica interior muestra la dependencia lineal entre el área bajo la curva del espectro y la absorción a la longitud de onda de excitación ($\lambda_{ex} = 430$ nm).

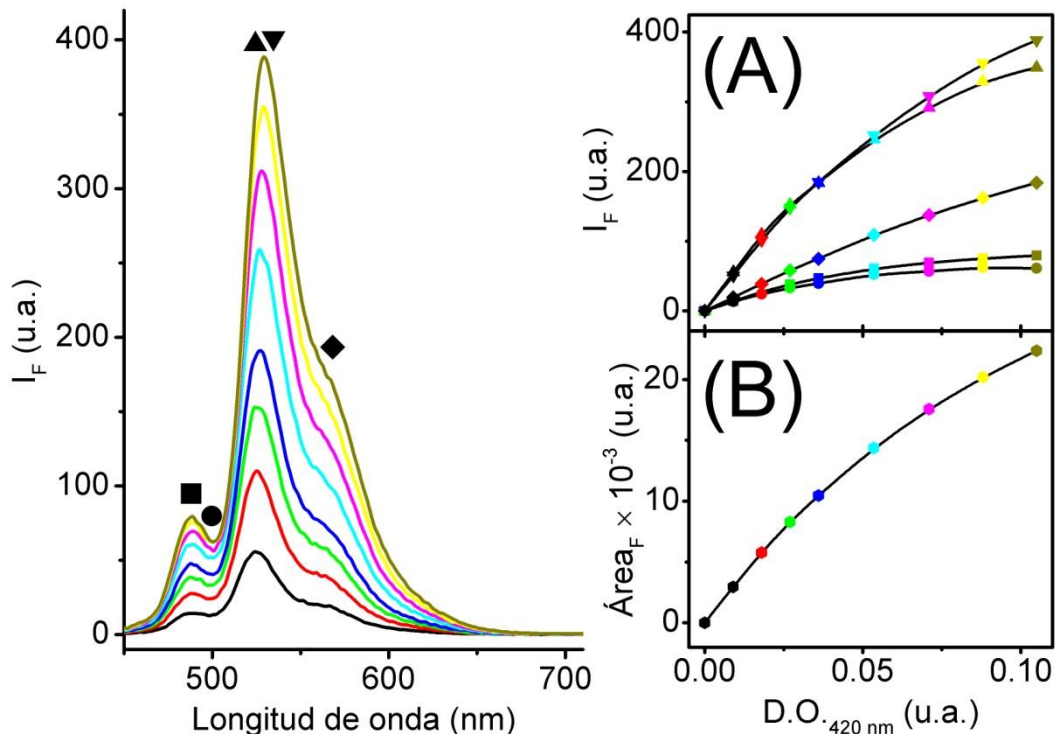


Figura 16. Espectros de fluorescencia para disoluciones de concentración creciente del perileno P4 en $CHCl_3$. Las gráficas menores muestran (A) la variación de la fluorescencia a 489 (■), 500 (●), 524 (▲), 530 (▼) y 562 nm (◆) y (B) el cambio en la emisión total con respecto a la absorción a 420 nm, ambos indicados por el mismo código de colores que los espectros.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.5. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LA BISPERILENOMONOIMIDA

La última etapa del esquema de síntesis inicialmente diseñado persigue la condensación de dos unidades derivadas del perilenomonoanhídridodiestéer P4 a través de la condensación con 1,3-diaminobenceno para producir la molécula de perilenomonoimida objetivo P5. Las condiciones de reacción ensayadas proporcionaron, con un rendimiento del 23%, un sólido de color cereza muy soluble en CHCl_3 . De hecho, esta alta solubilidad permitió el registro de los espectros de ^1H -RMN (Figura 17) y MS (Figura 18). En cuanto al primero de ellos, las posiciones, multiplicidades y áreas de las señales que se pueden apreciar en el espectro del producto aislado coinciden, dentro de los errores experimentales, con las predicciones basadas en la estructura química diseñada tal como se encuentra asignadas en la Figura 17. Por otro lado, se registraron los espectros de masas del producto P5 de una forma similar a los medidos para el perileno P4, empleando la técnica de ionización MALDI-TOF, registrado en modo positivo en ditranol como matriz y con la adición de NaCl como aditivo. Tal como se puede observar en la Figura 18, el sólido purificado tras la reacción de condensación entre el 1,3-diaminobenceno y el perileno P4 proporciona un patrón de ionización en el que se identifican las señales asignadas al pico molecular protonado $[\text{M}-\text{H}^+]$ ($m/z = 1357.728$) cuando se miden en ausencia de NaCl, y de sus aductos con cationes sodio $[\text{M}-\text{Na}^+]$ ($m/z = 1378.136 \approx 1356 + 23$) o incluso acompañados con los contraniones cloruro $[\text{M}-2\text{NaCl}-\text{Na}^+]$ ($m/z = 1496.036 \approx 1356 + 2 \times 58.5 + 23$) cuando se registran tras la adición de una pequeña cantidad de este aditivo.

