

UCH-FC,
DOC - Química
g.216
c.1



**DISEÑO Y SINTESIS DE SONDAS
FLUORESCENTES SELECTIVAS PARA Fe Y
EVALUACION DE SU ACTIVIDAD *IN VITRO* EN
LINEAS CELULARES**

**TESIS
ENTREGADA A LA
UNIVERSIDAD DE CHILE
EN CUMPLIMIENTO PARCIAL DE LOS REQUISITOS
PARA OPTAR AL GRADO DE
DOCTOR EN QUIMICA**

FACULTAD DE CIENCIAS

OLIMPO JOSE GARCIA BELTRAN

Enero, 2012

**Director de Tesis: Dr. BRUCE K. CASSELS NIVEN
Co-Director de Tesis: Dr. MARCO T. NUÑEZ**



“Este trabajo se lo dedico con mucho amor a la memoria de mi padre Alberto y a mi querida madre Yenny, a mi amada esposa Paola y mi hermoso hijo Martín, a mis hermanos Wilmer, Johanna y Aldemar, a toda mi familia que tanto me ha apoyado”

BIOGRAFIA



Olimpo José García Beltrán nació en Sincelejo-Colombia el 22 de mayo de 1975. Comenzó sus estudios de pregrado en el año 1994 en la Facultad de Educación y Ciencias de la Universidad de Sucre, obteniendo el título de Biólogo con Enfoque en Biotecnología en Julio de 2000. Su trabajo de grado consistió en el estudio químico del extracto etéreo de la corteza de *Celtis trinervia* Lam (Ulmaceae) y evaluación de la actividad tóxica y antifúngica. En el año 2001 ingresó al programa de Magíster en Ciencias Químicas de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia, en el laboratorio de Química de Rutaceae y Myristicaceae de Colombia desarrollando el trabajo estudio químico de los extractos etanólicos de hojas, corteza y madera de *Esenbeckia alata* (Rutaceae), actividades biológicas y estudio etnobotánico de cinco familias de Montes de María, obteniendo el grado de Magister en abril de 2004. En el año 2007 ingresó al Programa de Doctorado en Química de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile. Aquí desarrolló el trabajo de tesis en diseño y síntesis de sondas fluorescentes selectivas para Fe y evaluación de su actividad *in vitro* en líneas celulares, en el laboratorio de Química Biodinámica, con la orientación del Dr. Bruce K. Cassels Niven y la Co-Dirección del Dr. Marco T. Núñez.



AGRADECIMIENTOS

Llegando al final de esta experiencia se me vienen a la mente una gran cantidad de entidades y personas, que de una u otra forma aportaron al desarrollo y término de este proyecto.

A **Paola** por entregarme su inmenso amor, comprensión y paciencia. Por darme el ánimo necesario para seguir adelante y superar los momentos difíciles que fueron muchos, por dejar todo lo que había construido en Colombia y venir a esta aventura.

Mis más sinceros agradecimientos a la **República de Chile** por brindarme una morada durante los últimos cinco años, y a la **Universidad de Chile** por formarme.

Con especial cariño quisiera agradecer a mi director de tesis, Prof. Dr. **Bruce K. Cassels Niven**, por darme la oportunidad de ser formado bajo su dirección y creer en mí, trayendo muchas enseñanzas personales y académicas. Agradezco profundamente el gran apoyo intelectual el que fue un aporte invaluable no solo para el desarrollo de esta tesis, sino que también a mi desarrollo como investigador. Además le doy gracias por todo el tiempo invertido, escuchándome cada vez que fue necesario.

Quiero agradecer al Prof. Dr. **Marco T. Nuñez**, codirector de tesis, por su interés y confianza en mí como alumno, sin su inmensa colaboración esta tesis no hubiera sido posible. Destaco su gran contribución en ideas y discusiones.

A los miembros de la comisión: **Nicolás Yutronic**, por su confianza, amistad y estímulo a seguir adelante brindándome todo el apoyo necesario. **Carlos D. Pessoa**, por su orientación y aportes que contribuyeron de manera muy apropiadas al desarrollo de este trabajo. **Aurelio San Martín**, agradezco su valor humano, amistad y su gran apoyo para que esta tesis fuera culminada con éxito y **Víctor Vargas** por su tiempo, disponibilidad, amistad, aportes y orientación.

A mis amigos del doctorado que siempre me han valorado como persona: **Darwin Burgos, William Tiznado, Carlos Areche, Claudio Pérez y Camilo García.**

A mis compañeros y amigos de laboratorio y grupo de investigación, les agradezco por su compañía en el diario andar de estos 56 meses, haciendo de nuestro lugar de trabajo un espacio más entretenido y distendido para investigar. **Manuel Morales, Susan Lühr, Marcelo Vilchez, Edwin Pérez, Vicente Castro, Carolina Méndez, Marcos Rebolledo, Patricio Iturriaga, Angélica Fierro, Gerald Zapata, Irux Almodóvar y Luis Reyes.**

A **Natalia Mena**, por su colaboración en el diseño y ejecución de ensayos biológicos.

A **Paulina Pavez y Margarita Aliaga** por escucharme y brindarme su apoyo en momentos muy difíciles.

A **Frank H. Quina, José Carlos Netto-Ferreira y Leidi C. Friedrich** del Instituto de Química de la Universidad de Sao Paulo por su colaboración y confianza.

Agradezco a la Vicerrectoría de Asuntos Académicos de la Universidad de Chile, por haberme favorecido con la beca de estancias cortas de investigación, con la cual fue posible una estadía en la Universidad de Sao Paulo.

Agradezco a CONICYT por el aporte entregado durante los años 2009-2011 mediante su beca nacional de doctorado. A todos, muchas gracias.

Finalmente, mis más sinceros agradecimientos al Instituto de Dinámica Celular y Biotecnología (**ICDB**) por su beca doctoral entre los años 2007-2009, y su apoyo económico para poder culminar este trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE GRÁFICOS	xv
LISTA DE TABLAS	xviii
LISTA DE ESQUEMAS	xix
ABREVIATURAS	xx
RESUMEN	xxiii
ABSTRACT	xxv
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1. Conceptos de fluorescencia	7
2.2. Diseño de quimiosensores	9
2.3. Métodos espectroscópicos de fluorescencia	9
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	30
3.1. HIPÓTESIS	31
3.2. OBJETIVOS	32
4. METODOLOGÍA	33
4.1. MATERIALES Y MÉTODOS	34
4.2. SÍNTESIS DE COMPUESTOS	36
4.2.1. Procedimiento A; Preparación de 2,4-dihidroxibenzaldehido	36
4.2.2. Procedimiento B; preparación de 2-hidroxi-4-metoxibenzaldehido	36
4.2.3. Procedimiento C; preparación de 3,4-dihidroxibenzaldehido	37
4.2.4. Procedimiento D; preparación de malonato de difenilo	38
4.2.5. Procedimiento E; preparación de 5-nitro-1,10-fenantrolina	38
4.2.5.1. 5-Amino-1,10-fenantrolina	39
4.2.6. Procedimiento F; preparación de bromuro de (5-carboxipentil)- trifenilfosfonio (53)	40
4.3. SÍNTESIS DE CUMARINAS Y DERIVADOS	41

4.3.1. Procedimiento G; preparación de 7-hidroxi-2-oxo-2 <i>H</i> -cromen-3-carboxilato de etilo (54)	41
4.3.2. 7-Metoxi-2-oxo-2 <i>H</i> -cromen-3-carboxilato de etilo (55)	42
4.3.3. Procedimiento H; preparación de ácido-7-hidroxi-2-oxo-2 <i>H</i> -cromen-3-carboxílico (56)	42
4.3.3.1. Método Ha	42
4.3.3.2. Método Hb	43
4.3.4. 3-Acetil-7-hidroxi-2 <i>H</i> -cromen-2-ona (57)	43
4.3.5. 3-Acetil-7-metoxi-2 <i>H</i> -cromen-2-ona (58)	44
4.3.6. 3-Acetil-2 <i>H</i> -cromen-2-ona (59)	44
4.3.7. 2-Oxo-2 <i>H</i> -cromen-3-carboxilato de etilo (60)	45
4.3.8. 7-Hidroxi-2-oxo-2 <i>H</i> -cromen-3-carboxilato de fenilo (61)	45
4.3.9. Procedimiento I; preparación de 3-amino-7-hidroxi-2 <i>H</i> -cromen-2-ona (63)	46
4.3.10. Procedimiento J; preparación de 2-(7-hidroxi-2-oxo-2 <i>H</i> -cromen-4-il)-acetato de etilo (64)	47
4.3.11. 2-(7-Hidroxi-2-oxo-2 <i>H</i> -cromen-4-il)-acetato de etilo (65)	48
4.3.12. Procedimiento K; preparación de 4-clorometil-7-hidroxi-2 <i>H</i> -cromen-2-ona (66)	48
4.3.13. 4-Clorometil-7-metoxi-2 <i>H</i> -cromen-2-ona (67)	49
4.3.14. 4-Hidroximetil-7-hidroxi-2 <i>H</i> -cromen-2-ona (68)	50
4.3.15. 5,7-Dihidroxi-4-metil-2 <i>H</i> -cromen-2-ona (69)	50
4.3.16. 7-Hidroxi-4-metil-2 <i>H</i> -cromen-2-ona (70)	51
4.3.17. Procedimiento L; preparación de 6-bromohexanoato de 4-(2-etoxi-2-oxoetil)-2-oxo-2 <i>H</i> -cromen-7-ilo (71)	51
4.3.18. 6-Bromohexanoato de 3-acetil-2-oxo-2 <i>H</i> -cromen-7-ilo (72)	52
4.4. CUMARINAS DERIVADAS CON TRIS(HIDROXIMETIL)AMINOMETANO	53
4.4.1. Procedimiento M. Preparación de <i>N</i> -(1,3-dihidroxi-2-(hidroximetil)propan-2-il)-2-(7-hidroxi-2-oxo-2 <i>H</i> -cromen-4-il)acetamida (Q51)	

y 2-amino-3-hidroxi-2-(hidroximetil)propil 2-(7-hidroxi-2-oxo-2 <i>H</i> - cromen-4-il)acetato (Q52).	53
4.4.2. Síntesis de <i>N</i> -(1,3-dihidroxi-2-(hidroximetil)propan-2-il)-7- hidroxi-2-oxo-2 <i>H</i> -cromen-3-carboxamida (Q53)	54
4.5. DERIVADOS DE (3 <i>E</i>)-3-(BENCILIDENAMINO)-2 <i>H</i> -CROMEN-2-ONA (BS)	55
4.5.1. Procedimiento M. (<i>E</i>)-7-Hidroxi-3-(2-hidroxibencilidenamino)-2 <i>H</i> - cromeno-2-ona (BS-1)	55
4.5.2. (<i>E</i>)-7-Hidroxi-3-(2-metoxibencilidenamino)-2 <i>H</i> -cromen-2-ona (BS-2)	56
4.5.3. (<i>E</i>)-7-Hidroxi-3-(2-hidroxi-3-metoxibencilidenamino)-2 <i>H</i> -cromen-2-ona (BS-3)	57
4.5.4. (<i>E</i>)-3-(2,3-Dimetoxibencilidenamino)-7-hidroxi-2 <i>H</i> -cromen-2-ona (BS-4)	57
4.5.5. (<i>E</i>)-3-(2,4-Dihidroxibencilidenamino)-7-hidroxi-2 <i>H</i> -cromen-2-ona (BS-5)	58
4.5.6. (<i>E</i>)-4-((7-Hidroxi-2 <i>H</i> -cromen-2-on-3-ilimino)metil)fenil- <i>N,N</i> - dimetiltioncarbamato (BS-6)	59
4.5.7. (<i>E</i>)-3-(2,5-Dimetoxibencilidenamino)-7-hidroxi-2 <i>H</i> -cromen-2-ona (BS-7)	59
4.6. DERIVADOS DE 3-((<i>E</i>)-3-FENILACRILIL)-2 <i>H</i> -CROMEN-2-ONA (Ch-C)	61
4.6.1. Procedimiento M. Preparación de 3-cinamil-7-metoxi-2 <i>H</i> -cromen-2-ona (Ch-C1)	61
4.6.2. (<i>E</i>)-3-(3-(2-Hidroxifenil)acrilil)-7-metoxi-2 <i>H</i> -cromen-2-ona (Ch-C2)	62
4.6.3. (<i>E</i>)-3-(3-(3-Hidroxifenil)acrilil)-7-metoxi-2 <i>H</i> -cromen-2-ona (Ch-C3)	63
4.6.4. (<i>E</i>)-3-(3-(4-Hidroxifenil)acrilil)-7-metoxi-2 <i>H</i> -cromen-2-ona (Ch-C4)	63
4.6.5. (<i>E</i>)-7-Metoxi-3-(3-(2-metoxifenil)acrilil)-2 <i>H</i> -cromen-2-ona (Ch-C5)	64
4.6.6. (<i>E</i>)-7-Metoxi-3-(3-(3-metoxifenil)acrilil)-2 <i>H</i> -cromen-2-ona (Ch-C6)	65
4.6.7. (<i>E</i>)-7-Metoxi-3-(3-(4-metoxifenil)acrilil)-2 <i>H</i> -cromen-2-ona (Ch-C7)	65
4.6.8. (<i>E</i>)-7-Metoxi-3-(3-(4-etoxifenil)acrilil)-2 <i>H</i> -cromen-2-ona (Ch-C8)	66
4.6.9. (<i>E</i>)-7-Metoxi-3-(3-(4-(metiltio)fenil)acrilil)-2 <i>H</i> -cromen-2-ona (Ch-C9)	67
4.6.10. (<i>E</i>)-3-(3-(4-(Dimetilamino)fenil)acrilil)-7-metoxi-2 <i>H</i> -cromen-2-ona (Ch-C10)	67

4.6.11. (<i>E</i>)-3-(3-(2,3-Dimetoxifenil)acrilil)-7-metoxi-2 <i>H</i> -cromen-2-ona (Ch-C11)	68
4.6.12. (<i>E</i>)-3-(3-(2,5-Dimetoxifenil)acrilil)-7-metoxi-2 <i>H</i> -cromen-2-ona (Ch-C12)	69
4.6.13. (<i>E</i>)-3-(3-(3,4-Dimetoxifenil)acrilil)-7-metoxi-2 <i>H</i> -cromen-2-ona (Ch-C13)	69
4.6.14. (<i>E</i>)-3-(3-(Benzo[<i>d</i>][1,3]dioxol-5-il)acrilil)-7-metoxi-2 <i>H</i> -cromen-2-ona (Ch-C14)	70
4.7. DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL CRISTALOGRÁFICA	70
4.8. FOTOFÍSICA	71
4.8.1. Excitación	71
4.8.2. Estudio de fluorescencia y estudio de afinidad por iones metálicos	71
4.8.3. Calculo de rendimiento cuántico (Φ)	72
4.8.4. Desactivación de la fluorescencia	72
4.8.5. Determinación de las constantes de asociación	72
4.8.6. Determinación de la estequiometría de asociación	73
4.9. BIOLOGÍA	74
4.9.1. Cultivo celular para la determinación de Fe	74
4.9.1.1. Condiciones de cultivo	74
4.9.1.2. Fluorescencia basal	74
4.9.2. Cultivo celular e imagenología de fluorescencia para determinación de Cu ⁺²	74
4.9.3. Cultivo celular e imagenología de fluorescencia para determinación de tioles endógenos	75
5. RESULTADOS Y DISCUSION	76
5.1. SINTESIS	77
5.1.1. Ruta sintética para obtener los derivados de TRIS	82
5.1.2. Ruta sintética para obtener derivados de (3 <i>E</i>)-3-(bencilidenamino)-2 <i>H</i> - cromen-2-ona	86
5.1.3. Ruta sintética para obtener derivados de ((3-((<i>E</i>)-3-fenilacrilil)-2 <i>H</i> -	

cromen-2-ona)	90
5.2. FOTOFÍSICA	95
5.2.1. Estudio fotofísico de <i>N</i> -(1,3-dihidroxi-2-(hidroximetil)propan-2-il)-2-(7-hidroxi-2-oxo-2 <i>H</i> -cromen-4-il)acetamida (Q51)	95
5.2.2. Estudio fotofísico de 2-amino-3-hidroxi-2-(hidroximetil)propil-2-(7-hidroxi-2-oxo-2 <i>H</i> -cromen-4-il)acetato (Q52)	102
5.2.3. Estudio fotofísico de <i>N</i> -(1,3-dihidroxi-2-(hidroximetil)propan-2-il)-7-hidroxi-2-oxo-2 <i>H</i> -cromen-3-carboxamida (Q53)	110
5.2.4. Estudio fotofísico de (3 <i>E</i>)-3-(2,5-dimetoxibencilidenimino)-7-hidroxi-2 <i>H</i> -cromen-2-ona (BS-7)	119
5.2.5. Estudio fotofísico de 3-cinamoil-7-metoxi-2 <i>H</i> -cromen-2-ona (Ch-C1)	130
5.3. APLICACIONES BIOLÓGICAS	132
5.3.1. <i>N</i> -(1,3-Dihidroxi-2-(hidroximetil)propan-2-il)-2-(7-hidroxi-2-oxo-2 <i>H</i> -cromen-4-il)acetamida (Q51)	132
5.3.2. 2-Amino-3-hidroxi-2-(hidroximetil)propil-2-(7-hidroxi-2-oxo-2 <i>H</i> -cromen-4-il)acetato (Q52)	136
5.3.3. <i>N</i> -(1,3-Dihidroxi-2-(hidroximetil)propan-2-il)-7-hidroxi-2-oxo-2 <i>H</i> -cromen-3-carboxamida (Q53)	139
5.3.4. (3 <i>E</i>)-3-(2,5-Dimetoxibencilidenamino)-7-hidroxi-2 <i>H</i> -cromen-2-ona (BS-7)	142
5.3.5. 3-Cinamoil-7-metoxi-2 <i>H</i> -cromeno-2-ona (Ch-C1)	143
6. CONCLUSIONES	145
7. REFERENCIAS	148
8. ANEXOS	160