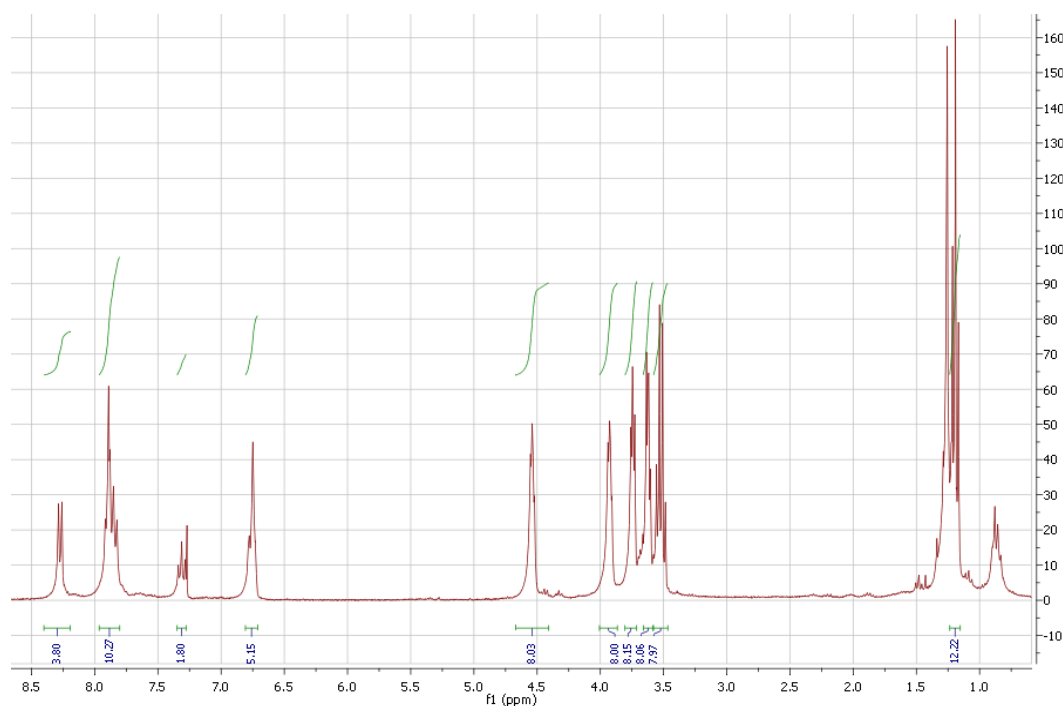


Figura 17. Espectro de ^1H -RMN del bisperilenomonoimidadiéster P5 registrado en CDCl_3 donde se indican las integrales relativas de cada una de las señales de los protones asignados.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

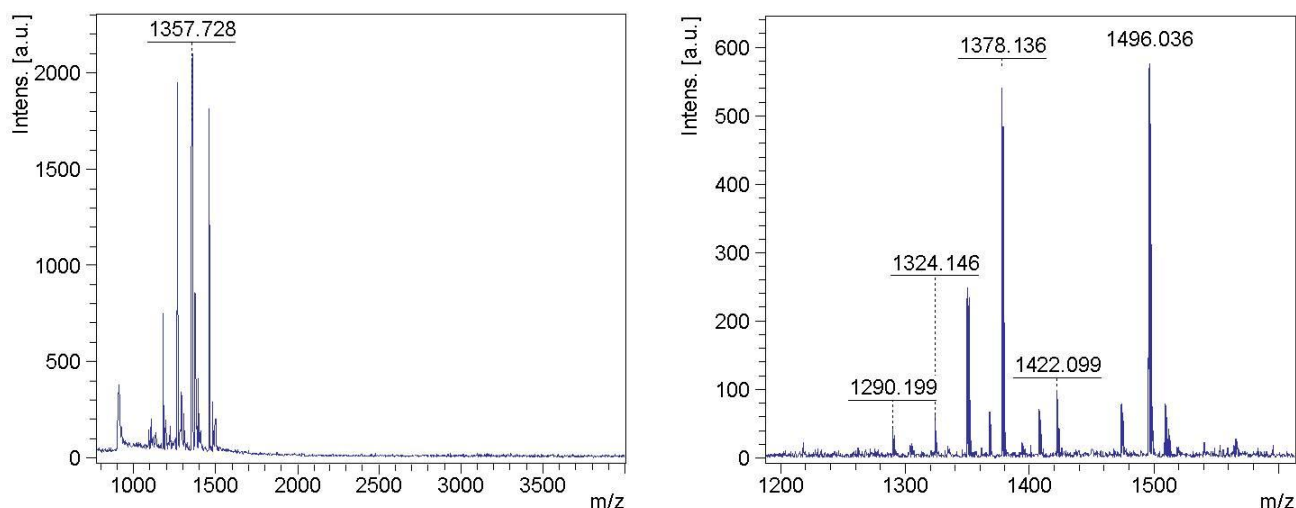


Figura 18. Espectros de masas del bisperilenomonoimidadiéster P5 en ausencia (izquierda) y presencia (derecha) de NaCl .

Finalmente, se llevó a cabo el estudio espectroscópico de la molécula objetivo P5 mediante la determinación de la influencia que tiene la concentración sobre la absorción y emisión de radiación en el rango visible del espectro electromagnético. Para ello, y al igual que se realizó con los otros perileno P3 y P4 sintetizados previamente, se registraron simultáneamente los espectros de absorción UV-Visible y de emisión de fluorescencia, tanto en medio acuoso como en cloroformo. La comparación de los resultados obtenidos en dichas medidas se muestran en la Figura 19 para las dos técnicas en los dos disolventes. A pesar de que lo primero que destaca es el efecto que tiene el disolvente en el perfil de los espectros de absorción y emisión del producto P5, es la cantidad de este perileno la que más influye en la posición e intensidad de los máximos espectrales. De hecho, esta dependencia se acentúa en el caso de medir la fluorescencia de las muestras: si se normaliza cada una de las curvas a su máximo, los registros de la absorción proporcionan curvas superpuestas, mientras que en los espectros de emisión se pueden apreciar cambios tanto en la intensidad relativa de los picos (en el caso de usar agua como disolvente) como en la posición del máximo (caso de utilizar cloroformo). Estos cambios en los perfiles de la fluorescencia producida por el compuesto P5 también se confirman al observar el cruce de líneas que aparecen cuando se representan las intensidades de su emisión medida a diferentes longitudes de onda (gráficas interiores de la Figura 19). Todo esto hace pensar que los fenómenos de agregación previamente observados en los perileno precursores P3 y P4 se potencian para el caso de las moléculas de bisperilenomonoimida sintetizadas; además, la ausencia de linealidad entre dichas intensidades de fluorescencia y la correspondiente absorción a la longitud de onda de excitación en prácticamente todo el rango de concentraciones ensayado indica que este compuesto presenta una tendencia muy alta a apilarse, incluso a concentraciones por debajo de 10 μM .

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Por otro lado, los registros UV-Visible confirman las tendencias previas mostradas en la fluorescencia. Las representaciones de la absorción a diferentes longitudes de onda frente a la cantidad de perileno P5 presente en la disolución muestran, para el caso del agua, el comportamiento lineal esperado por la ley de Lambert-Beer hasta alcanzar una concentración de 10 μM , valor límite a partir del cual se aprecien desviaciones positivas de los datos experimentales. Si bien las medidas análogas en cloroformo no muestran dicha tendencia dual, los resultados de esta caracterización demuestran que el derivado bisperileno monoimida tiene una alta tendencia a la agregación molecular en ambos disolventes; este mismo comportamiento en ambos disolvente contrasta con el observado para los otros dos compuestos sintetizados. Así, mientras que las moléculas de P3 y P4 se encuentran independientes en cloroformo o agua, respectivamente, para el caso de P5 ambos disolventes favorecen el apilamiento de sus unidades a medida que aumenta la concentración, un fenómeno molecular que modifica sustancialmente sus propiedades espectroscópicas en función del medio en el que se encuentra disuelta así como su concentración.

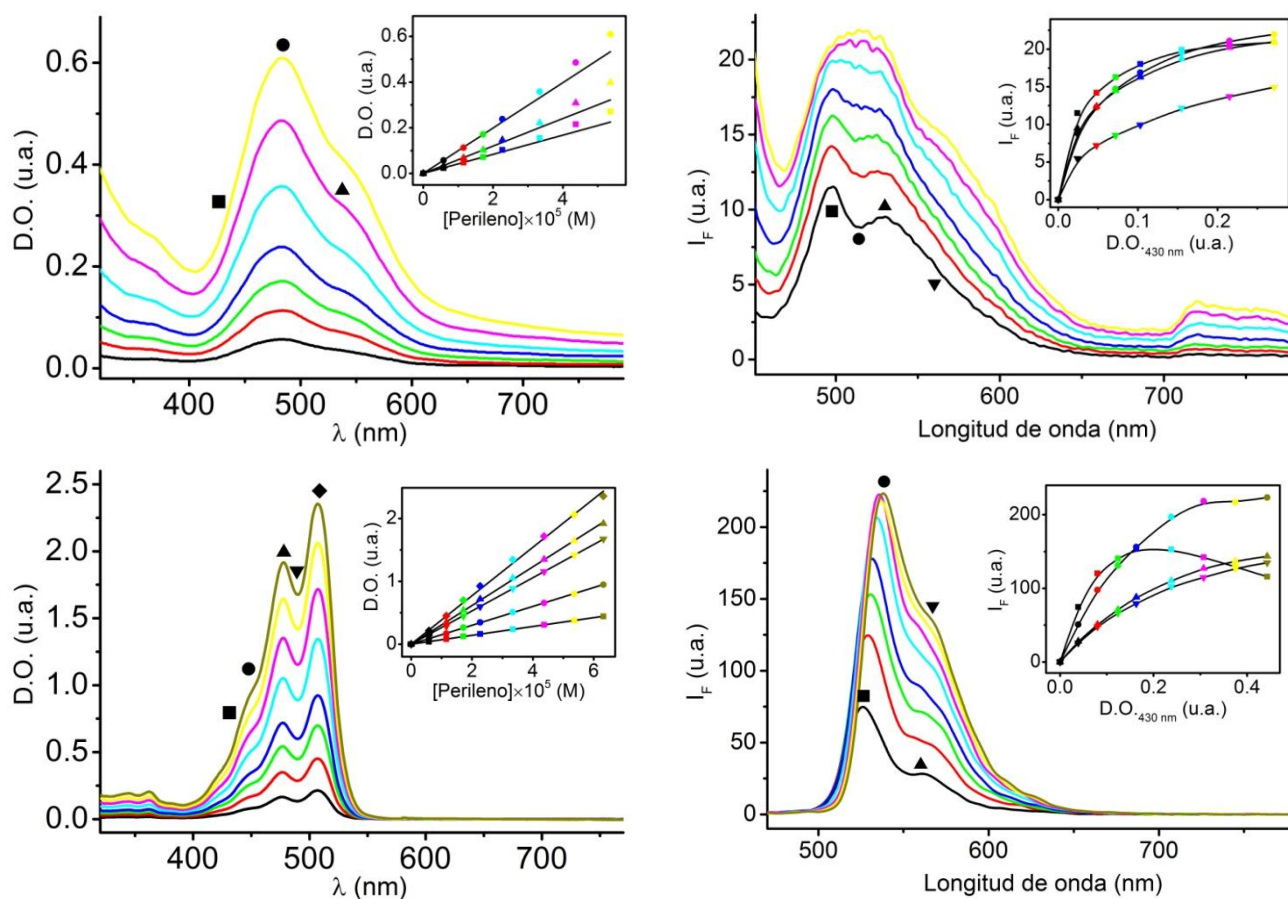


Figura 19. Espectros de absorción (izquierda) y emisión de fluorescencia (derecha) correspondientes a disoluciones del perileno P5 tanto en agua (parte superior) como cloroformo (parte inferior). Todas las gráficas interiores representan las variaciones tanto de la absorbancia como de la fluorescencia correspondientes a cada espectro y a las longitudes de onda indicadas por el mismo código de símbolos y colores.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.6. CARACTERIZACIÓN DE PROPIEDADES FOTOFÍSICAS DE LOS DERIVADOS DE PERILENO SINTETIZADOS EN DIFERENTES DISOLVENTES

Para finalizar la caracterización de los derivados de perileno sintetizados por primera vez en este trabajo como posibles moléculas sensoras fluorescentes con aplicaciones en Biotecnología se realizó un estudio para determinar la influencia del disolvente sobre las propiedades espectroscópicas de dichas moléculas, concretamente la posición de los máximos de absorción (λ_{\max}) y emisión (λ_{em}) de sus espectros UV-Visible y Fluorescencia así como sus eficiencias mediante la determinación de los coeficientes de extinción molar (ϵ) y los rendimientos cuánticos de fluorescencia (Φ_{FL}).