APENDICES.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Metabolismo del hierro en la célula	6
Figura 2.	Diagrama de Jablonski	8
Figura 3.	Funcionamiento de un quimiosensor intrínseco	10
Figura 4.	Funcionamiento de un quimiosensor conjugado	11
Figura 5.	Clase de quimiosensores conjugados	12
Figura 6.	Espectros característicos de 7-hidroxycumarinas sustituidas en C-3 y C-4	77
Figura 7.	Estructura cristalina de 54	81
Figure 8.	Espectros de ^1H RMN señal mostrando las señales de los protones amídicos de los compuestos Q51 y Q53	84
Figura 9.	Espectro de ^1H RMN de BS , destacando la señal del protón de la imina	88
Figura 10.	Espectro de ^1H RMN destacando las señales de los protones vecinos al carbonilo del fragmento cinamilo de los compuestos Ch-C	91
Figura 11.	Modo de unión propuesto de Q53 y Fe	116
Figura 12.	(A) Fotografía de cambio colorimétrico de BS-7 en presencia Cu^{+2} . (B) Fotografía de la fluorescencia de BS-7 en ausencia y presencia de Cu^{+2}	123
Figura 13.	(A) Espectros ^1H RMN de BS-7 en ausencia de Cu^{+2} , (B) Espectros de BS-7 en presencia de Cu^{+2}	126
Figura 14.	Cambio en el espectro parcial de ^1H RMN Ch-C1 (20 mM) con adición de ME (10 equiv.) en $\text{DMSO}-d_6$ at 25 °C. (A) Solamente Ch-C1 ; (B) Ch-C1 + ME, 10 min	131
Figura 15.	Cambio de fluorescencia del quelante Q51 en células SH-SY5Y	132
Figura 16.	Efecto de Zn^{+2} sobre la fluorescencia del quelante Q51 en células SH-SY5Y	133
Figura 17.	Efecto de Cu^{+2} sobre la fluorescencia del quelante Q51 en	

	células SH-SY5Y	133
Figura 18.	Cambio de fluorescencia de células SH-SY5Y tratadas con Q51 , diferentes fuentes de hierro y bipyridilo. Objetivo 63X	134
Figura 19.	Células SH-SY5Y con Q51 (5 μ M), objetivo 63X	135
Figura 20.	(A) Células SH-SY5Y tratadas con mito-tracker, (B) Células SH-SY5Y tratadas con Q51 (5 μ M), (C) Co-marcaje. Objetivo 63X	135
Figura 21.	(A) Células SH-SY5Y tratadas con diferentes concentraciones de Q51 . Objetivo 63X	136
Figura 22.	Cambios de fluorescencia del quelante Q52 en células SH-SY5Y	137
Figura 23.	Cambio de fluorescencia de células SH-SY5Y tratadas con Q51 , diferentes fuentes de hierro y bipyridilo. Objetivo 63X	137
Figura 24.	Células SH-SY5Y con Q52 (5 μ M), objetivo 63X	138
Figura 25.	(A) Células SH-SY5Y tratadas con mito-tracker, (B) Células SH-SY5Y tratadas con Q52 (5 μ M), (C) Co-marcaje. Objetivo 63X	138
Figura 26.	Cambio de fluorescencia del quelante Q53 en células SH-SY5Y	139
Figura 27.	Efecto de Zn^{+2} sobre la fluorescencia del quelante Q53 en células SH-SY5Y	139
Figura 28.	Efecto de Cu^{+2} sobre la fluorescencia del quelante Q53 en células SH-SY5Y	140
Figura 29.	Cambio de fluorescencia de células SH-SY5Y tratadas con Q51 , diferentes fuentes de hierro y bipyridilo. Objetivo 63X	140
Figura 30.	Células SH-SY5Y con Q53 (5 μ M), objetivo 63X	141
Figura 31.	(A) Células SH-SY5Y tratadas con mito-tracker, (B) Células SH-SY5Y tratadas con Q52 (5 μ M), (C) Co-marcaje. Objetivo 63X	141
Figura 32.	Cambio de fluorescencia del quelante BS-7 en células	

	SH-SY5Y	142
Figura 33.	(A) Células SH-SY5Y con sonda BS-7 (10 μ M, 20 min).	
	(B) Células SH-SY5Y incubadas con Cu-His (200 μ M, 15 min)	143
Figura 34.	La fluorescencia de Ch-C1 en células SH-SY5Y incrementada por tratamiento con NAC o Cys	144
Figura 35.	Reacción de ChC1 con biotioles (RSH)	144

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1.	Espectro de absorción de Q51 10 μM en solución acuosa Buffer HEPES pH 7,2	96
Gráfico 2.	Espectro de fluorescencia de Q51 10 μM en solución acuosa Buffer HEPES pH 7,2	96
Gráfico 3.	Espectros de fluorescencia de Q51 20 μM en presencia de diferentes iones a 200 μM en solución acuosa Buffer HEPES pH 7,2	97
Gráfico 4.	Espectros de fluorescencia de Q51 20 μM en presencia de 0-200 μM Fe^{+2} en solución acuosa Buffer HEPES pH 7,2	98
Gráfico 5.	Espectros de fluorescencia de Q51 20 μM en presencia de 0-200 μM Fe^{+3} en solución acuosa Buffer HEPES pH 7,2	98
Gráfico 6.	Análisis de selectividad de iones con Q51 . La concentración de todos los iones a 200 μM	99
Gráfico 7.	Gráfico de Stern-Volmer para Q51 en presencia de Fe^{+2}	100
Gráfico 8.	Gráfico de Stern-Volmer para Q51 en presencia de Fe^{+3}	100
Gráfico 9.	Gráfico de Banesi-Hildebrand para Q51 en presencia de Fe^{+2}	101
Gráfico 10.	Gráfico de Banesi-Hildebrand para Q51 en presencia de Fe^{+3}	101
Gráfico 11.	Espectro de absorción de Q52 10 μM en solución acuosa Buffer HEPES pH 7,2	102
Gráfico 12.	Espectro de fluorescencia de Q52 10 μM en solución acuosa Buffer HEPES pH 7,2	103
Gráfico 13.	Espectros de fluorescencia de Q52 20 μM con diferentes iones 200 μM a 0 minutos, en solución acuosa Buffer HEPES pH 7,2	104
Gráfico 14.	Espectros de fluorescencia de Q52 20 μM con diferentes iones 200 μM a 15 minutos, en solución acuosa Buffer HEPES pH 7,2	104
Gráfico 15.	Espectros de fluorescencia de Q52 20 μM con 0-200 μM Hg^{+2} a 0 minutos, en solución acuosa Buffer HEPES pH 7,2	105
Gráfico 16.	Espectros de fluorescencia de Q52 20 μM con 0-200 μM de Hg^{+2} a 5 minutos, en solución acuosa Buffer HEPES pH 7,2	105

Gráfico 17.	Espectro de fluorescencia de Q52 20 μM con 0-200 μM de Hg^{+2} a 10 minutos, en solución acuosa Buffer HEPES pH 7,2	106
Gráfico 18.	Espectros de fluorescencia de Q52 20 μM con 0-200 μM Fe^{+2} en solución acuosa Buffer HEPES pH 7,2	106
Gráfico 19.	Espectros de fluorescencia de Q52 20 μM con 0-200 μM Fe^{+3} en solución acuosa Buffer HEPES pH 7,2	107
Gráfico 20.	Análisis de selectividad de iones con Q52 . La concentración de todos los iones a 200 μM	108
Gráfico 21.	Gráfico de Stern-Volmer para Q52 en presencia de Fe^{+2}	108
Gráfico 22.	Gráfico de Stern-Volmer para Q52 en presencia de Fe^{+3}	109
Gráfico 23.	Gráfico de Banesi-Hildebrand para Q52 en presencia de Fe^{+2}	109
Gráfico 24.	Espectro de absorción de Q53 10 μM en solución acuosa Buffer HEPES pH 7,2	110
Gráfico 25.	Espectro de emisión de Q53 10 μM en solución acuosa Buffer HEPES pH 7,2	111
Gráfico 26.	Espectros de fluorescencia de Q53 20 μM con diferentes iones 200 μM en solución acuosa Buffer HEPES pH 7,2	111
Gráfico 27.	Espectros de fluorescencia de Q53 20 μM con 0-200 μM Fe^{+2} en solución acuosa Buffer HEPES pH 7,2	112
Gráfico 28.	Espectros de fluorescencia de Q53 20 μM con 0-200 μM Fe^{+3} en solución acuosa Buffer HEPES pH 7,2	113
Gráfico 29.	Análisis de selectividad de iones con Q53 . La concentración de todos los iones a 200 μM	113
Gráfico 30.	Gráfico de Stern-Volmer para Q53 en presencia de Fe^{+2}	114
Gráfico 31.	Gráfico de Stern-Volmer para Q53 en presencia de Fe^{+3}	114
Gráfico 32.	Gráfico de Banesi-Hildebrand para Q53 en presencia de Fe^{+2}	115
Gráfico 33.	Gráfico de Banesi-Hildebrand para Q53 en presencia de Fe^{+3}	115
Gráfico 34.	Espectro de absorción de BS-7 10 μM en acetonitrilo	119
Gráfico 35.	Espectro de fluorescencia de BS-7 20 μM en acetonitrilo	120
Gráfico 36.	Espectros de absorción de BS-7 10 μM con diferentes iones	

	200 μM en acetonitrilo	120
Gráfico 37.	Espectros de absorción de BS-7 10 μM con Cu^{+2} 0- 200 μM en acetonitrilo	121
Gráfico 38.	Espectros de fluorescencia de BS-7 20 μM con diferentes iones 200 μM excitando a 380 nm en acetonitrilo	122
Gráfico 39.	Espectros de fluorescencia de BS-7 20 μM con 0-200 μM Cu^{+2} excitando a 380 nm en acetonitrilo	122
Gráfico 40.	Análisis de selectividad de iones con BS-7 . La concentración de todos los iones a 200 μM	123
Gráfico 41.	Espectros de fluorescencia de BS-7 20 μM con 0-200 μM Cu^{+2} excitando a 350 nm en acetonitrilo	124
Gráfico 42.	Espectro de absorción de 63 10 μM en acetonitrilo	125
Gráfico 43.	Espectros de fluorescencia de 63 10 μM con 0-200 μM Cu^{+2} en acetonitrilo	125
Gráfico 44.	Diagrama Benesi-Hildebrand de BS-7 con Cu^{+2}	128
Gráfico 45.	Diagrama de Job de cambios en la intensidad de fluorescencia variando la relación molar de BS-7 y Cu^{+2} . ($[\text{BS-7} + \text{Cu}^{+2}] = 100.0 \mu\text{M}$ en acetonitrilo/ H_2O)	128
Gráfico 46.	Espectro de absorción de Ch-C1 5 μM en solución acuosa Buffer HEPES pH 7,2	130
Gráfico 47.	Espectro de emisión de Ch-C1 5 μM en solución acuosa Buffer HEPES pH 7,2	130

LISTA DE TABLAS

Table 1a.	Asignaciones de las señales de ^1H RMN de cumarinas sustituidas en C-3	79
Tabla 1b.	Asignaciones de las señales de ^1H RMN de cumarinas sustituidas en C-4	80
Tabla 2.	Asignaciones de las señales de ^1H RMN y ^{13}C RMN de Q51 – Q53	86
Tabla 3.	Asignaciones de las señales ^1H RMN de BS-1 – BS-7	89
Tabla 4.	Asignaciones de las señales ^1H RMN de Ch-C1 – Ch-C5	92
Tabla 5.	Propiedades fotoquímicas de absorción (Abs), fluorescencia (Fluor), coeficiente de extinción molar (ϵ_{max}), rendimiento cuántico (Φ), tiempo de vida media ($\tau/2$) y desplazamiento de Stokes de Q51, Q52 y Q53	117
Tabla 6.	Valores de Constantes de apagamiento de Stern-Volmer (K_{SV}), tiempo de vida de fluorescencia (τ) y constante de velocidad (k_q) para Q51 – Q53	117
Tabla 7.	Valores de la constante de asociación (K_a) con Fe^{+2} y Fe^{+3} , Q51 – Q53	118
Tabla 8.	Propiedades fotoquímicas de absorción (Abs), fluorescencia (Fluor), coeficiente de extinción molar (ϵ_{max}), rendimiento cuántico (Φ), tiempo de vida media ($\tau/2$) y desplazamiento de Stokes de BS-7	127

LISTA DE ESQUEMA

Esquema 1.	Síntesis de Q51 y Q52	82
Esquema 2.	Posible mecanismo para la obtención de Q52	83
Esquema 3.	Síntesis de Q53	84
Esquema 4.	Síntesis de BS-1 – BS-7	87
Esquema 5.	Síntesis de Ch-C1 – Ch-C14	90
Esquema 6.	Modelo quelación de 63 con Cu^{+2}	25
Esquema 7.	Sitio de quelación del compuesto BS7	127
Esquema 8.	Estequiometría de quelación de Cu^{+2} con BS7	129

LISTA DE ABREVIATURAS

Å:	Angström.
A:	Absorbancia
AAS:	Espectroscopía de absorción atómica.
ACN:	Acetonitrilo.
AcOEt:	Acetato de etilo.
AcOH:	Ácido acético.
ADN:	Ácido desoxirribonucleico.
ATP:	Adenosín trifosfato.
BBr ₃ :	Bromuro de boro
°C:	Grado centígrado.
CC:	Cromatografía en columna.
CCF:	Cromatografía en capa fina.
CDCl ₃ :	Cloroformo deuterado.
CD ₃ OD:	Metanol deuterado.
CH ₂ Cl ₂ :	Diclorometano.
CO ₂ :	Dióxido de carbono.
Cys:	Cisteína.
d:	Doblete.
dd:	Dobledoblete
D ₂ O:	Agua deuterada.
DMF:	Dimetilformamida.
DMSO- <i>d</i> ₆ :	Dimetilsulfóxido deuterado.
DNSCH:	2-Hidroxibencildansilcadaverina.
ESR:	Resonancia de Espín electrónico.
EtOH:	Etanol.
Et ₂ O:	Éter etílico.
FAS:	Sulfato amoniacal de hierro.

Fe:	Hierro.
Fe-NTA:	Nitrilotriacetato férrico.
FeCl ₃ :	Tricloruro de hierro.
Φ:	Rendimiento cuántico.
F:	Fluorescencia.
FLDFO:	Fluoresceína-desferrioxamina.
g:	Gramo.
h:	Hora.
HEPES:	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid.
Hz:	Hertz.
HCl:	Ácido clorhídrico.
H ₂ O:	Agua.
H ₂ O ₂ :	Peróxido de hidrógeno.
H ₂ SO ₄ :	Ácido sulfúrico.
HNO ₃ :	Ácido nítrico.
HPLC:	High-perfonmance liquid chromatography.
K ₂ CO ₃ :	Carbonato de potasio.
K _a :	Constante de asociación.
K _{sv} :	Constante de Stem-Volmer
LIP:	Labil iron pools.
λ:	Longitud de onda.
m:	Multiplete.
M:	Molar.
MeOH:	Metanol.
Me ₂ SO ₄ :	Sulfato de dimetilo.
MHz:	Megahertz.
Min:	Minuto.
mg:	Miligramo.
mL:	Mililitro.
mM:	Milimolar.

μM :	Micromolar.
η :	Índice de refracción.
N_2 :	Nitrógeno molecular.
NAC:	N-acetilglicina.
NaOH:	Hidróxido de sodio.
NBD-DFO:	7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol-desferrioxamina.
nm:	Nanómetro.
O_2 :	Oxígeno.
$\cdot\text{OH}$:	Radical hidróxilo.
PET:	Transferencia fotoinducida de electrones
p.f.:	Punto de fusión.
POCl_3 :	Oxicloruro de fósforo.
q:	Quarteto
RMN:	Resonancia magnética nuclear.
RPA:	rodamina B-[(1,10-fenantrolin-5-il)aminocarbonil]bencil éster.
s:	Singlete.
SBF:	Suero bovino fetal
SOCl_2 :	Cloruro de tionilo.
t:	Triplete.
TEA:	Trietilamina.
TRIS:	Tris(hidroximetil)aminometano.
TTP:	Trifenilfosfina.
UV:	Ultravioleta.

RESUMEN

El hierro está ampliamente distribuido en la naturaleza y es uno de los más importantes elementos en sistemas biológicos. Este juega un rol en muchos procesos bioquímicos a nivel celular tales como la formación de la hemoglobina en eritrocitos y en el depósito y transporte de oxígeno a los tejidos. También es indispensable para muchos organismos y tanto su deficiencia como su acumulación excesiva pueden inducir varios desórdenes como anemia, cáncer de hígado y riñones, cirrosis, artritis, diabetes, falla cardíaca, enfermedad de Parkinson y ataxia de Friedreich entre otras.

En décadas recientes una serie de compuestos llamados quimiosensores o sondas fluorescentes se han desarrollado y usado en diferentes campos: biológico, químico, ecológico, industrial. Sin embargo, en el campo químico-biológico es donde han despertado mayor interés por su aplicación para estudiar procesos fisiológicos y anomalías bioquímicas.

En esta tesis se desarrolló la síntesis de tres series de compuestos: cumarinas modificadas con TRIS (2-amino-2-(hidroximetil) propano-1,3-diol), derivados de bases de Schiff ((3*E*)-3-(bencilidenamino)-2*H*-cromen-2-onas) y las que denominamos chalcocumarinas ((3-((*E*)-3-fenilacrilóil)-2*H*-cromen-2-onas). Las propiedades fotofísicas y, en los casos relevantes, de afinidad por cationes de interés biológico fueron evaluadas para estos compuestos. Aquellos que presentaban afinidad selectiva por hierro fueron evaluados utilizando líneas celulares de neuroblastoma humano SH-SY5Y. De las tres series ensayadas solamente los compuestos **Q51**, **Q52** y **Q53** mostraron selectividad por Fe^{+2} y Fe^{+3} . Al ensayar los compuestos en líneas celulares de neuroblastoma humano SH-SY5Y, observamos que los tres compuestos pueden atravesar la membrana celular y a su vez depositarse en el citoplasma y con ello acumularse en organelos como la mitocondria. El compuesto **BS-7** mostró una alta afinidad por Cu^{+2} , capacidad de permear la membrana celular y quelar el metal, resultando un aumento en la intensidad de fluorescencia. Finalmente el compuesto **Ch-C1** no presentó afinidad por metales. Sin embargo, al realizarse ensayos utilizando

tioles endógenos, mostró capacidad de modificar su señal fluorescente tanto *in vitro* como *in vivo*.

ABSTRACT

Iron is widely distributed in nature and is one of the most important elements in biological systems. It plays a crucial role in many biochemical processes at the cellular level such as the formation of hemoglobin in red blood cells and the storage and transport of oxygen to tissues. It is also essential for many organisms and both its deficiency and its excessive accumulation can induce various disorders such as anemia, liver damage, kidney and liver cancer, cirrhosis, arthritis, diabetes, heart failure, Parkinson's disease and Friedreich's ataxia.

In recent decades a series of compounds called chemosensors or fluorescent probes have been developed and used in different fields: biological, chemical, environmental, industrial. However, it is in the chemical-biological field where they have attracted most attention due to their applications for the study of physiological processes and biochemical abnormalities.

In this thesis the synthesis of three series of compounds was developed: coumarins modified with TRIS (2-amino-2-(hydroxymethyl) propane-1,3-diol), Schiff base derivatives ((*E*)-3-(benzylideneamino)-2*H*-chromen-2-ones) and what we call chalcocoumarins ((3 - ((*E*)-3- phenylacryloyl)-2*H*-chromen-2-ones). The photophysical properties and, in some relevant cases, the affinity for cations of biological interest were evaluated for these compounds. In those cases where a selective affinity for iron was observed, a subsequent evaluation using human neuroblastoma cell lines SH-SY5Y was carried out. Of the three series of compounds tested only Q51, Q52 and Q53 showed selectivity for Fe^{+2} and Fe^{+3} . After testing these compounds in human neuroblastoma cell line SH-SY5Y, we observed that all three compounds can cross the cell membrane and once inside the cytoplasm they accumulate in organelles such as mitochondria. Other assays performed with compound **BS-7** showed that it has high affinity for Cu^{+2} and that it also can permeate cell membranes and chelate the metal, resulting in an increase in fluorescent intensity. Finally, compound **Ch-C1** showed no affinity for metals. However, when tested using endogenous thiols it showed the ability to modify their fluorescent signal both *in vitro* and *in vivo*.

1. INTRODUCCIÓN

El hierro es el metal de transición más abundante e importante en los sistemas biológicos, se encuentra constituyendo estructuras de numerosas enzimas y proteínas [1], en consecuencia este metal debido a su fácil química redox y su alta afinidad por oxígeno se encuentra involucrado en reacciones de transferencia de electrones y transporte de oxígeno. En contraste el hierro unido a proteínas y el hierro intracelular reactivo o lábil (Labile Iron Pool) tiene un alto potencial tóxico. Ya que al participar en reacciones de intercambio electrónico entre las especies Fe^{+2} y Fe^{+3} , puede catalizar la formación de derivados oxigenados conocidos como radicales libres, en especial el radical superóxido en la reacción de Fe^{2+} con O_2 y el radical hidroxilo mediante la reacción de Fe^{+2} con H_2O_2 (reacción de Fenton) [2, 3]. Estas especies radicales altamente reactivas son capaces de interactuar con un gran número de moléculas biológicas entre las que se encuentran azúcares, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos generando así una serie de daños como peroxidación lipídica, oxidación de proteínas e hidroxilación de bases nitrogenadas en los ácidos nucleicos, aportando al desarrollo de patologías como hepatitis, hemocromatosis, cirrosis, cáncer y enfermedades neurodegenerativas [4-6].

Un gran número de métodos analíticos se encuentran disponible para la detección iones, entre estos se encuentran: fotometría de llama, espectrometría de absorción atómica, electrodos sensibles a iones entre otros. Estos métodos son muy caros, requieren muestra de gran tamaño y no permiten monitoreo continuo. En contraste los métodos basados en sensores fluorescentes se han venido utilizando durante las últimas décadas, generando un gran interés en el desarrollo de sondas fluorescentes para su utilización con varios blancos [7, 8], los cuales han sido utilizados en diferentes campos: biológico, químico, ecológico e industrial. Sin embargo en el campo químico-biológico es donde han despertado mayor interés por su aplicación para estudiar procesos fisiológicos y determinar una serie de procesos bioquímicos [9-12], permitiendo tener una mayor sensibilidad, selectividad, tiempo de respuesta, observación local entre otros.

Los sensores fluorescentes para hierro se clasifican en dos grupos: los denominados “turn on” y los “turn off”. Los “turn on” se caracterizan por aumentar su fluorescencia en el momento de quelar el metal, son muy pocos los integrantes de este grupo y presentan como fluoróforo cumarinas, rodamina B y BODIPY (boron-dipirrometano) [13]. Las “turn off” disponibles comercialmente se caracterizan por presentar un apagamiento al momento de quelar el Fe^{+2} o Fe^{+3} , estas sondas se han desarrollado a partir del fluoróforo fluoresceína por modificaciones químicas obteniéndose compuestos como la calceína y la phen green SK. Los estudios realizados con calceína en presencia de Fe^{+2} y Fe^{+3} han mostrado que ambos iones pueden apagar la fluorescencia del compuesto en un 46 % y 6 % respectivamente, pero esta sonda no es selectiva a hierro porque también presenta una alta respuesta “turn off” frente a otros metales como Cu^{+2} , Ni^{+2} y Co^{+2} . Phen green SK presenta una respuesta de apagamiento muy fuerte (Fe^{+2} 93 % y Fe^{+3} 51 %), pero la batería de iones apagadores es más amplia (Cu^{+2} , Cu^{+} , Hg^{+2} , Cd^{+2} , Pb^{+2} y Ni^{+2}). Existe otros quimiosensores con el mismo comportamiento pero estos han sido poco utilizados, entre estos tenemos derivados del sideróforo de azotobactina δ y desferrioxamina, como también el uso de derivados de hidroxipiridinona-cumarinas, entre otros [13].

La selectividad es un problema latente en el desarrollo de nuevos quimiosensores, por lo que uno de nuestros desafíos en este trabajo fue el diseño y la síntesis de sondas fluorescentes asociadas a hierro, basándonos en el uso de núcleos químicos conocidos para utilizarlo como fluoróforos y ligandos que presente una alta afinidad y selectividad por Fe^{+2} y Fe^{+3} , utilizando la estrategia de sensores conjugados. Además estos compuestos deben mostrar capacidad de permear la membrana celular, detectar y quelar el ión a bajas concentraciones tanto *in vitro* como *in vivo*, además de ser reversibles para poder utilizarlas como herramienta molecular.

2. ANTECEDENTES

El hierro está ampliamente distribuido en la naturaleza y es uno de los más importantes elementos en sistemas biológicos, ya que juega un rol crucial en muchos procesos bioquímicos a nivel celular. Este es un elemento esencial en la formación de la hemoglobina en eritrocitos y la mioglobina en las células musculares y es muy importante en el depósito y transporte de oxígeno a los tejidos, participando a través de los diversos citocromos en la cadena de transporte de electrones y en el catabolismo de sustancias endógenas y xenobióticas [14]. Tanto su deficiencia como su acumulación excesiva en humanos pueden inducir varios desórdenes como la anemia y daño en el hígado y riñones (como consecuencia de la hemocromatosis) que puede finalmente causar cáncer de hígado, cirrosis, artritis, diabetes y falla cardíaca [15]. Recientes estudios muestran que niveles elevados de hierro se encuentran ligados a neurodegeneración como la que subyace la enfermedad de Parkinson [16], como también en la ataxia de Friedreich [17] y desempeña un rol clave en algunas enfermedades infecciosas como la malaria [18].

La mitocondria juega un papel protagónico en el procesamiento del hierro celular, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, principalmente en la síntesis de hemo y clusters FeS [19, 20]. El metal es adquirido por la célula mediante una endocitosis mediada por receptores (Figura 1). La transferrina extracelular une dos átomos de hierro trivalente y a dos moléculas de bicarbonato que al unirse a un receptor de transferrina se produce la endocitosis, y dentro del endosoma los valores de pH decrecen gracias a una bomba de protones dependiente de ATP, destacándose un decaimiento de la afinidad de la transferrina por Fe^{+3} . Los dos átomos de hierro de la molécula de transferrina son finalmente transportados, probablemente por transportadores de metales divalentes, a través de la membrana endosomal al citosol [21].

El hierro liberado desde el endosoma es generalmente pasado a la reserva de hierro lábil (LIP, Labile Iron Pool) formada por complejos usualmente inestables de Fe con moléculas de bajo peso molecular [22].

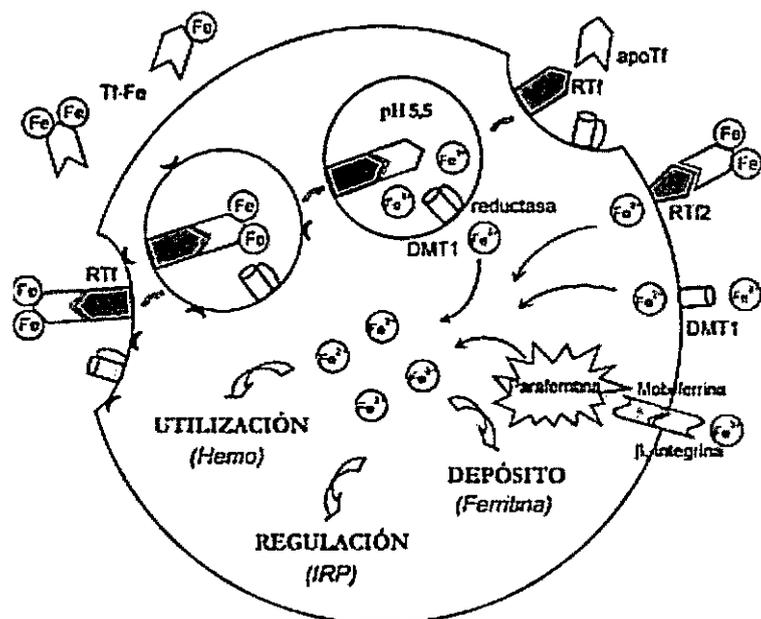
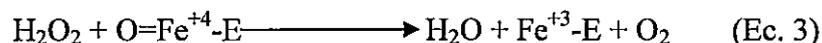


Fig. 1. Metabolismo del hierro en la célula (figura tomada de Perez, G. *et al* [23])

Por otra parte también hay que tener en cuenta que el metal unido en depósitos de hierro o a proteínas funcionales puede presentar una citotoxicidad sustancial. Esta citotoxicidad se debe al hecho que el ión metálico cataliza la formación de radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) a partir de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Ec. 1) [24]:



Cuando el H_2O_2 reacciona lentamente con moléculas biológicas, el radical hidroxilo y especies de oxígeno y hierro tales como especies de ferrilo (Fe^{+4}), son generadas en reacciones dependientes de Fe, H_2O_2 o de moléculas oxígeno-dependientes en proporción a las concentraciones de Fe^{+2} , H_2O_2 y O_2 (Ec. 2 y 3) [25].



Estas especies reaccionan prácticamente con todas las clases de moléculas biológicas con velocidad controlada por la difusión. Las especies reactivas de oxígeno provocan lesiones moleculares dependientes de Fe tales como la peroxidación lipídica, oxidación de proteínas, rompimiento de las cadenas de ADN, modificación de bases y apoptosis, que son considerados factores patogénicos cruciales para numerosas enfermedades. En años recientes se han acumulado pruebas que indican la existencia de alteraciones intracelulares por los depósitos de hierro en tránsito, los cuales pueden contribuir a una variedad de lesiones [16-18].

2.1. Conceptos de fluorescencia.

La fluorescencia es un tipo de emisión radiativa que presentan compuestos con características especiales. La luz de ciertas longitudes de onda puede ser selectivamente absorbida por una sustancia de acuerdo a su estructura molecular, la absorción de energía ocurre cuando un fotón incidente promueve la transición de un electrón de un estado de menor a mayor energía. Las moléculas con electrones en compuestos aromáticos usualmente absorben radiación en el UV (190–400 nm) o en la zona de la luz visible (400–750 nm). Posteriormente los electrones excitados pierden esta energía absorbida. Esta desactivación puede ocurrir por distintos mecanismos: relajación vibracional, conversión interna, conversión externa, cruce entre sistemas, fosforescencia y fluorescencia (Figura 2).

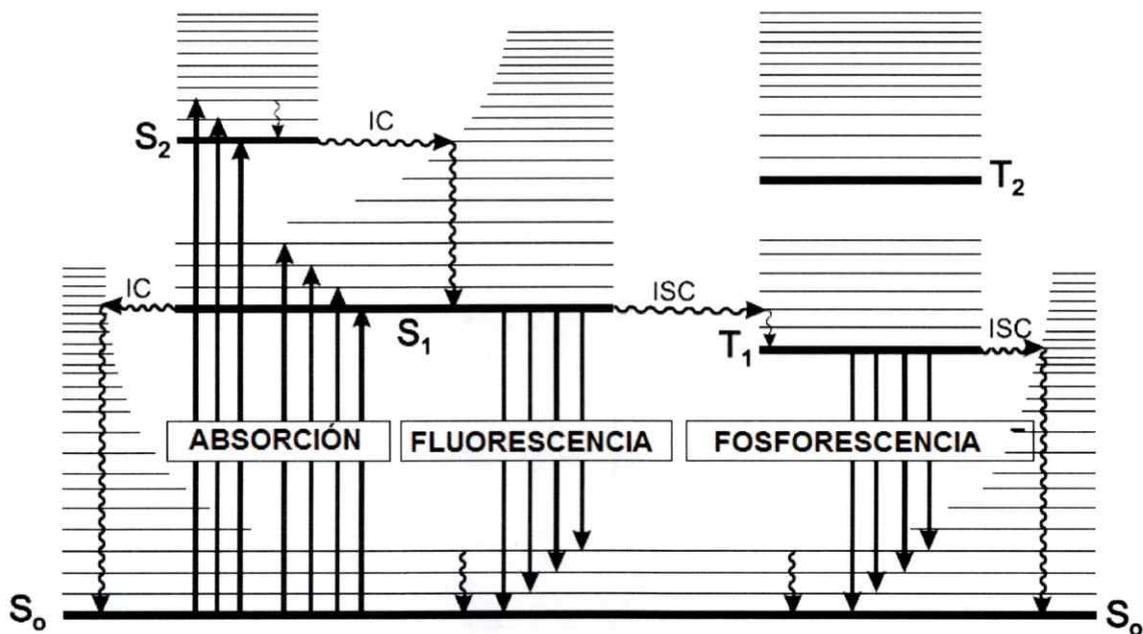


Fig. 2. Diagrama de Jablonski (figura tomada de Valeur, B. [26]).

El tiempo de vida de la fluorescencia y la eficiencia cuántica son probablemente las características más importantes de los fluoróforos. Para moléculas altamente fluorescentes, como rodamina B y fluoresceína, el rendimiento cuántico alcanza la unidad. Sin embargo, la emisión siempre será de menor energía en promedio que la energía absorbida, debido a la relajación vibracional. El cambio en la energía de la molécula excitada causa un cambio en el espectro de fluorescencia hacia longitudes de onda mayores respecto al espectro de absorción. Este fenómeno observado por G. G. Stokes en 1852 y es denominado desplazamiento de Stokes. Existen gran número de técnicas espectroscópicas o microscópicas basadas en el tiempo de vida, la anisotropía, la transferencia de energía o la intensidad de emisión de sondas fluorescentes. Estas técnicas son muy sensibles, permiten incluso la detección de moléculas aisladas, y pueden ser miniaturizadas o automatizadas. La integración de sondas moleculares fluorescentes en dispositivos da lugar a los sensores químicos que suelen ser denominados quimiosensores [27] y se definen como compuestos de origen abiótico que complejan analitos de forma reversible dando como resultado un cambio en la señal de fluorescencia y constituyen las unidades activas de un sensor.