En primer lugar se prepararon disoluciones de los tres compuestos P3, P4 y P5 en disolventes de polaridad creciente y se registraron sus espectros de absorción y emisión, obteniendo los registros que aparecen en la Figura 20. Tal como se puede observar, los tres compuestos presentan el perfil típico que se espera para cualquier derivado de perileno en medios orgánicos apolares como el cloroformo; sin embargo, a medida que se aumenta la polaridad del disolvente, se va perdiendo en general la estructura fina hasta proporcionar unas bandas de absorción más anchas y menos definidas en medio acuoso. Además, se observa que la intensidad relativa de los diferentes picos de absorción varía conforme se produce la transición hacia medios más polares. Este hecho está de acuerdo con los resultados de caracterización previa en el que las distintas moléculas sufren procesos de agregación diferenciales dependiendo de la estructura química y el disolvente. Así, se demuestra que la modificación progresiva del ambiente químico en el que se disuelven los perilenos influye en sus propiedades espectroscópicas a través de las interacciones moleculares que se establecen.

Por otro lado, la influencia que la polaridad del disolvente tiene sobre la capacidad de emitir radiación en forma de fluorescencia también se puede analizar mediante el registro de los correspondientes espectros de emisión para las mismas disoluciones. La Figura 20 también muestra los resultados de estas medidas para los tres perilenos disueltos en cloroformo, etanol, agua y mezclas hidroalcohólicas con diferentes polaridad. Una vez más, el cambio del ambiente en el que se encuentra cualquiera de los tres compuestos aromáticos influye significativamente el perfil de la fluorescencia, pasando de bandas con estructura fina a emisiones menos agudas. Si bien en el caso del derivado tetraéster o el bisperileno P5 se aprecia claramente el desplazamiento progresivo del máximo de emisión hacia longitudes de onda más largas, en el caso del derivado monoanhídrido parece presentar una variación en la intensidad relativa de las emisiones de sus dos picos de fluorescencia. Este hecho puede indicar que, más que un cambio en la agregación molecular, el cambio de disolvente afecta en mayor grado la estructura electrónica de P4, invirtiendo las poblaciones de los niveles excitados desde los que se produce la emisión de la radiación absorbida en forma de fluorescencia.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

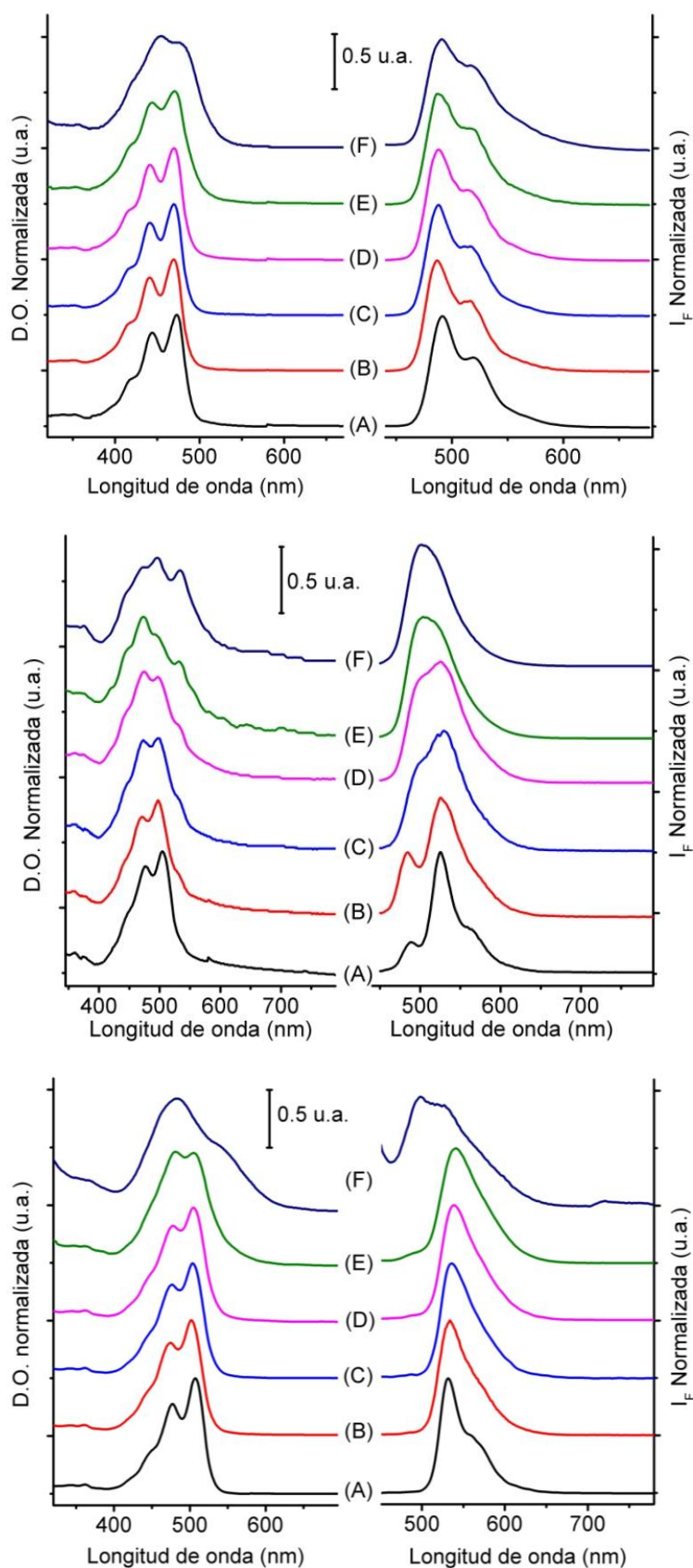


Figura 20. Espectros de absorción (izquierda) y emisión de fluorescencia (derecha) normalizados a sus máximos correspondientes registrados para disoluciones de los derivados de perileno P3 (gráfica superior), P4 (gráfica intermedia) y P5 (gráfica inferior) en cloroformo (A), etanol (B), agua (F) y mezclas etanol:agua en proporción 8:2 (C), 6:4 (D) y 3:7 (E).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aunque cualitativamente se ha comprobado que los tres perilenos P3, P4 y P5 varían sus propiedades espectroscópicas dependiendo de la polaridad del disolvente, un último estudio espectroscópico ha arrojado valores cuantitativos sobre estas tendencias a la agregación. Para ello se registraron los espectros de absorción y emisión para disoluciones de concentración creciente en cada perileno y así determinar, por un lado, la constante de proporcionalidad de las representaciones de Lambert-Beer en los diferentes disolventes y, por otro lado, los rendimientos cuánticos de fluorescencia mediante el método comparativo descrito en la sección 3.2.6., cuyas representaciones se encuentran recogidas en la Figura 21. En ella se puede observar la proporcionalidad directa que existe entre la cantidad de radiación emitida y absorbida por cada una de las diferentes muestras, de forma que la pendiente de cada representación está relacionada tanto con las características experimentales de las medidas como con el rendimiento cuántico de fluorescencia Φ_{FL} . De este modo, conociendo el rendimiento cuántico para el estándar se pueden determinar los valores de las distintas muestras mediante la comparación de la inclinación relativa de las distintas rectas.

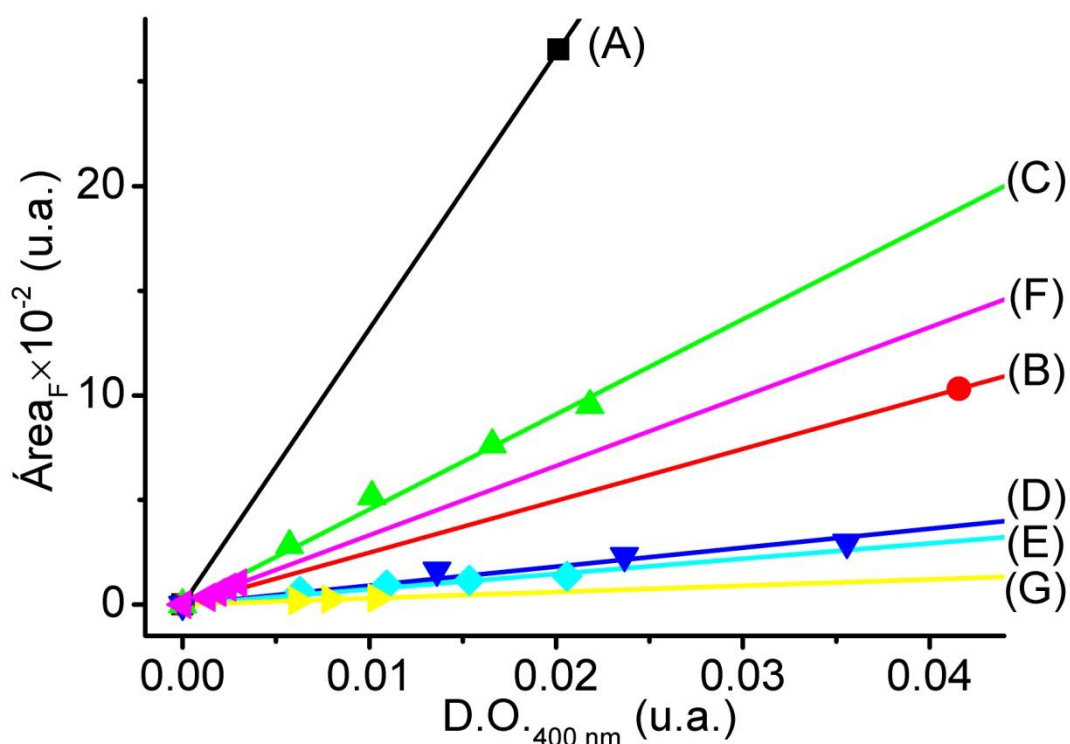


Figura 21. Representación del área bajo el espectro de fluorescencia (Área_F) frente a la absorbión (D.O.) correspondiente a cada una de las disoluciones tanto del patrón (A; PDI en CHCl_3 ; ■) como de los diferentes perilenos sintetizados disueltos en cloroformo (B; P3; ●), (C; P4; ▲), (D; P5; ▼) y en agua (E; P3; ◆), (F; P4; ◆), (G; P5; ◆).

Los resultados numéricos se encuentran resumidos en la Tabla 6, donde se han tabulado los valores que caracterizan tanto a los medios empleados para la disolución de los derivados de perileno (constante dieléctrica e índice de refracción) como de las propiedades espectroscópicas de las

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

moléculas sintetizadas (longitud de máxima absorción, coeficiente de extinción molar, longitud de máxima emisión y rendimiento cuántico de fluorescencia). Si bien la molécula objetivo P5 es la que presenta una mayor absorción de radiación visible, con valores de ϵ un orden de magnitud superior a las otras dos en la mayoría de disolventes, de las tres moléculas con núcleo de perileno sintetizadas en este trabajo es el compuesto que menor cantidad de energía deriva a la emisión de fluorescencia, con valores de Φ_{FL} que van desde la mitad hasta la décima parte de los otros dos compuestos. No obstante, en cualquiera de los tres casos se comprueba la disminución progresiva tanto de la absorción como de la emisión a medida que aumenta la polaridad del medio. Sin embargo, esta pérdida de la capacidad emisiva es mucho más pronunciada en el caso del bisperileno monoimida cuando se compara con las otras dos sustancias. Todo ello apoya las observaciones realizadas previamente sobre los fenómenos de agregación y su efecto en las propiedades espectroscópicas de los tres nuevos derivados de perileno.

Tabla 6. Datos espectroscópicos registrados en diferentes disolventes para los perilenos sintetizados.