2.2. Diseño de quimiosensores

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

El siguiente paso es el diseño de los puntos de unión del receptor, los cuales deben complementarse con los del sustrato. Todos ellos se agrupan en una estructura orgánica de tamaño adecuado al sustrato y su distribución debe ser tal que estén unos puntos lo suficientemente alejados de otros para minimizar repulsiones, pero a la vez deben estar lo suficientemente juntos para interaccionar simultáneamente con el sustrato. Los complejos más estables se obtienen cuando el receptor posee una estructura preorganizada para recibir al sustrato, en este caso la unión es irreversible. Este tipo de complejación es ideal, por ejemplo, en la eliminación de sustancias tóxicas de aguas contaminadas. Cuando la unión sustrato-receptor es menos firme, sus aplicaciones son importantes en el campo del transporte de moléculas o como sensores químicos [28].

2.3. Métodos espectroscópicos de fluorescencia.

En las últimas décadas se ha venido desarrollando numerosos métodos para caracterización de los LIP (Labile Iron Pools), definidos como hierro "quelable". Las técnicas existentes se pueden dividir en dos grandes grupos: los llamados métodos disruptivos y los no disruptivos. Los primeros se basan en el tratamiento del material

biológico y requieren homogenización o lisis del material biológico, anterior a la medición del analito en estudio, en este caso del hierro. Para la cuantificación existen técnicas entre las cuales están: HPLC para determinar complejos quelante: hierro, detección espectrofotométrica después de adicionar un quelante de hierro, resonancia de espín electrónico (ESR) y espectroscopía de absorción atómica (AAS).

Los métodos no disruptivos se pueden subdividir en dos grupos de acuerdo a su aplicabilidad: aquéllos en los que su material biológico es inviable y aquéllos donde el material biológico es viable. Los primeros utilizan el método de ESR con la desventaja metodológica que éstos solamente pueden detectar iones con electrones desapareados (ejemplo Cu^+ y Fe^{+3}). Los métodos que utilizan material biológico viable son los que utilizan isótopos radioactivos y los que se basan en espectroscopía de fluorescencia. Estos últimos presentan ventajas muy notorias en comparación con otros métodos, son menos invasivos y pueden ser utilizados para mediciones en células vivas, reduciendo las influencias exógenas causadas por el tratamiento previo de la muestra. Este tipo de metodología tiene una alta sensibilidad, detectando concentraciones de hierro submicromolares. Su alta sensibilidad combinada con técnicas microscópicas constituyen una gran herramienta que permite determinar hierro quelable en pequeñas muestras tales como células individuales, donde se puede resolver estructuras subcelulares.

En un primer enfoque se ha explorado la construcción de sensores que tenían como característica la presencia en el fluoróforo de átomos donores de electrones, lo que les permitía unirse al sustrato [25]. Estos sistemas son llamados quimiosensores intrínsecos y la interacción entre el sustrato y el fluoróforo conduce directamente a la modificación de sus propiedades de fluorescencia (Figura 3).

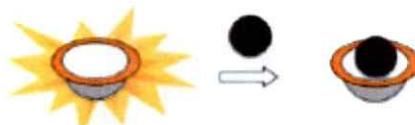


Fig. 3. Funcionamiento de un quimiosensor intrínseco (figura tomada de Mancini F, *et al.* [29]).

Estos quimiosensores son fáciles de diseñar, pero son intrínsecamente muy rígidos, debido a que su diseño exige que rodeen el sustrato, ejemplo de éstos tenemos los éteres corona. Ninguna modificación es posible en el sitio de unión, en orden a modular la selectividad o la afinidad por el sustrato, dado que podría resultar un cambio en las propiedades de emisión de la molécula. Por esta razón, el desarrollo y la optimización de este tipo de sensores no es una tarea fácil desde el punto de vista sintético [29]. Una segunda estrategia que se ha explotado ampliamente está basada en la construcción de sensores en que el ligando está electrónicamente aislado del sistema π del fluoróforo, aunque las dos subunidades son mantenidas cerca por uniones covalentes (Figura 4). Esta clase de sensores son llamados quimiosensores conjugados. Las dos subunidades pueden ser diseñadas y optimizadas por separado para conectarlas ulteriormente [30].

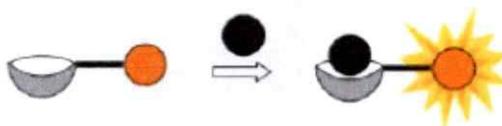


Fig. 4. Funcionamiento de un quimiosensor conjugado (figura tomada de Mancini F, *et al.* [29]).

La mayoría de las moléculas indicadoras de fluorescencia para la detección de hierro quelable en sistemas biológicos consisten en un fluoróforo unido a un ligando, por lo que pertenecen a la categoría de quimiosensores conjugados [25]. Los quimiosensores pueden ser clasificados en cuatro grupos (Figura 5). Entre ellos tenemos: queladores y podandos, coronandos, criptandos y calixarenos [31].

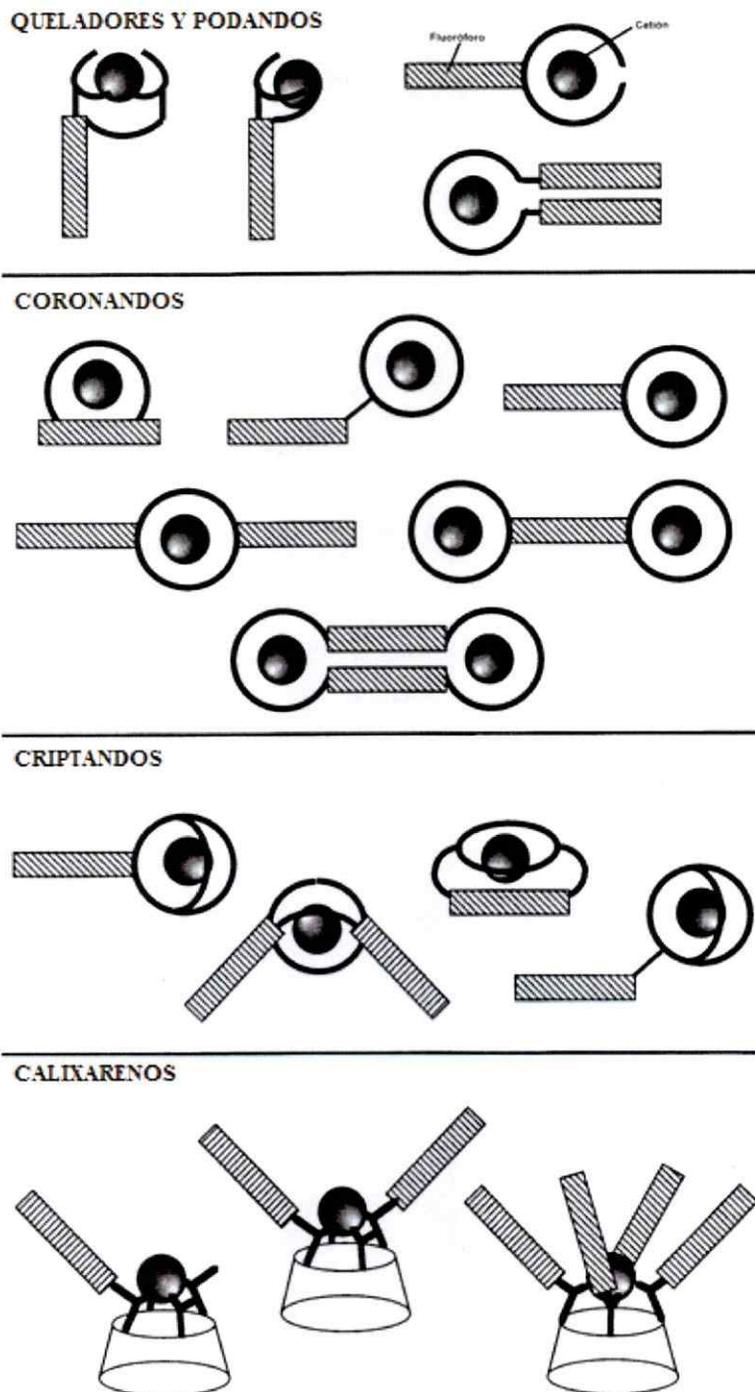
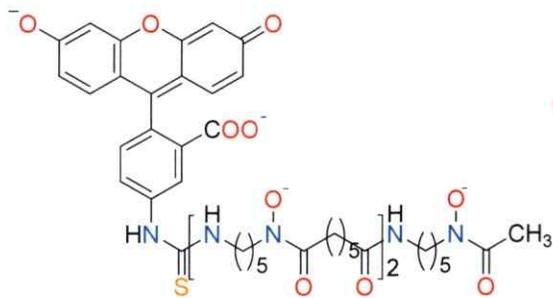


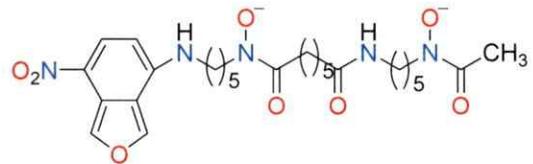
Fig. 5. Clase de quimiosensores conjugados (figura tomada de Valeur B. *et al.* [31]).

Entre los compuestos fluorescentes más utilizados con fines biológicos tenemos la fluoresceína-desferrioxamina (FLDFO, 1), la 7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol-

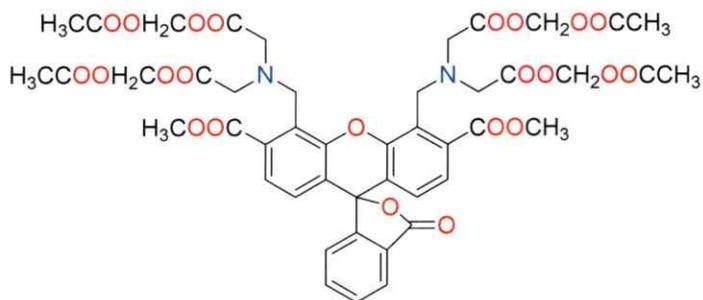
desferrioxamina (NBD-DFO, **2**), el acetoximetiléster de calceína (-AM, **3**), Phen Green SK (**4**) [21, 30], rodamina B-[(1,10-fenantrolin-5-il)aminocarbonil]bencil éster (RPA, **5**) [32], calceína (**6**) [33], y fluoresceína-ácido dietilentriamino-pentaacético (**7**) [33].



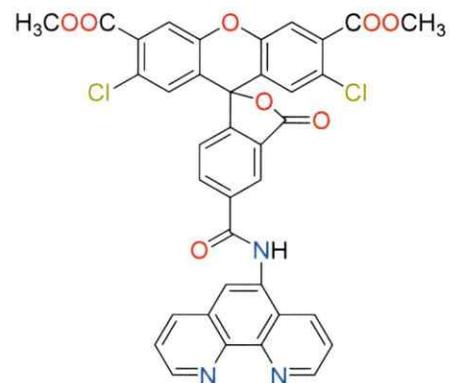
1



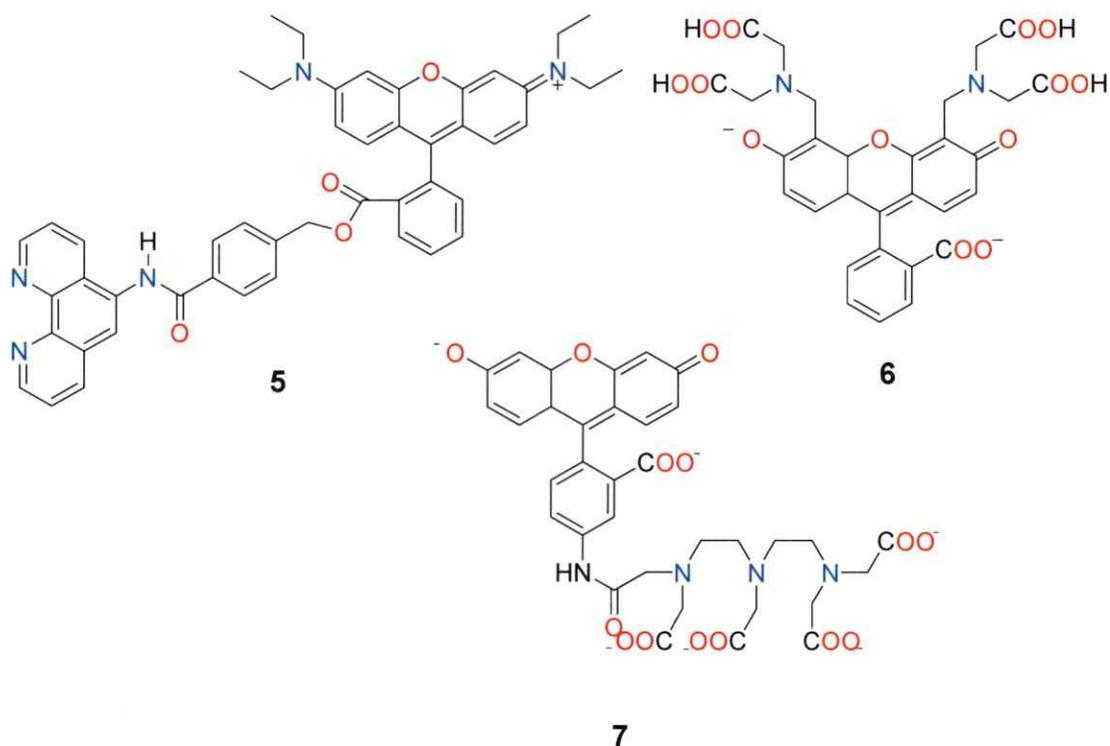
2



3



4

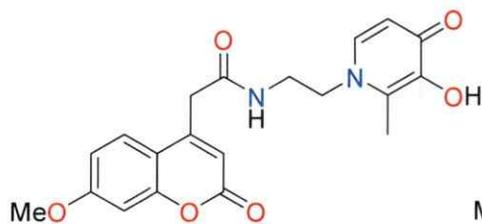


Las muestras biológicas normalmente consisten en células cultivadas que se incuban con una forma lipofílica del indicador fluorescente. Cuando existe tal forma, generalmente un éster, una vez dentro de la célula, enzimas hidrolizan el enlace éster del fluoróforo generando grupos polares o cargados negativamente que hacen menos permeable el indicador molecular a través de la membrana y éste, como consecuencia, se acumula intracelularmente. Este grupo de indicadores de fluorescencia para la detección de hierro quelable intracelular (Calceína-AM; Phen Green SK, PG SK diacetato; Phen Green FL, PG FL diacetato) pueden ser diferenciados de los que no se hidrolizan. Puede esperarse que estos últimos, por su alta lipofilia como también su movilidad en ambas direcciones, puedan difundir hacia el exterior de la célula con una facilidad similar (FL-DFO, NBD-DFO). La concentración intracelular y distribución de un indicador dependen de factores diferentes entre los cuales se encuentran la concentración del indicador en ambos lados de la membrana, el tiempo y la temperatura, la actividad de

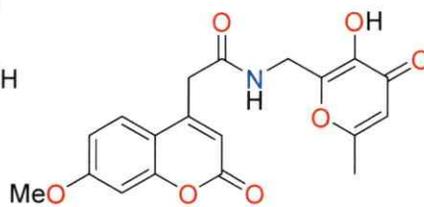
esterasas celulares, la relación volumen-superficie celular y la densidad del cultivo celular [34].

Otros compuestos que actúan como queladores bidentados son los derivados de ligandos como hidroxipiridinonas e hidroxipiranonas, los cuales son altamente selectivos para Fe^{+3} . Estas estructuras, asociadas a fluoróforos derivados de cumarinas son una herramienta muy útil para estudios para la detección de dicho ion. Uno de los primeros trabajos donde se muestran sondas que presentan derivados de hidroxipiridinonas e hidroxipiranonas conjugadas a cumarinas fue publicado por Luo W. *et al.* [35]. Estos autores efectuaron la síntesis de *N*-[2-(3-hidroxi-2-metil-4-oxopiridin-1(4*H*)-il)etil]-2-(7-metoxi-2-oxo-2*H*-cromen-4-il) acetamida (CP600) (8) y *N*-[(3-hidroxi-6-metil-4-oxo-4*H*-piran)2-il)metil]-2-(7-metoxi-2-oxo-2*H*-cromen-4-il)acetamida (CP610) (9), Posteriormente Ma Y. *et al.* [36], realizaron la síntesis de 22 moléculas (10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 y 30), incluidas las sintetizadas en el trabajo anterior, para obtener una batería de compuestos para cuantificar los LIP intracelulares. En este trabajo se mostró que la quelación de Fe^{+3} causa un apagamiento de la fluorescencia y la relación entre la concentración del metal y la del compuesto presenta una estequiometría 1:3 y tales moléculas se ensayaron en líneas celulares de eritrocitos humanos. Otro trabajo mostró la síntesis del compuesto 7-dietilamino-*N*-[(5-hidroxi-6-metil-4-oxo-1,4-dihidropiridin-3-il)metil]-*N*-metil-2-oxo-2*H*-cromen-3-carboxamida (CP655) (31) [37], herramienta utilizada para estudios con linfocitos humanos. También se ha reportado por Ma Y. *et al.* [38] una serie de compuestos que presentan un ligando derivado de 3-hidroxipiridin-4-ona, entre los que se cuentan CP603 (32), CP623 (33) y CP645 (34). Este ligando muestran una alta solubilidad en medio acuoso, sin embargo los autores no presentan estudios en líneas células. Los compuestos CP600 (8) y CP610 (9) presentan emisión a 380 nm que es apagada por Fe^{+3} , comparando la capacidad de apagamiento de las dos sondas y el ligando hexadentado calceína bajo condiciones *in vitro*, demostrando mayor sensibilidad y selectividad por Fe^{+3} . Ambos compuesto presentan una estequiometría 1:3. Este trabajo no muestra ensayos biológicos, lo que limita el uso de las sondas descritas. Sin

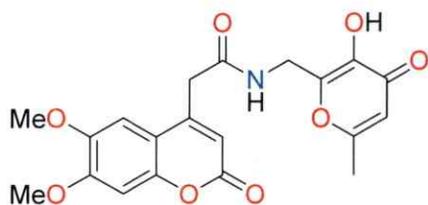
embargo, estas sondas poseen un peso molecular bajo y se predice que deben ingresar a la célula por difusión pasiva, teniendo la potencialidad de determinar en organelas niveles de hierro lábil [36]. El compuesto CP655 (31) se ha probado en modelos celulares siendo una herramienta para estudios de LIP en el citoplasma celular. Este compuesto presentó un apagamiento al adicionarle concentraciones de Fe^{+2} . Sin embargo, su uso se ha limitado debido a que otros compuestos son más versátiles al poder resolver diferentes organelas. Los compuestos 31, 32, 33 y 34 se probaron en líneas de hepatocitos humanos mostrando que se depositaban intracelularmente y que a su vez podían quelar hierro, mostrándose esto por un apagamiento de la intensidad de la fluorescencia.