DISOLVENTE	PARÁMETROS	P3	P4	P5
CHCl₃ (4.81) ^a (1.450) ^b	λ_{max} (nm)	473	504	507
	ϵ (mol ⁻¹ ·L·cm ⁻¹)	2991	7413	38538
	λ_{em} (nm)	490	529	526
	Φ_{FL}	0.18	0.34	0.07
EtOH (24.50) ^a (1.360) ^b	λ_{max} (nm)	469	497	502
	ϵ (mol ⁻¹ ·L·cm ⁻¹)	2920	4574	28526
	λ_{em} (nm)	487	527	530
	Φ_{FL}	0.14	0.25	0.04
EtOH:H₂O 8:2 (36.86) ^a (1.363) ^b	λ_{max} (nm)	469	499	504
	ϵ (mol ⁻¹ ·L·cm ⁻¹)	2969	4458	30581
	λ_{em} (nm)	487	527	535
	Φ_{FL}	0.14	0.16	0.04
EtOH:H₂O 6:4 (52.86) ^a (1.361) ^b	λ_{max} (nm)	469	474/497 ^c	506
	ϵ (mol ⁻¹ ·L·cm ⁻¹)	3203	3546/3393 ^d	30371
	λ_{em} (nm)	488	524	537
	Φ_{FL}	0.14	0.14	0.03
EtOH:H₂O 3:7 (66.49) ^a (1.352) ^b	λ_{max} (nm)	470	474	481/507 ^c
	ϵ (mol ⁻¹ ·L·cm ⁻¹)	2476	2423	17679/16928 ^e
	λ_{em} (nm)	488/517 ^f	504	539
	Φ_{FL}	0.11	0.12	0.01
H₂O (90.10) ^a (1.333) ^b	λ_{max} (nm)	454	497	483
	ϵ (mol ⁻¹ ·L·cm ⁻¹)	1295	1984	9937
	λ_{em} (nm)	489/520 ^f	506	498/530 ^f
	Φ_{FL}	0.03	0.16	> 0.01

^a Valores de la constante dieléctrica de las disoluciones extraídos de la referencia de Wyman (1931).

^b Valores del índice de refracción (n) de los diferentes disolventes empleados extraídos de la referencia de Scott (1946).

^c Máximos de absorción cuya intensidad relativa varía con la concentración de perileno en disolución.

^d Valores del coeficiente de extinción molar correspondientes a 474 y 497 nm, respectivamente.

^e Valores del coeficiente de extinción molar correspondientes a 481 y 507 nm, respectivamente.

^f Máximos de emisión cuya intensidad relativa varía con la concentración de perileno en disolución.

5. CONCLUSIONES

El diseño de nuevos derivados de perileno fluorescentes con características hidrófilas para su uso como sistemas sensores en el campo de la Biotecnología puede abordarse mediante la incorporación de cadenas oxoetilénicas derivadas de polietilenglicol al núcleo de perilenodihidrido. La introducción mediante síntesis química de este tipo de cadenas polioxigenadas tiene una doble función: por un lado, introducir grupos formadores de enlaces de hidrógeno que aumenten la solubilidad en agua de esta familia de compuestos aromáticos y, por otro lado, crear puntos de reconocimiento molecular que sean capaces de interactuar con analitos diana como los cationes presentes en los fluidos biológicos. De este modo, se han conseguido preparar tres nuevos derivados de perileno con cadenas de dietilenglicol monoetiléter procedentes tanto del derivado bromado (compuesto P1) como tosilado (compuesto P2) en forma de tetraéster (compuesto P3), monoanhídridodiestéer (compuesto P4) y bisperilenomonoimidadiéster (compuesto P5) mediante diferentes reacciones de condensación inter e intramolecular. A pesar de que las etapas de purificación cromatográfica fueron la principal limitación de la ruta sintética para el aislamiento de dichos compuestos, debido principalmente a la alta retención sobre la fase estacionaria de sílice tanto de los reactivos como los productos pegilados, los rendimientos de cada una de las etapas del esquema de síntesis propuesto fueron lo suficientemente elevados como proporcionar las cantidades necesarias para su caracterización mediante diferentes técnicas espectroscópicas. Los tres nuevos perilenos presentan una alta solubilidad tanto en medios orgánicos apolares como en agua, etanol y mezclas hidroalcohólicas; en todos ellos se obtienen disoluciones fuertemente coloreadas capaces de emitir radiación en forma de fluorescencia. Sin embargo, estas propiedades fotofísicas se ven afectadas significativamente no sólo por la polaridad del medio en el que se encuentran las moléculas, sino sobre todo por la concentración de los tres perilenos sintetizados. Esta dependencia ha sido estudiada en profundidad mediante el registro de los espectros de absorción y emisión de disoluciones con concentración creciente de cada derivado de perileno, y se ha comprobado experimentalmente que se debe a fenómenos de agregación molecular de las unidades de perileno mediante apilamiento de sus núcleos aromáticos policíclicos condensados. Así, cualquier modificación de la organización molecular por otras sustancias presentes en el medio producirá variaciones en dichas propiedades espectroscópicas, haciendo posible su detección mediante el uso de estos nuevos compuestos como moléculas sensoras cromo o fluorogénicas; de este modo, la aplicación de los tres nuevos derivados de perileno sintetizados en este trabajo en la detección y cuantificación de biomoléculas de importancia en Biotecnología queda abierta para futuras investigaciones.