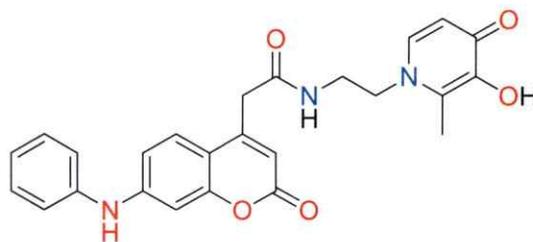
8



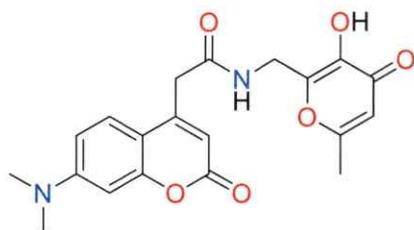
9



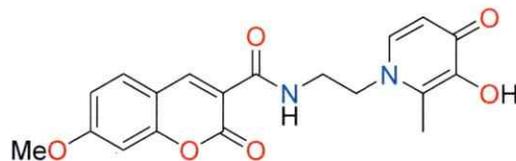
10



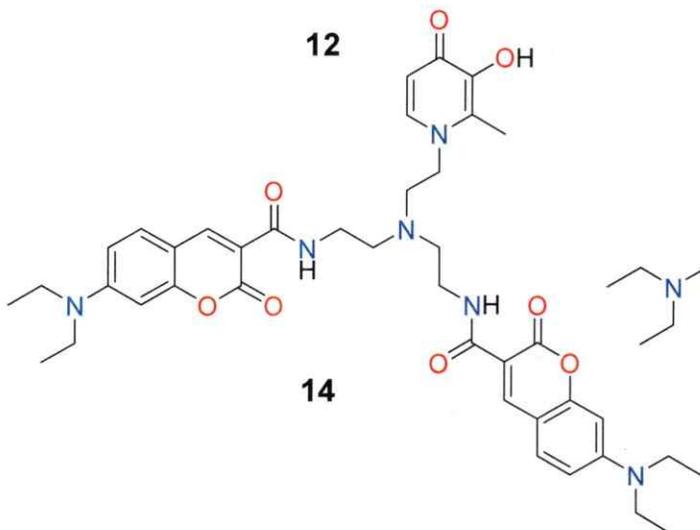
11



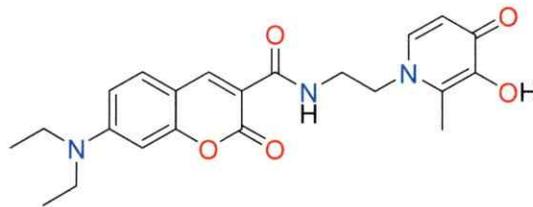
12



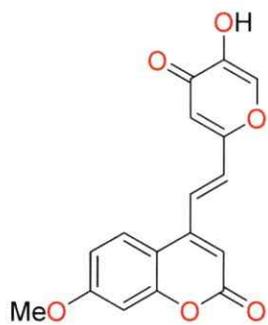
13



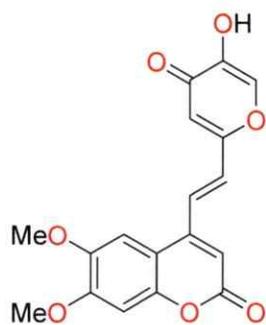
14



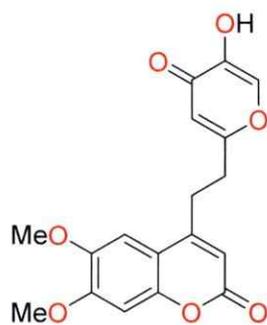
15



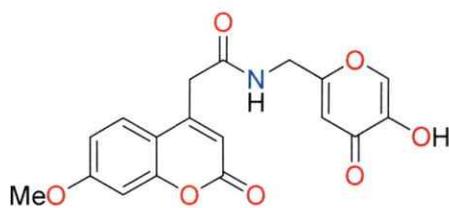
16



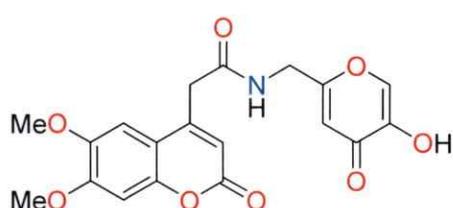
17



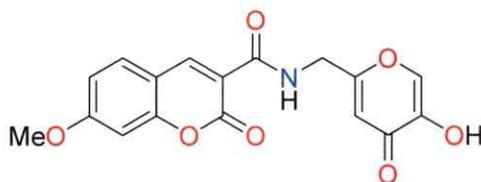
18



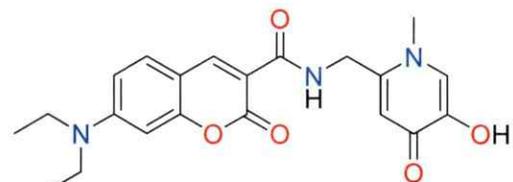
19



20



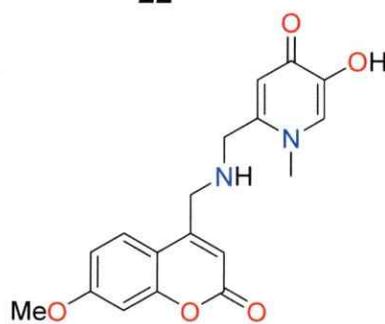
21



22



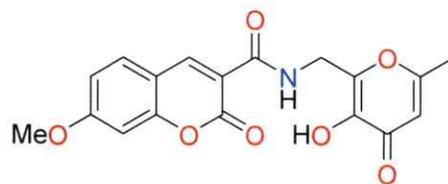
23



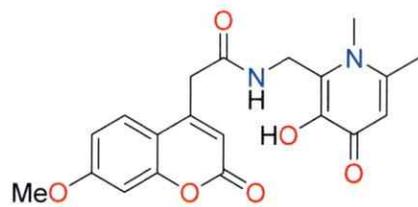
24



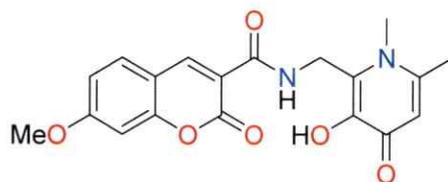
25



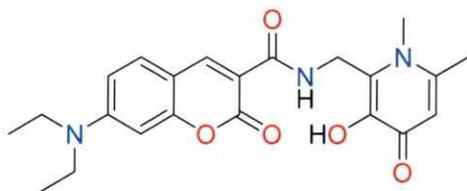
26



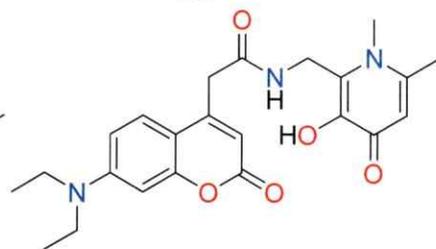
27



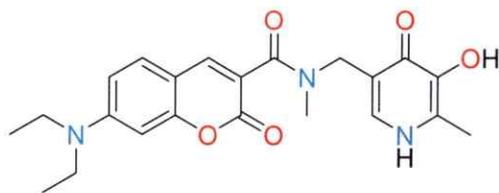
28



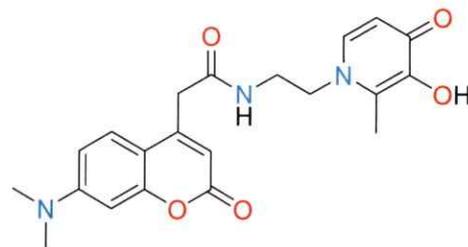
29



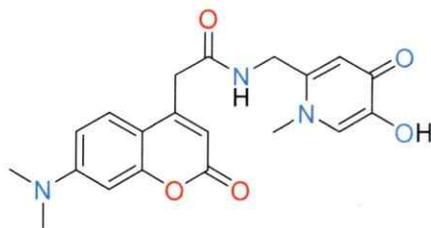
30



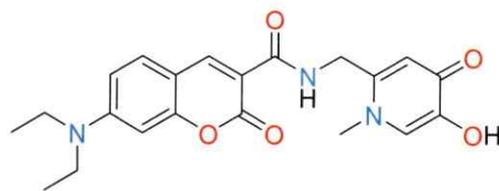
31



32

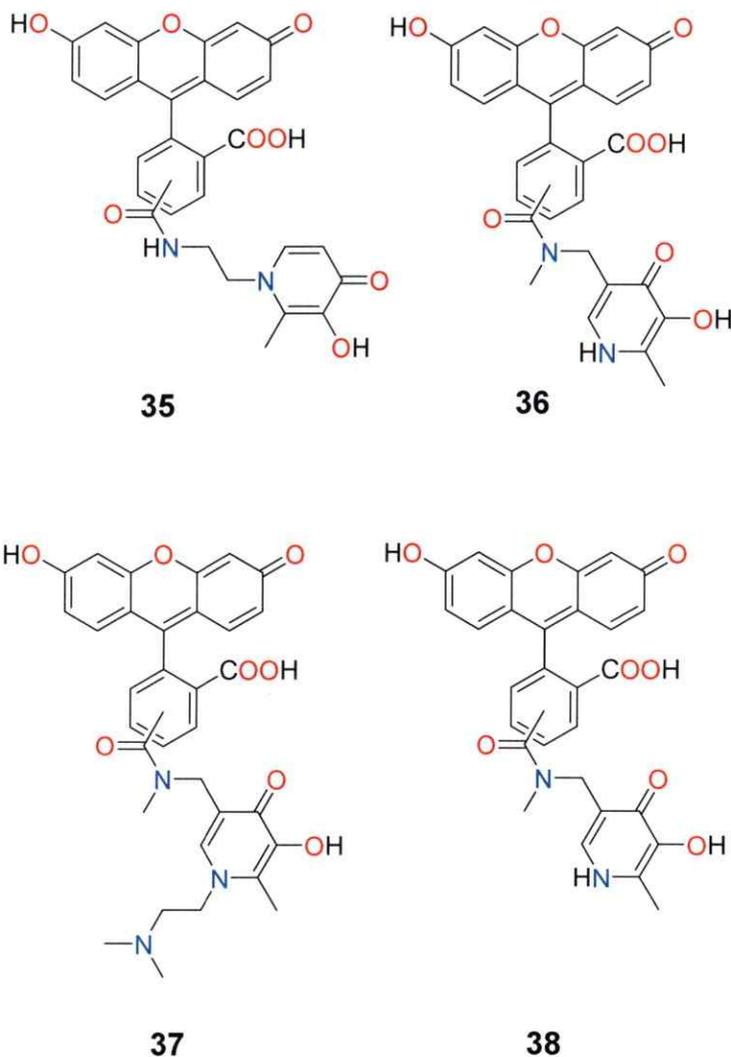


33

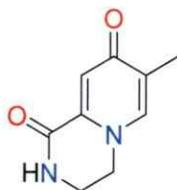


34

Otro grupo de compuestos derivados de hidroxipiridinonas como ligandos y fluoresceína como fluoróforo son los compuestos **35** (CP800) [38], **36**, **37** y **38** [39]. El primero (**35**) de este grupo fue probado en hepatocitos de ratas mostrando una distribución uniforme en el citoplasma. Sin embargo se mostraba de igual manera una distribución a nivel nuclear, y acumulación en el sistema endosomal/lisosomal. Según Fakh S. *et al* [39] se probaron en macrófagos de ratón mostrando que eran capaces de acumularse y detectar hierro en el compartimento endosomal/lisosomal.

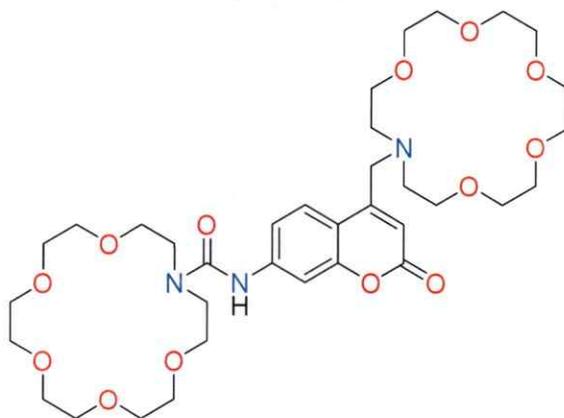


Queladores pequeños (**39**) a base de hidroxipiridinonas [40] pueden ser utilizados en estudios de exploración de hierro quelable. Estos compuestos fueron probados en la detección de hierro en eritrocitos humanos, donde al quelar el metal presentan un apagamiento de su fluorescencia.



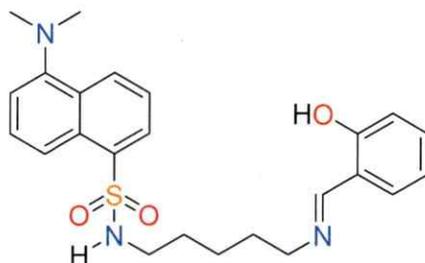
39

Un compuesto basado en dos ligandos del tipo aza-18-corona-6 y una cumarina utilizada como fluoróforo (**40**) fue descrito por Hua, J. *et al* [41]. Los autores muestran que esta molécula se puede unir a dos átomos de Fe⁺³, aumentando así su intensidad de fluorescencia. Asimismo se determinó que puede utilizarse en condiciones fisiológicas.



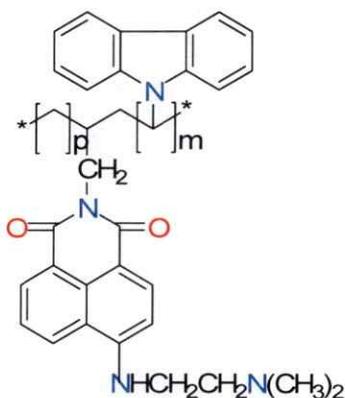
40

Recientemente se han sintetizado compuestos como la 2-hidroxibencildansilcadaverina (DNSCH) (**41**) diseñada como sensor fluorescente para Fe⁺³, la cual exhibe un significativo apagamiento de la fluorescencia al incrementarse la concentración del ión. Este compuesto fue probado como un quimiosensor intracelular de Fe⁺³ [42].



41

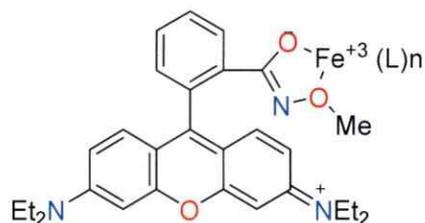
Se ha sintetizado y caracterizado un nuevo polivinilcarbazol que fluoresce en la región verde del espectro electromagnético, conteniendo en la cadena sitios 4-*N,N*-dimetilaminoetilamino-1,8-naftalimida (**42**). La habilidad de este polímero de unirse al catión metálico es monitoreada por espectroscopía de emisión fluorescente y muestra que la intensidad de la fluorescencia es muy sensible al catión Fe^{+2} [43]. La utilización de derivados de 1,8-naftalimida como sensores fluorescentes es determinada por la buena transferencia fotoinducida de electrones (PET) “off-on switching” que exhiben en soluciones acuosas [44].



42

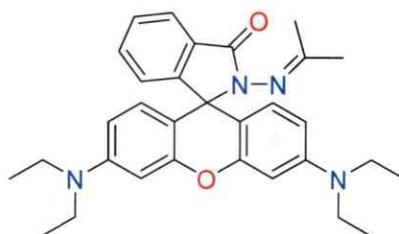
También se ha desarrollado la síntesis de compuestos selectivos para Fe^{+3} basados en rodamina. Uno de los primeros trabajos se ha empleado como ligando un hidroxamato que responde tanto fluorescente como colorimétricamente a Fe^{+3} a concentraciones micromolares. Un *O*-metilhidroxamato derivado de rodamina B (**43**) se prepara en dos

pasos a partir del colorante. Los quimiosensores fluorescentes para Fe^{+3} son todavía raros y los sensores conocidos para este ión están basados en el mecanismo de apagamiento de fluorescencia debido a la naturaleza paramagnética del ión férrico [45].