6. BIBLIOGRAFÍA

- ALBERT, K.J.; LEWIS, N.S.; SCHAUER, C.L.; SOTZING, G.A.; STITZEL, S.E.; VAID, T.P. & WALT, D.R. (2000). Cross-Reactive Chemical Sensor Arrays. *Chem. Rev.*, 100: 2595.
- ANSLYN, E.V. (2007). Supramolecular Analytical Chemistry. *J. Org. Chem.*, 72: 687.
- ARNAUD, A.; BELLENEY, J.; BOUE, F.; BOUTEILLER, L.; CARROT, G. & WINTGENS, V. (2004). Aqueous Supramolecular Polymer Formed from an Amphiphilic Perylene Derivative. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 43: 1718.
- BERGMANN, N.M. & PEPPAS, N. (2008). Molecular imprinted polymer with specific recognition for macromolecules and proteins. *Prog. Polym. Sci.*, 33: 271.
- BHATTACHARYYA, K. (2003). Solvation Dynamics and Proton Transfer in Supramolecular Assemblies. *Acc. Chem. Res.*, 36: 95.
- BIROS, S. M. & REBEK, J.JR. (2007). Direct transition metal-catalyzed functionalization of heteroaromatic compounds. *Chem. Soc. Rev.*, 36: 93.
- CHEN, B.N.; PILETSKY, S. & TURNER, A. (2002). Molecular recognition: design of "keys". *Comb. Chem. High Throughput Screen*, 5: 409.
- CHEN, Z.J.; ZHANG, Y.L. & HUANG, J.Y. (2004). The labeling of biological big molecule with fluorescence dye and its applications. *Biomed. Eng. Foreign. Med. Sci.*, 27: 34852.
- CRAM, D.J. (1988). The self-assembly and metal-mediated disassembly of a multi-topic [2]pseudorotaxane. *J. Inclusion Phenom.*, 6: 397.
- DANIL DE NAMOR, A.F. (1990). Thermodynamics of host-guest interactions: Solubility enhancements. *Pure Appl. Chem.*, 62: 2121.
- DOONG, R.A.; SHIH, H.M. & LEE, S.H. (2005). Sol-gel-derived array DNA biosensor for the detection of polycyclic aromatic hydrocarbons in water and biological sample. *Sens. Actuators, B*, B111-B112: 323.
- FAN, L.J.; ZHANG, Y.; MURPHY, C.B.; ANGELL, S.E.; PARKER, M.F.; FLYNN, B.R.; JONES & JR.W.E. (2009). Fluorescent conjugated polymer molecular wire chemosensors for transition metal ion recognition and signaling. *Coord. Chem. Rev.*, 253: 410.
- FANG, M.; VETELINO, K.; ROTHERY, M.; HINES, J. & FRYE, G.C. (1999). Detection of organic chemicals by SAW sensor array. *Sens. Actuators, B*, B56: 155.
- FEI, X. & GU, Y. (2009). Progress in modifications and applications of fluorescent dye probe. *Prog. Natur. Sci.*, 19, 1: 1.
- FENG, L. & CHEN, Z. (2007). Screening mercury (II) with selective fluorescent chemosensor. *Sens. Actuators B*, 122: 600.
- GALE, P.A. (2006). Structural and Molecular Recognition Studies with Acyclic Anion Receptors. *Acc. Chem. Res.*, 39: 465.
- GAMEZ, P.; MOOIBROEK, T.J.; TEAT, S.J. & REEDIJK, J. (2007). Anion Binding Involving π -Acidic Heteroaromatic Rings. *Acc. Chem. Res.*, 40: 435.
- GRASER, F. & HÄDICKE, E. (1980). Kristallstruktur und Farbe bei Perylen-3,4:9,10-bis(dicarboximid)-Pigmenten. *Liebigs Ann. Chem*, 1994.
- HE, X.; ZHONG, Z.; GUO, Y.; LV, J.; XU, J.; ZHU, M.; LI, Y.; LIU, H.; WANG, S.; ZHU, Y. & ZHU, D. (2007). Gold Nanoparticle-Based Monitoring of the Reduction of Oxidized to Reduced Glutathione. *Langmuir*, 23: 8815.
- HENRY, M. (2002a). Thermodynamics of Hydrogen Bond Patterns in Supramolecular Assemblies of Water Molecules. *ChemPhysChem.*, 3: 607.
- HENRY, M. (2002b). Nonempirical Quantification of Molecular Interactions in Supramolecular Assemblies. *ChemPhysChem.*, 3: 561.
- HERBST, W.; *Industrial Organic Pigments*, 2nd ed., Wiley-VCH, 1997.
- HUANG, C. & MARDER, S.R. (2011). Perylene-3,4,9,10-tetracarboxylic Acid Diimides: Synthesis, Physical Properties, and Use in Organic Electronics. *J. Org. Chem.*, 76: 2386.