43

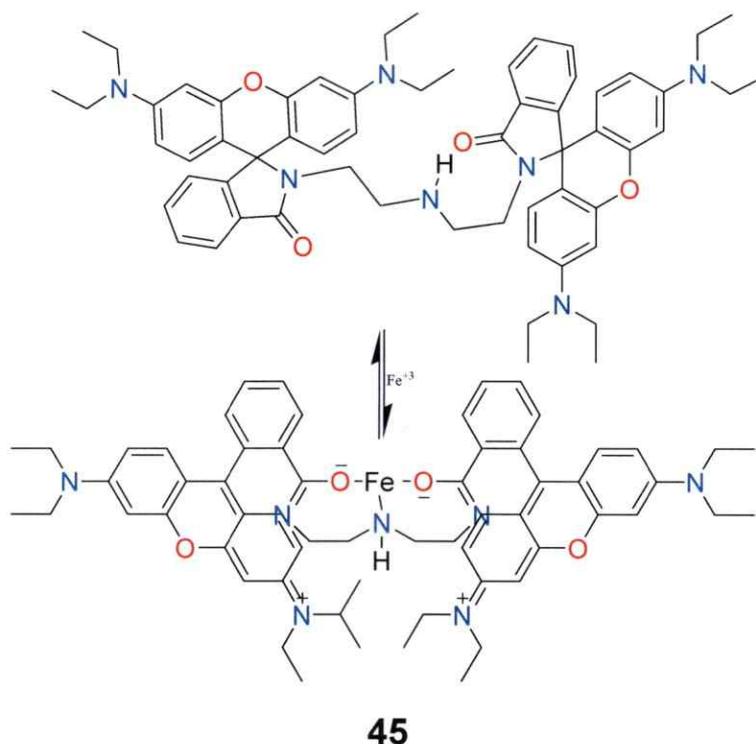
M. Zhang y colaboradores han desarrollado un nuevo compuesto denominado FD1 (**44**). Éste ha demostrado ser un sensor útil para resaltar imágenes de muestras biológicas donde exista la presencia de Fe^{+3} . Su estructura es la de una espirolactama la cual no es fluorescente. Sin embargo, cuando el anillo espiránico se abre formando una amida y generando el esqueleto de la rodamina B, esta sonda exhibe una alta selectividad y sensibilidad para Fe^{+3} en comparación con otros iones. Además, se concluyó a través de experimentos realizados utilizando microscopía de fluorescencia que dicha sonda puede ser usada en células [46].



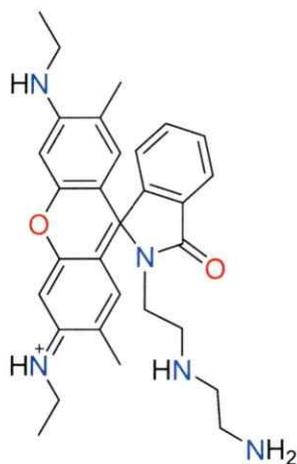
44

Otros autores han sintetizado una sonda que exhibe una alta selectividad para Fe^{+3} basándose en el mismo principio. La selectividad de esta sonda también se debe a la

apertura del anillo espiránico, lo que permite quelar el Fe^{+3} con los átomos de oxígeno del grupo amido de la sonda (**45**). La emisión fluorescente de dicha sonda se produce en el intervalo entre 500 – 650 nm. Una de sus limitaciones es su afinidad moderada por el ión en medio acuoso, lo que entorpecería su utilización en aplicaciones bioquímicas. Sin embargo, su selectividad es excelente y la detección de Fe^{+3} se da a niveles de 10^{-5} M [47].

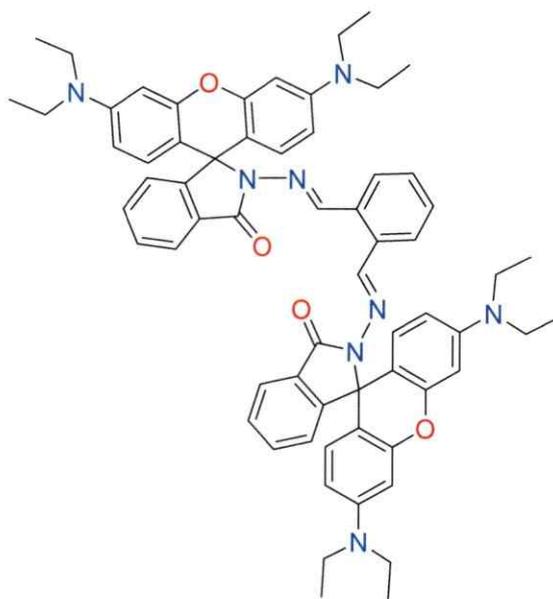


Otros quimiosensores para Fe^{+3} basados en análogos de rodamina han sido diseñados, y se ha estudiado su sensibilidad como ligandos de iones metálicos. Los ensayos de selectividad se desarrollaron en soluciones acuosas y a pH fisiológico, incluyendo otros iones y demostrando que éstos no originan cambios en el espectro. Al igual que la sonda anterior, la amplificación de la fluorescencia está basada en la apertura del anillo espiránico. Sin embargo, a diferencia de la anterior esta última sonda trabaja en forma individual (**46**) [48].



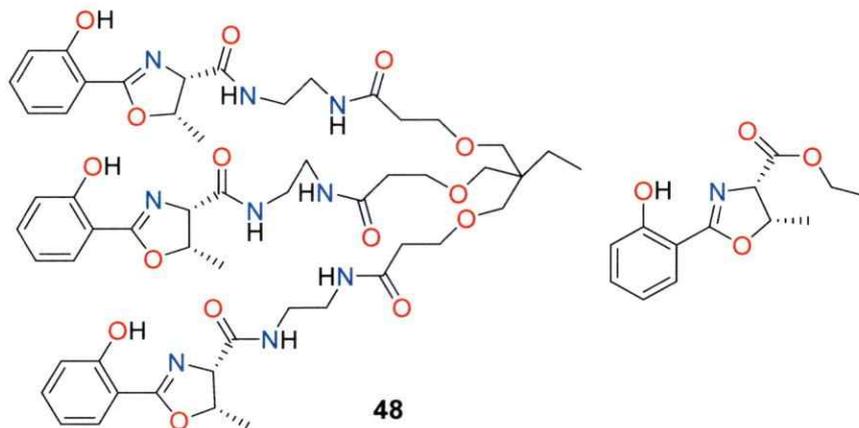
46

Recientemente se ha publicado la síntesis de un quimiosensor dual (47) con la capacidad de quelar Fe^{+3} y Cu^{+2} . Este compuesto en presencia de Fe^{+3} forma una especie altamente fluorescente, mientras que el Cu^{+2} se detecta coloriméticamente por cambio de su espectro de absorción [49].

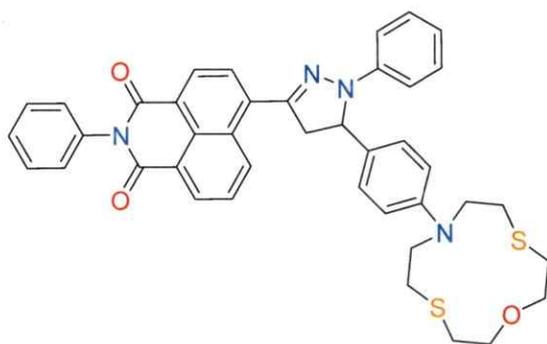


47

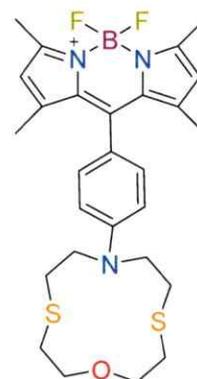
El grupo (4*S*,5*S*)-2-(2-hidroxifenil)-5-metil-4,5-dihidro-1,3-oxazol-4-ilcarbonilo (HPO) (**48**) ha sido identificado en varios sideróforos bacterianos como un componente de ligandos, en conjunto con el catecol. En un trabajo [50] se describe una nueva clase de ligandos biomiméticos de Fe⁺³ basados en HPO. En este reporte se describen tres análogos simétricos para formar una especie de trípode, cuyas colas de fenol-oxazolina difieren en longitud.



En la búsqueda de ligandos para determinar selectivamente iones de hierro se han desarrollado compuestos derivados de macrociclos relacionados con éteres corona. Ejemplos de esto tenemos en los reportados por Bricks y colaboradores, quienes sintetizaron derivados de 1-oxa-4,10-ditía-7-azaciclododecano unidos a un fluoróforo a través de un grupo fenilo. Los compuestos sintetizados son un derivado de 1,3,5-triaril- Δ^2 -pirazolina (**49**) y un complejo de boro y un dipirrometeno (BDP) sustituido en *meso* (**50**), los cuales amplifican su fluorescencia en el intervalo espectral del rojo al coordinar Fe⁺³. La respuesta a Fe⁺³ y una potencial interferencia de otros iones metálicos fue estudiada para ambas sondas utilizando solventes apróticos altamente polares y solventes próticos. En solventes orgánicos, la fluorescencia de ambas sondas es apagada por un cambio intramolecular o transferencia electrónica en el estado excitado [51].



49



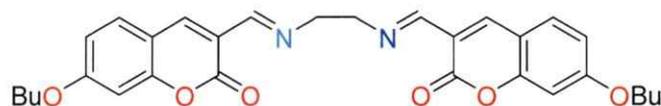
50

Un trabajo reciente muestra la síntesis de una cumarina simple (**51**) modificada con un grupo tris(hidroximetil)aminometano (TRIS) el cual actúa como quelante. Este compuesto exhibe una alta selectividad para iones Fe^{+3} y su intensidad de fluorescencia es apagada a medida que se aumenta las concentraciones del metal. Para este compuesto no se han mostrado ensayos con líneas celulares [52].



51

Los dosímetros químicos, al igual que los sensores, pueden utilizarse en la detección de cationes. Un ejemplo de dosímetro químico es el obtenido para la detección de Fe^{+3} basado en la hidrólisis de una base de Schiff. La bis(cumarinil)imina (**52**) es hidrolizada por adición de Fe^{+3} dando lugar a una cumarina altamente fluorescente [53].



52

Se han diseñado y sintetizado un gran número de moléculas orgánicas para ser utilizadas como quimiosensores de hierro. Una gran cantidad de estos son utilizados para la detección de Fe^{+3} y pueden ser usados como sensores selectivos para la determinación cuantitativa. Otros quimiosensores se han desarrollado con la finalidad de utilizarlos como sondas intracelulares de hierro presentado limitaciones, entre las que se encuentran su poca selectividad. Como ejemplos de esto tenemos fluoresceína-desferrioxamina (FLDFO, **1**), la 7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol-desferrioxamina (NBD-DFO, **2**), el acetoximetiléster de (-AM, **3**), Phen Green SK (**4**) [21, 30], rodamina B-[(1,10-fenantrolin-5-il)aminocarbonil]bencil éster (RPA, **5**) [32], calceína (**6**) [33], y fluoresceína-ácido dietilentriamina-pentaacético (**7**) [33]. Otros compuestos han sido diseñados para ser muy selectivos para Fe^{+3} , como los derivados de hidroxipiridinonas y hidroxipiranonas (**8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37** y **38**). Éstos se dividen en dos grupos dependiendo del fluoróforo utilizado. Los compuestos **8-34** presentan una cumarina como fluoróforo y la mayoría de ellos se ha ensayado en modelos celulares mostrando como ventaja su capacidad para entrar a la célula y quelar Fe^{+3} . Sin embargo, presentan limitantes entre las que se tiene la de no poder discriminar entre estructuras subcelulares, por lo que sirven solamente para detectar LIP. Los derivados de fluoresceína **35-38**, aparte de tener un buen rendimiento cuántico permitiendo utilizarlas en concentraciones muy bajas, han presentado la capacidad de penetrar estructuras celulares y detectar Fe^{+3} en el sistema endosomal/lisosomal. A pesar de tener esta buena herramienta para detectar el ión en las subestructuras mencionadas este tipo de sonda no es de gran interés debido a que el ciclo celular del hierro involucra estructuras de mayor importancia como la mitocondria. Por otra parte hay un grupo de estos quimiosensores basados en rodamina (**44-47**) los cuales presentan una alta selectividad y sensibilidad por Fe^{+3} , pero

su limitante radica en que al igual que los derivados de fluoresceína mencionados con anterioridad solo permiten la detección de LIP. Por lo tanto en este trabajo se propuso como objetivo diseñar y sintetizar nuevas sondas fluorescentes que sean selectivas para hierro, con alta sensibilidad y que aparte de poder quelar el metal y emitir una señal de apagamiento o de aumento de la fluorescencia, puedan acumularse selectivamente a subestructuras celulares como la mitocondria, importante en los procesos de daño y envejecimiento celular donde está involucrado el hierro.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3,1, HIPÓTESIS

Los quimiosensores fluorescentes utilizados para determinar iones en diferentes ambientes son relativamente pocos y los existentes no son suficientemente específicos para un solo tipo de ión. Por lo tanto, para la producción de nuevos diseños útiles para los fines propuestos se debería tener presente las siguientes características a satisfacer: tener alta sensibilidad y especificidad para Fe^{+2} y Fe^{+3} , tener como blanco compartimentos celulares, mostrar cambios espectrales, prender o apagarse en presencia de hierro, y revelar el hierro de manera relativamente independiente de la concentración de la sonda. De acuerdo a esto se propone como hipótesis:

Podrán las sondas fluorescentes sintetizadas quelar de manera selectiva Fe^{+2} y Fe^{+3} , cambiar su intensidad fluorescente al quelar el metal, y atravesar la membrana celular para quelar hierro intracelular.

Como antecedente conocíamos que las cumarinas son altamente fluorescentes, cuando se modifican de manera estratégica. Sin embargo un problema radicaría en su capacidad de penetración a la célula, en particular cuando están unidas a residuos que actúen como quelantes de Fe. Para esto nos propusimos aumentar su hidrofobicidad modificándolas con grupos funcionales esperando que la penetración celular fuese más fácil. Además las subestructuras que utilizaríamos como ligandos se modificarían aumentando el número de átomos de oxígeno, o creando semi-sideróforos para que su afinidad y especificidad fuesen mayores para Fe^{+2} y Fe^{+3} .

3.2. OBJETIVOS

El objetivo general de este proyecto fue el de diseñar, sintetizar y evaluar la afinidad y el comportamiento fluorescente de nuevos quimiosensores conjugados como posibles quelantes del iones Fe^{+2} y Fe^{+3} , con el fin de utilizarlos para explorar y determinar rutas metabólicas celulares asociadas a dichos iones, como también establecer mediante la fluorescencia la concentración de hierro en compartimentos celulares.

Para lograr este objetivo general se propuso llevar a cabo los siguientes objetivos específicos:

1. Sintetizar una serie de cumarinas simples funcionalizadas de manera adecuada para unirlos a ligandos selectivos para Fe.
2. Modificar la hidrofobicidad de las cumarinas sintetizadas agregando grupos funcionales que permitieran la modulación de ésta.
3. Sintetizar o modificar ligandos con afinidad por hierro para unirlos a los fluoróforos.
4. Evaluar si los ligandos modificados sintetizados presentaban afinidad específica por los iones Fe^{+2} y Fe^{+3} .
5. Sintetizar las sondas propuestas mediante una estrategia de conjugación uniendo el fluoróforo y una serie de ligandos que presentaran la mejor afinidad por los iones Fe^{+2} y Fe^{+3} .
6. Evaluar la fluorescencia con y sin Fe como también evaluar si dichas sondas presentaban selectividad por otros iones.
7. Realizar estudios *in vitro* de penetración celular de las sondas sintetizadas utilizando como modelos biológicos líneas celulares.

4. METODOLOGÍA

4.1. MATERIALES Y MÉTODOS.

La eliminación de los disolventes a presión reducida se realizó en un evaporador rotatorio. Los disolventes se secaron mediante destilación bajo N_2 o empleando agentes desecantes: para secar acetona y acetonitrilo se utilizó tamices moleculares de 3 Å bajo atmósfera de N_2 ; para Et_2O se utilizó sodio metálico. Los demás solventes que fueron utilizados eran de calidad para síntesis. Los disolventes empleados en las extracciones y en la cromatografía eran de grado técnico y se destilaron previamente a su utilización.

Las reacciones fueron monitoreadas utilizando cromatografía en capa fina (CCF) empleando cromatofolios de gel de sílice GF-254 Merck sobre soporte de aluminio. El análisis de los cromatogramas se llevó a cabo iluminándolos con lámparas de UV con emisión a 254 y 365 nm y reveladores como reactivo de Dragendorff, 2,4-dinitrofenilhidracina y/o vapores de yodo según el caso.

La purificación y separación de los productos de la mayoría de las reacciones se realizó mediante cromatografía en columna, utilizando como fase estacionaria gel de sílice 60 Merck de 230-400 mallas, utilizando en algunos casos placas de vidrio de 20 x 20 cm con una capa de 1 a 2 mm de espesor de gel de sílice para cromatografías preparativas en capa fina. El eluyente empleado se indica para cada caso, así como las proporciones utilizadas de los disolventes.

Los puntos de fusión se determinaron en un equipo Reichert-Jung Galen III dotado de una termocupla. Los espectros de UV-Visible fueron registrados en equipos Perkin-Elmer Lambda 11 y Varian Cary® 50, los de fluorescencia en equipos ISS PC1 y Edinburgh Instruments FLS900.

Los espectros de RMN de 1H y de ^{13}C se obtuvieron en un equipo Bruker multidimensional operando a 400 MHz (1H) y 100 MHz (^{13}C). Los solventes que se

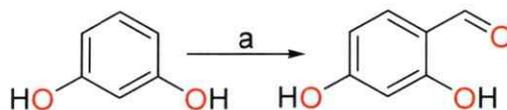
utilizaron en el registro de los espectros fueron CDCl_3 , CD_3OD , D_2O y $\text{DMSO-}d_6$, utilizando TMS o la señal residual de ^1H o de ^{13}C del solvente como referencia interna.

La cristalografía de rayos X en monocristales fue realizada utilizando un difractorómetro Bruker AXS SMART CCD, con radiación $\text{MoK}\alpha$ ($\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$) y monocromador de grafito.

Las imágenes de fluorescencia se midieron utilizando un lector de microplacas BioTek Gen5 y un microscopio de epifluorescencia invertida Zeiss Hal 100.

4.2. SÍNTESIS DE COMPUESTOS.

4.2.1. Procedimiento A; Preparación de 2,4-dihidroxibenzaldehído.

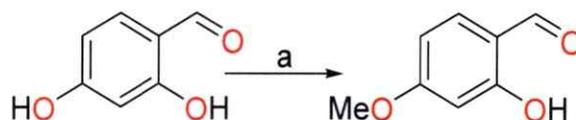


Condiciones: POCl₃, DMF, ACN.

A una disolución de 20,0 g de DMF en 60 mL de ACN con agitación constante se le adicionó 32,5 g de POCl₃ gota a gota manteniendo la temperatura entre 22-28 °C en baño de agua-hielo. Seguidamente se dejó en agitación por 1 h a temperatura ambiente. Esta disolución fue guardada manteniendo la temperatura aproximadamente a -10 °C.

11,1 g (0,111 mmol) de 1,3-dihidroxibenceno se disolvió en 30 mL de ACN y se adicionó lentamente el reactivo de Vilsmeier-Hack manteniendo la temperatura cerca del 0 °C. Luego la mezcla fue agitada por 1 h manteniendo la temperatura entre 28-32 °C. Posteriormente fue vertida en 130 mL de H₂O y agitada a 52 °C por un periodo de 12 min. Seguidamente se dejó reposar hasta alcanzar una temperatura de 35 °C y se le adicionó 1-2 mL de tiosulfato de sodio 0,09 M. La mezcla se dejó en agitación por 2 horas a 5 °C. El precipitado blanco formado fue colectado por filtración y lavado con H₂O fría y secado a 50 °C por varias horas [8,8 g de agujas blancas, 88 %], p.f. 128-130 °C. RMN ¹H (DMSO-*d*₆): δ 10,80 (sa, 2H, O-H), 9,90 (s, 1H, O=C-H), 7,50 (d, 1H, 1H, Ar-H, *J* = 8,6 Hz), 6,39 (dd, 1H, Ar-H, *J* = 8,6, 2,0 Hz), 6,32 (d, 1H, Ar-H, *J* = 2,0 Hz) [54, 55].

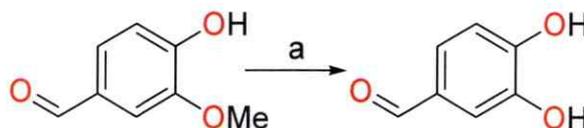
4.2.2. Procedimiento B; preparación de 2-hidroxi-4-metoxibenzaldehído.



Condiciones: a) Me₂SO₄, K₂CO₃, DMF.

A 50 mL de dimetilformamida fueron adicionados 1,38 g de 2,4-dihidroxibenzaldehído (10 mmol), 2,37 g de K_2CO_3 (20 mmol) y 2,50 mL de sulfato de dimetilo (26 mmol) y la mezcla de reacción fue agitada por 30 min. Posteriormente se adicionaron 6,25 mL aproximadamente de agua y la mezcla se llevó a baño de María (sin exceder de 60 °C) durante 1 h. Transcurrido este tiempo la mezcla fue vertida en agua muy fría (300 mL) y el precipitado resultante fue filtrado [8,5 g de un sólido amarillo, 70 %]. p.f. 70-72 °C; 1H RMN ($CDCl_3$): δ 11,46 (s, 1H, O=C-H), 9,68 (s, 1H, O-H), 7,40 (d, 1H, Ar-H, $J = 8,6$ Hz), 6,51 (dd, 1H, Ar-H, $J = 8,6, 2,2$ Hz), 6,39 (d, 1H, Ar-H, $J = 2,2$ Hz), 3,83 (s, 3H, O- CH_3). ^{13}C RMN ($CDCl_3$): δ 55,70, 100,7, 108,4, 115,2, 135,3, 164,6, 166,9, 194,4 [56, 57].

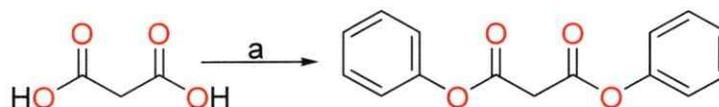
4.2.3. Procedimiento C; preparación de 3,4-dihidroxibenzaldehído.



Condiciones: a) BBr_3 , DCM, agua ácida.

1,01 g de vainillina (6,6 mmol) fueron disueltos en 20 mL de DCM y se agregó 1,6 g de BBr_3 (6,4 mmol) con agitación constante. Un sólido amarillo se formó a medida que se adicionaba el BBr_3 . Seguidamente el color fue cambiando de amarillo a verde con la formación de una costra verde (se rompió con varilla y se trató de disolver con ultrasonido). Transcurridos 20 min adicional y después de haber adicionado porciones de 20 mL de DCM se agregó agua ácida (HCl) y se extrajo la fase acuosa, la cual fue lavada con éter etílico, y se monitoreó la presencia del catecol en la fase orgánica mediante CCF usando como eluyente AcOEt y revelando con $FeCl_3$ [0,65 g, sólido gris, 72 %]. p.f. 62-64 °C; 1H RMN ($CDCl_3$): δ 9,69 (s, 1H, O=C-H), 7,26 (dd, 1H, $J = 8,6, 2,2$ Hz), 7,23 (d, 1H, $J = 8,6$ Hz), 6,90 (d, 1H, $J = 2,2$ Hz) [58].

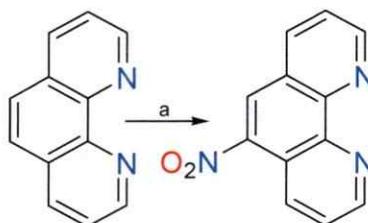
4.2.4. Procedimiento D; preparación de malonato de difenilo.



Condiciones: a) fenol, POCl₃, 115 °C, agua.

Se mezcló 11,0 g (106 mmol) de ácido malónico y 19,95 g (212 mmol) de fenol. A esto se adicionó gota a gota 11,5 mL (123 mmol) de oxiclورو de fósforo frío (0 °C) formándose una solución de tonalidad violácea. La mezcla se calentó con agitación aproximadamente a 115 °C, hasta desaparición de los vapores de HCl. Se dejó enfriar hasta temperatura ambiente quedando un sobrenadante amarillo y una pella de color pardo. El sobrenadante se vertió en 150 mL de agua y fue extraído continuamente 3 veces con 100 mL de éter etílico. El producto fue purificado mediante una CC “flash” con hexano: AcOEt 9:1 [18,5 g de un sólido blanco-amarillento, 60 %], p.f. 50-52 °C; RMN ¹H (CDCl₃): δ 7,15-7,55 (m, 10H, Ar-H), 3,91 (s, 2H, CO-CH₂-CO) [59].

4.2.5. Procedimiento E; preparación de 5-nitro-1,10-fenantrolina.

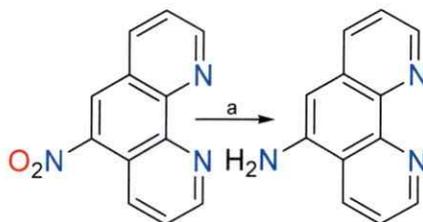


Condiciones: a) H₂SO₄, HNO₃, b) hidracina, Pd/C, EtOH, reflujo, 5 h.

En 15 mL de ácido sulfúrico fumante fueron disueltos 3,00 g (17,6 mmol) de 1,10-fenantrolina monohidratada con agitación constante. Seguidamente se adicionó gota a gota 8 mL de ácido nítrico fumante manteniendo la agitación y controlando la temperatura para que no excediera de 170 °C. Una vez terminada la adición del ácido nítrico se agitó por un periodo de 0,5 h a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo la mezcla fue vertida lentamente en 200 g de escarcha de hielo, se siguió agitando hasta

desaparecer el hielo por completo y luego se neutralizó con NaOH al 40 %. Una vez neutralizada la mezcla de reacción fue adicionado ácido nítrico diluido hasta virar el pH entre 6,0 - 6,5. El precipitado formado se filtró a vacío, se lavó con agua fría, y se secó a 50 °C por 2 h. El producto obtenido se cristalizó en EtOH [2,26 g, sólido amarillo pálido, 67 %]. p.f. 154-156 °C; RMN ¹H (CDCl₃): δ 9,33 (m, 2H, Ar-H,), 9,02 (dd, 1H, Ar-H, *J* = 8,6, 1,7 Hz), 8,69 (s, 1H, Ar-H), 8,44 (d, 1H, Ar-H, *J* = 8,4, 1,7 Hz), 7,81 (m, 2H, Ar-H) [60].

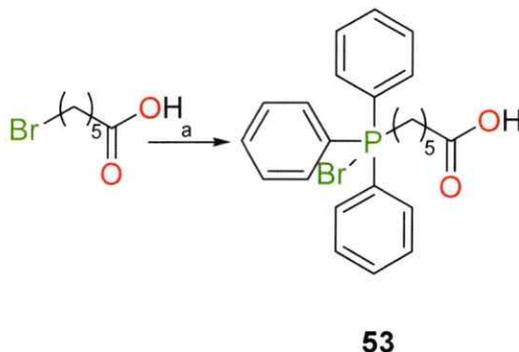
4.2.5.1. 5-Amino-1,10-fenantrolina.



Condiciones: a) hidracina, Pd/C, EtOH, reflujo, 5 h.

Se diluyó 1 mL de hidracina monohidratada en 20 mL de EtOH, adicionando esta solución gota a gota a una suspensión de 1,0 g (4,4 mmol) de 5-nitro-1,10-fenantrolina y Pd/C 5 % (100 mg) en 50 mL de EtOH con agitación. Terminada la adición la mezcla fue calentada a 70 °C por 5 h. Culminando el tiempo de reacción la mezcla fue filtrada a través de Celite® y después concentrada hasta alcanzar un volumen aproximado de 10 mL, al que se le adicionó agua lentamente hasta formar un precipitado. Luego se dejó en reposo y se bajó la temperatura hasta alcanzar 0 °C y así se procedió a filtrar y a secar a temperatura ambiente obteniéndose 5-amino-1,10-fenantrolina [0,58 g, sólido amarillo luminoso, 72 %]. p.f. 128-130 °C; RMN ¹H (CDCl₃): δ 9,05 (dd, 1H, C-H, *J* = 4,2, 1,5 Hz), 8,68 (m, 2H, Ar-H), 8,04 (dd, 1H, Ar-H, *J* = 8,0, 1,5 Hz), 7,73 (dd, 1H, Ar-H, *J* = 8,2, 4,2 Hz), 7,50 (dd, 1H, Ar-H, *J* = 8,2, 4,2 Hz), 6,86 (s, 1H, Ar-H), 6,19 (s, 2H, Ar-NH₂) [61].

4.2.6. Procedimiento F; preparación de bromuro de (5-carboxipentil)-trifenilfosfonio (**53**).

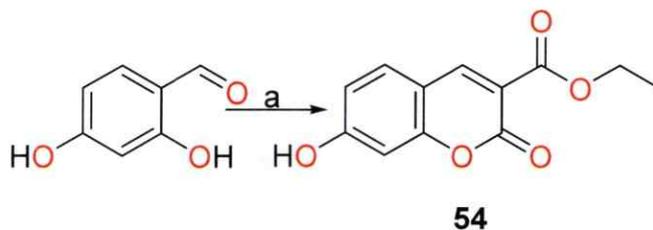


Condiciones: a. trifenilfosfina, ACN, reflujo, N₂, 16 h.

Una solución de 2,00 g (8,0 mmol) de trifenilfosfina (TTP) y 2,80 g (14 mmol) de ácido-6-bromohexanoico se disolvieron en 10 mL de ACN seco y seguidamente la mezcla fue calentada bajo reflujo por 16 horas bajo atmosfera de N₂. Transcurrido el tiempo de reacción ésta fue dejada en reposo hasta alcanzar temperatura ambiente y una pella de color pardo formada fue redisuelta en acetona induciendo la cristalización de **53** [3,0 g, sólido cristalino blanco, 82 %]. p.f. 197-199 °C; RMN ¹H (CDCl₃): δ 7,79-7,66 (m, 15H, Ar-H), 3,63-3,56 (m, 2H, CH₂-COOH), 2,36-2,33 (m, 2H, P-CH₂), 1,64 (s, 6H, CH₂-CH₂-CH₂) [62].

4.3. SINTESIS DE CUMARINAS Y DERIVADOS.

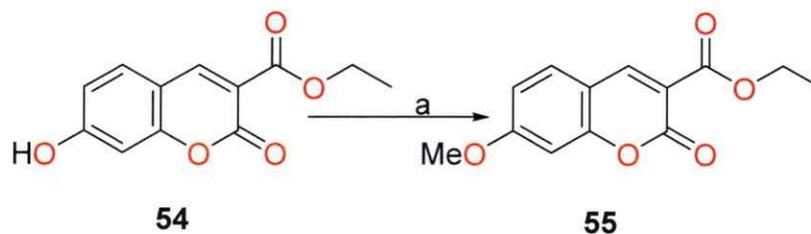
4.3.1. Procedimiento G; preparación de 7-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-carboxilato de etilo (54).



Condiciones: a) Malonato de dietilo, piperidina, AcOH, EtOH, 70 °C, 6 h; b) Me₂SO₄, K₂CO₃, DMF; c) HCl, H₂O/EtOH reflujo, 4 h.

2,4-Dihidroxibenzaldehído (6,90 g, 50 mmol) fue disuelto en 70 mL de etanol y a esta solución se adicionó (9,60 g, 60 mmol) de malonato de etilo, se agitó por 2 min y posteriormente se agregó 0,5 mL de piperidina y 2 gotas de ácido acético glacial. La mezcla fue calentada a reflujo por 6 h y seguidamente vertida en escarcha de hielo. Un sólido amarillo formado fue filtrado y lavado utilizando una mezcla EtOH:H₂O al 50 % (20 mL). El sólido se recrystalizó en EtOH originando unos cristales de color amarillo (**54**) [5,6 g, 52 %]. p.f. 131-133 °C; RMN ¹H (DMSO-*d*₆): δ 8,60 (s, 1H, =C-H), 7,74 (d, 1H, Ar-H, *J* = 8,6 Hz), 6,82 (dd, 1H, Ar-H, *J* = 8,6, 2,0 Hz), 6,71 (d, 1H, Ar-H, C-H, *J* = 2,0 Hz), 4,24 (q, 2H, O-CH₂-, *J* = 7,1 Hz), 1,28 (t, 3H, -CH₃, *J* = 7,1 Hz) [63].

4.3.2. 7-Metoxi-2-oxo-2H-cromen-3-carboxilato de etilo (55).

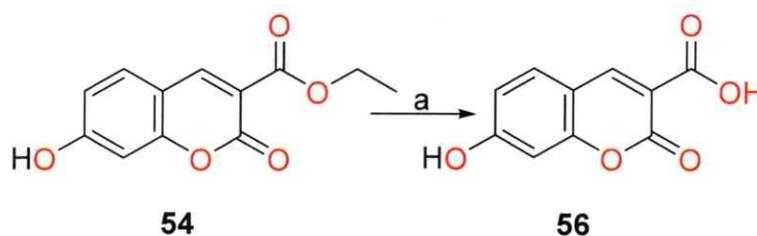


Condiciones: a) Me_2SO_4 , K_2CO_3 , DMF.

El compuesto **55** se sintetizó a partir de **54** (2,34 g, 10 mmol), K_2CO_3 (2,37 g, 20 mmol) y (3,28 g, 26 mmol) de sulfato de metilo, según el procedimiento B [8,5 g, sólido amarillo, 70 %]. p.f. 124-126 °C; RMN ^1H ($\text{DMSO}-d_6$): δ 8,50 (s, 1H, =C-H), 7,50 (d, 1H, Ar-H, $J = 8,6$ Hz), 6,86 (dd, 1H, Ar-H, $J = 8,6, 2,0$ Hz), 6,80 (d, 1H, Ar-H, $J = 2,0$ Hz), 4,36 (q, 2H, O- CH_2 -, $J = 7,1$ Hz), 3,90 (s, 3H, O- CH_3), 1,40 (t, 3H, - CH_3 , $J = 7,1$ Hz).

4.3.3. Procedimiento H; preparación de ácido-7-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-carboxílico (56).

4.3.3.1. Método Ha.

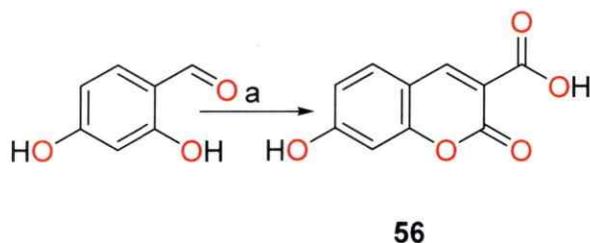


Condiciones: a) HCl, $\text{H}_2\text{O}/\text{EtOH}$ reflujo, 4 h.