6. BIBLIOGRAFÍA

- HUESMANN, D.; DICAMINE, P.M. & SEFEROS, D.S. (2011). Template-synthesized nanostructure morphology influenced by building block structure. *J. Mater. Chem.*, 21: 408.
- ITO, F.; ARIYOSHI, T.; SOH, N.; KAKIUCHI, T.; INOUE, T.; IMATO, T. & NAGAMURA, T. (2008). Dynamic Behavior of a Fluorescent Probe, a Swallow-tailed Perylene Derivative for Detecting Hydroperoxides. *Chem. Lett.*, 37: 1202.
- KENNEDY, M.J. (1991). The evolution of the word 'biotechnology'. *Trends Biotech.*, 9: 218.
- KILBURN, J.D. & PATEL, H.K. (1994). Synthetic developments in host-guest chemistry. *Contemp. Org. Synth.*, 1: 259.
- KIM, H.N.; GUO, Z.; ZHU, W.; YOON, J. & TIAN, H. (2011). Recent progress on polymer-based fluorescent and colorimetric chemosensors. *Chem. Soc. Rev.*, 40: 79.
- KOVBASYUK, L. & KRAEMER, R. (2004). Allosteric Supramolecular Receptors and Catalysts. *Chem. Rev.*, 104: 3161.
- LANGHALS, H.; DEMMIG, S. & HUBER, H. (1988). Rotational barriers in perylene fluorescent dyes. *Spectrochim. Acta*, 44A: 1189.
- LANGHALS, H.; KAROLIN, J. & JOHANSSON, B.A. (1998). Spectroscopic properties of new and convenient standards for measuring fluorescence quantum yields. *J. Chem. Soc.; Faraday Trans.*, 84: 2919.
- LEHN, J.M. (1985). Supramolecular chemistry: receptors, catalysts, and carriers. *Science*, 227: 849.
- LI, C. & WONNEBERGER, H. (2012). Perylene Imides for Organic Photovoltaics: Yesterday, Today, and Tomorrow. *Adv. Mater.*, 24: 613.
- LIWEI, Y.; LI, Y.; JINGBO, L. & JINGSONG, Y. (2009). A new perylene diimide-based colorimetric and fluorescent sensor for selective detection of Cu²⁺ cation. *Sci. China Ser. B: Chem*, 52: 518.
- MACGILLIVRAY, L.R. & ATWOOD, J.L. (1999). Structural classification and general principles for the design of spherical molecular hosts. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 38: 1018.
- MAKI, T.; SOH, N.; FUKAMINATO, T.; NAKAJIMA, H.; NAKANO, K. & IMATO, T. (2009) Perylenebisimide-linked nitroxide for the detection of hydroxyl radicals. *Anal. Chim Acta*, 639: 78.
- MALLAMACE, F.; EARNSHAW, J.C.; MICALI, N.; TRUSSO, S. & VASI, C. (1996). Dynamics of water confined in non-ionic amphiphiles supramolecular structures. *Physica A*, 231: 207.
- MARTÍNEZ-MÁÑEZ, R. & SACENÓN, F. (2003). Fluorogenic and Chromogenic Chemosensors and Reagents for Anions. *Chem. Rev.*, 103: 4419.
- MEHROTRA, P. (2016). Biosensors and their applications – A review. *J. Oral Biol. Craniofac. Rec.*, 6: 153.
- NORGAARD, K. & BJORNHOLM, T. (2005). Supramolecular chemistry on water-towards self-assembling molecular electronic circuitry. *Chem. Commun.* 2005: 1812.
- OSHOVSKY GENNADY, V.; REINHOUT DAVID, N. & VERBOOM, W. (2007). Supramolecular chemistry in water. *Angew Chem Int Ed Engl.*, 46: 2366.
- OTER, O.; ERTEKIN, K.; KIRILMIS, C.; KOCA, M. & AHMEDZADE, M. (2007). Characterization of a newly synthesized fluorescent benzofuran derivative and usage as a selective fiber optic sensor for Fe(III). *Sensors and Actuators B*, 122: 450.
- PALACIOS, M.A.; NISHIYABU, R.; MARQUEZ, M. & ANZENBACHER, P. JR. (2007). Supramolecular Chemistry Approach to the Design of a High-Resolution Sensor Array for Multianion Detection in Water. *J. Am. Chem. Soc.*, 129: 7538.
- PENEVA, K.; MIHOV, G.; NOLDE, F.; ROCHA, S.; HOTTA, J.; BRAECKMANS, K.; HOFKENS, J.; UJI-I, H.; HERRMANN, A. & MÜLLEN, K. (2008a). Water-Soluble Monofunctional Perylene and Terrylene Dyes: Powerful Labels for Single-Enzyme Tracking. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 47: 3372.
- PENEVA, K.; MIHOV, G.; HERRMANN, A.; ZARRABI, N.; BÖRSCH, M.; CUNCAN, T.M. & MÜLLEN, K. (2008b). Exploiting the Nitrilotriacetic Acid Moiety for Biolabeling with Ultrastable Perylene Dyes. *J. Am. Chem. Soc.*, 130: 5398.
- RYE, H.S.; YUE, S. & WEMMER, D.E. (1992). Stable fluorescent complexes of double-stranded DNA with bis-intercalating asymmetric cyanine dyes: properties and applications. *Nucleic Acids Res*, 20: 280312.
- SCOTT, T.A.JR. (1946). Refractive Index of Ethanol–Water Mixtures and Density and Refractive Index of Ethanol–Water–Ethyl Ether Mixtures. *J. Phys. Chem.*, 50: 406.

6. BIBLIOGRAFÍA

- SCHNEIDER, M.; HAGEN, J.; HAARER, D. & MÜLLEN, K. (2000). Novel Electroluminescent Devices Based on Perylene-Doped Sol–Gel Layers. *Adv. Mater.*, 12: 351.
- SCHOTTEL, B.L.; CHIFOTIDES, H.T. & DUNBAR, K.R. (2008). Anion- π interactions. *Chem. Soc. Rev.*, 37: 68.
- SECRETARIAT OF THE CONVENTION ON BIOLOGICAL DIVERSITY (2005). *Handbook of the Convention on Biological Diversity Including its Cartagena Protocol on Biosafety*, 3rd edition, Montreal, Canada.
- SOH, N.; ARIYOSHI, T.; FUKAMINATO, T.; NAKANO, K.; IRIE, M. & IMATO, T. (2006). Novel fluorescent probe for detecting hydroperoxides with strong emission in the visible range. *Biorg. Med. Chem. Lett.*, 16: 2943.
- SOH, N.; ARIYOSHI, T.; FUKAMINATO, T.; NAKAJIMA, H.; NAKANO, K. & IMATO, T. (2007). Swallow-tailed perylene derivative: a new tool for fluorescent imaging of lipid hydroperoxides. *Biomol.Chem.*, 5: 3762.
- WANG, B. & YU, C. (2010). Fluorescence turn-on detection of a protein through the reduced aggregation of a perylene probe. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 49: 1485.
- WANG, L.Q. & PENG, X.J.(2002). 3^H-Indocarbocyanine dyes for bioanalysis. *Dyestuffs Ind.*, 39: 812.
- WILLIAMS, A.T.R.; WINFIELD, S.A. & MILLER, J.N. (1983). Relative fluorescence quantum yields using a computer-controlled luminescence spectrometer. *Analyst*, 108: 1067.
- WITTMAYER, P.; TRASER, S.; SANDER, R.; SONDERGELD, K.B.; UNGEFUG, A.; WEISS, R. & REHAHN, M. (2016). Toward Truly Water-Soluble Rodlike Polyelectrolytes: Synthesis of Poly(*para*-phenylenes) Wrapped in Ethylene Oxide and Amino Side Groups. *Macromol. Chem. Phys.*, 217: 1473.
- WÜRTHNER, F. (2004). Perylene bisimide dyes as versatile building blocks for functional supramolecular architectures. *Chem. Commun.*, 1564.
- WYMAN, J. (1931). The dielectric constant of mixtures of ethyl alcohol and water from -5 to 40°. *J. Am. Chem. Soc.*, 53: 3292.
- XUE, C.; SUN, R.; ANNAB, R.; ABADI, D. & JIN, S. (2009). Perylene monoanhydride diester: a versatile intermediate for the synthesis of unsymmetrically substituted perylene tetracarboxylic derivatives. *Tetrahedron Letters*, 50: 853.
- ZUGENMAIER, P.; DUFF, J. & BLUHM, T.L. (2000). Crystal and Molecular Structures of Six Differently with Halogen Substituted Bis (benzylimido) perylene. *Cryst. Res. Technol.*, 35: 1095.