A una solución de 2,50 g (10,7 mmol) de 7-hidroxi-2-oxo-2H-1-cromen-3-carboxilato de etilo (**54**) fue adicionada una mezcla de 50 mL de $\text{H}_2\text{O}:\text{EtOH}$ 1:1 y 5 mL de HCl 37 %. Esta mezcla se hirvió bajo reflujo por 24 h, hasta un viraje de color amarillo a una tonalidad verde-amarilla. Una vez transcurrido el tiempo estipulado la mezcla se dejó

enfriar y el precipitado fue filtrado y secado a temperatura ambiente. Seguidamente se purificó por medio de una CC utilizando como fase móvil CH_2Cl_2 :acetona:AcOH 8:2:0.1 obteniéndose **56** [1,6 g, sólido amarillo-naranja, 77 %] [63].

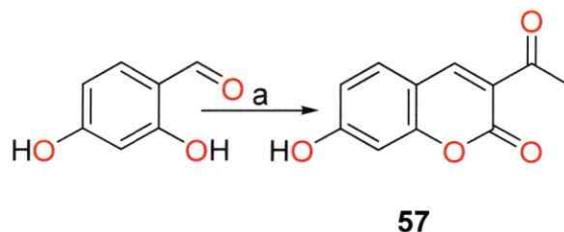
4.3.3.2. Método Hb.



Condiciones: a) ácido de Meldrum, agua, T. A.

A una suspensión de 1,30 g de 2,4-dihidroxi-benzaldehído (9,5 mmol) en 21 mL de agua se le adicionó 1,55 g de ácido de Meldrum (10,8 mmol) y 150 mg de acetato de amonio (1,9 mmol). La suspensión fue agitada a temperatura ambiente por cerca de 1 h. El precipitado formado se filtró y fue lavado con agua muy fría (2 x 10 mL) y secado a vacío: compuesto **56** [1,5 g, sólido amarillo-naranja, 77 %]. p.f 260-264 °C; RMN ^1H ($\text{DMSO}-d_6$): δ 11,93 (sa, 2H, O-H), 8,66 (s, 1H, =C-H), 7,73 (d, 1H, Ar-H, $J = 8,6$ Hz), 6,83 (dd, 1H, Ar-H, $J = 8,6-2,1$ Hz), 6,72 (d, 1H, Ar-H, $J = 2,1$ Hz) [64].

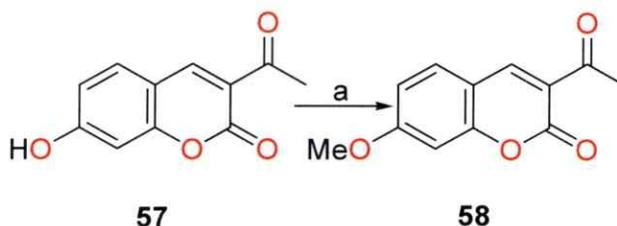
4.3.4. 3-Acetil-7-hidroxi-2H-cromen-2-ona (57).



Condiciones: a) acetoacetato de etilo, piperidina, AcOH, EtOH, 70 °C, 6 h.

La síntesis de **57** fue hecha a partir de 2,4-dihidroxibenzaldehído (8,0 g, 58 mmol) y acetoacetato de etilo (9,6 g, 60 mmol), según el procedimiento G, [8,5 g, sólido amarillo, 70 %]. p.f. 214-216 °C; ^1H RMN (DMSO- d_6): δ 8,38 (s, 1H, =C-H), 7,52 (d, 1H, Ar-H, $J = 8,8$ Hz), 6,51 (d, 1H, Ar-H, $J = 8,8$ Hz), 6,31 (s, 1H, Ar-H), 2,47 (s, 3H, -CH₃) [65].

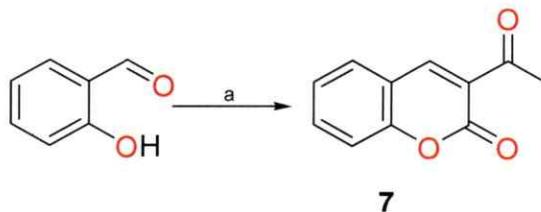
4.3.5. 3-Acetil-7-metoxi-2H-cromen-2-ona (**58**).



Condiciones: a) Me₂SO₄, K₂CO₃, DMF.

El compuesto **58** fue sintetizado a partir de **57** (2,0 g, 10 mmol), K₂CO₃ (2,37 g, 20 mmol) y 2,50 mL de Me₂SO₄ (26 mmol), de acuerdo al método B, [1,708 g, sólido amarillo, 78 %]. p.f. 169-171 °C; ^1H RMN (CDCl₃): δ 8,44 (s, 1H, =C-H), 7,50 (d, 1H, Ar-H, $J = 8,8$ Hz), 6,86 (d, 1H, Ar-H, $J = 8,8$ Hz), 6,78 (s, 1H, Ar-H), 3,88 (s, 3H, O-CH₃), 2,66 (s, 3H, CO-CH₃) [65].

4.3.6. 3-Acetil-2H-cromen-2-ona (**7**).

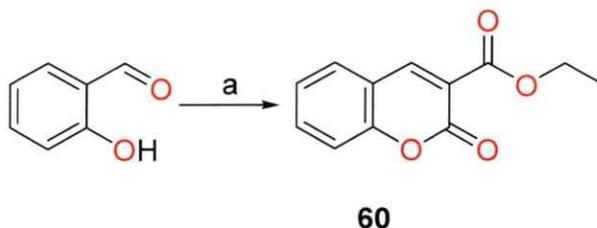


Condiciones: a) acetoacetato de etilo, piperidina, AcOH, EtOH, 70 °C, 6 h.

La síntesis de **7** fue hecha a partir de *o*-hidroxibenzaldehído (8,0 g, 65 mmol) y acetoacetato de etilo (8,5 g, 65 mmol), según la metodología G [10,1 g, sólido amarillo,

90 %]. p.f. 96-98 °C; ^1H RMN (CDCl_3): δ 8,50 (s, 1H, =C-H), 7,65-7,60 (m, 2H, Ar-H), 7,35-7,30 (m, 2H, Ar-H), 2,70 (s, 3H, CO-CH₃) [65, 66].

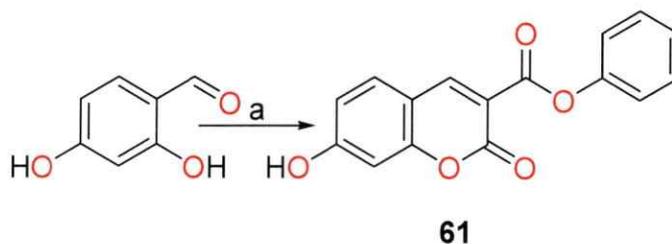
4.3.7. 2-Oxo-2H-cromen-3-carboxilato de etilo (60).



Condiciones: a) Malonato dietilo, piperidina, AcOH, EtOH, 70 °C, 6 h.

La síntesis de **60** fue hecha a partir de *o*-hidroxibenzaldehído (8,0 g, 65 mmol) y malonato de etilo (10,5 g, 65 mmol), según el procedimiento G, [8,7 g, sólido amarillo, 61 %]. p.f. 86-88 °C; ^1H RMN (CDCl_3): δ 8,50 (s, 1H, =C-H), 7,60-7,50 (m, 2H, Ar-H), 7,32-7,29 (m, 2H, Ar-H), 4,4 (q, 2H, COO-CH₂- $J = 7,1$ Hz), 1,4 (t, 3H, -CH₃ $J = 7,1$ Hz) [67].

4.3.8. 7-Hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-carboxilato de fenilo (61)

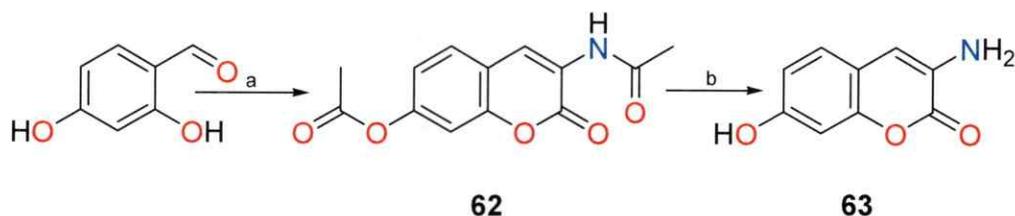


Condiciones: a) Malonato de difenilo, piperidina, AcOH, EtOH, 70 °C, 6 h.

La síntesis de **61** fue hecha a partir de 2,4-dihidroxibenzaldehído (3,00 g, 21 mmol) y malonato de difenilo (5,10 g, 21 mmol), siguiendo la metodología G [4,3 g, sólido cristalino, 73 %]. p.f. 278-280 °C; ^1H RMN (CDCl_3): δ 11,20 (sa, 1H), 8,90 (s, 1H, =C-H), 7,80 (d, 1H, Ar-H, $J = 8,6$ Hz), 7,50 (t, 2H, Ar-H, $J = 7,5$ Hz), 7,30 (t, 1H, Ar-H, $J =$

7,5 Hz), 7,20 (d, 2H, Ar-H, $J = 7,5$ Hz), 6,86 (dd, 1H, Ar-H, $J = 8,6, 2,0$ Hz), 6,75 (d, 1H, Ar-H, $J = 2,0$ Hz) [68].

4.3.9. Procedimiento I; preparación de 3-amino-7-hidroxi-2H-cromen-2-ona (63).



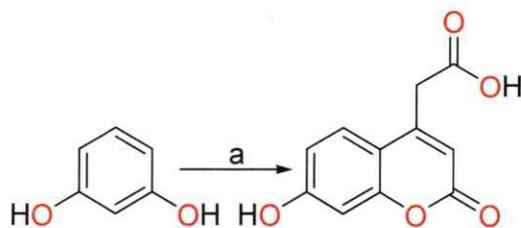
Condiciones: a) Acetilglicina, anhídrido acético, acetato de sodio anhidro, b) HCl/H₂O 2:1 reflujo, 2 h.

Una mezcla de 2,4-dihidroxibenzaldehído (2,76 g, 20 mmol), *N*-acetilglicina (2,34 g, 20 mmol) y acetato de sodio anhidro (4,92 g, 60 mmol) se adicionó a 100 mL de anhídrido acético y se calentó a reflujo por 6 h. La mezcla de reacción fue recogida en escarcha de hielo formándose un precipitado el cual fue filtrado, secado y purificado por CC del gel de sílice, usando como fase móvil una mezcla AcOEt:Hex 7:3 obteniéndose **62** [1,65 g, sólido blanco, 32 %].

¹H RMN (D₂O): δ 8,68 (s, 1H, =C-H), 8,20 (sa, 1H, -NH-), 7,51 (d, 1H, Ar-H, $J = 8,4$ Hz), 7,12 (d, 1H, Ar-H, $J = 2,0$ Hz), 7,07 (dd, 1H, Ar-H, $J = 8,4, 2,0$ Hz), 2,34 (s, 3H, -CH₃), 2,25 (s, 3H, -CH₃).

A una mezcla 2:1 de HCl (37 %):EtOH se adicionó 1,5 g de 3-acetamido-2-oxo-2H-cromen-7-il acetato (**62**) (57 mmol), la solución fue calentada a reflujo por 2 h y transcurrido ese tiempo se vertió en agua-hielo y la mezcla se neutralizó con NaOH al 30 % hasta un pH de 5-6. El precipitado obtenido fue filtrado y recristalizado en EtOH (**63**) [1,1 g, sólido amarillo, 96 %]. p.f. 220-222 °C; ¹H RMN (DMSO-*d*₆): δ 9,80 (s, 1H, =C-H), 7,20 (d, 1H, Ar-H, $J = 8,4$ Hz), 6,70 (s, 1H, Ar-H), 6,66 (d, 1H, Ar-H, $J = 8,4$ Hz), 5,20 (sa, 2H, -NH₂) [69].

4.3.10. Procedimiento J; preparación de 2-(7-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-4-il)-acetato de etilo (64).

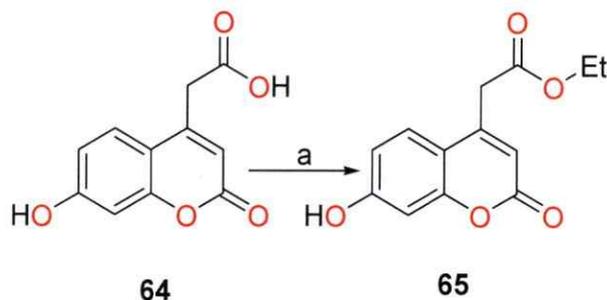


64

Condiciones: a) ácido cítrico, H₂SO₄, agitación 48 h., b) EtOH, H₂SO₄, reflujo 5-8 h.

10,0 g (90 mmol) de 1,3-dihidrobenceno fueron disueltos en 60 mL de H₂SO₄ y esta mezcla se enfrió a 0 °C. 19,0 g (90 mmol) de ácido cítrico monohidratado fue adicionado lentamente a 70 mL de H₂SO₄ 96 % a 0 °C manteniendo la temperatura hasta que culminó la adición. Seguidamente se agitó y cada 15 min, se aumentó la temperatura sutilmente por un periodo de 1,5 h hasta 40 °C. La mezcla se tornó de un color amarillo transparente con desprendimiento de gas y se dejó en reposo por 15 minutos hasta la desaparición de burbujas. Luego se enfrió hasta los 5 °C y se adicionó gota a gota la disolución de 1,3-dihidrobenceno en H₂SO₄ manteniendo la temperatura. Una vez terminada la adición la mezcla se dejó en agitación por 48 h. Transcurrido el tiempo la mezcla de reacción fue vertida lentamente en 300 g de escarcha de hielo y de manera inmediata empezó a formarse un sólido blanco el cual fue filtrado una vez que se fundió todo el hielo. El precipitado formado fue suspendido en una solución de bicarbonato de sodio al 5 %, y el sólido lavado se filtró: **64** [13,5 g, sólido cristalino, 68 %]. p.f. 204-206 °C; ¹H RMN (D₂O): δ 7,35 (d, 1H, Ar-H, *J* = 8,8 Hz), 6,67(dd, 1H, Ar-H, *J* = 8,8, 2,4 Hz), 6,50 (d, 1H, Ar-H, *J* = 2,4 Hz), 6,00 (s, 1H, =C-H), 3,50 (s, 2H, -CH₂-) [70].

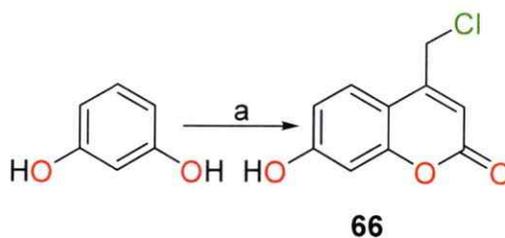
4.3.11. 2-(7-Hidroxi-2-oxo-2H-cromen-4-il)-acetato de etilo (65).



Condiciones: a) EtOH, H₂SO₄, reflujo 5-8 h.

4-Carboximetil-7-hidroxi-2-oxo-2H-1-cromeno (**12**) (10,0 g, 45 mmol) se disolvió en 100 mL de EtOH y seguidamente fueron adicionados 10 mL de H₂SO₄ gota a gota con agitación constante, la mezcla fue calentada a reflujo y la reacción fue monitoreada utilizando CCF. Como resultado, al cabo de 5 h la reacción fue detenida y concentrada a presión reducida. El producto fue purificado por CC utilizando como fase móvil AcOEt, obteniéndose **65** [7,8 g, sólido cristalino, 70 %]. p.f 152-154 °C; ¹H RMN (DMSO-*d*₆): δ 10,60 (sa, 1H, O-H), 7,50 (d, 1H, Ar-H, *J* = 8,4 Hz), 6,80 (dd, 1H, Ar-H, *J* = 8,4, 2,0 Hz), 6,70 (d, 1H, Ar-H, *J* = 2,0 Hz), 6,20 (s, 1H, =C-H), 4,10 (q, 2H, O-CH₂-, *J* = 7,0 Hz), 3,90 (s, 2H, -CH₂-), 1,2 (t, 3H, -CH₃-*J* = 7,0 Hz) [70].

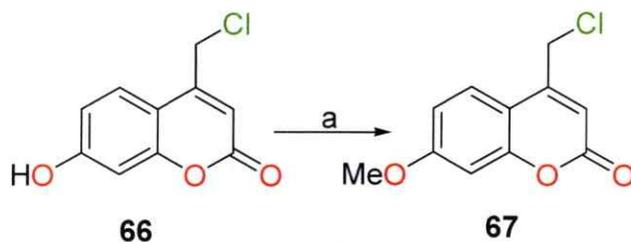
4.3.12. Procedimiento K; preparación de 4-clorometil-7-hidroxi-2H-cromen-2-ona (66).



Condiciones: a) 4-cloroacetoacetato de etilo, H₂SO₄, 0 °C. b) Me₂SO₄, K₂CO₃, DMF., c) H₂O reflujo, 12 h.

10,0 g, (90,9 mmol) de 1,3-dihidroxibenceno fueron adicionados a 11,0 mL (73,3 mmol) de 4-cloroacetoacetato de etilo y agitados por 10 min. Seguidamente esta mezcla fue adicionada lentamente con agitación constante a 100 mL de H₂SO₄ 96 % a 0 °C manteniendo la temperatura con un baño de agua-hielo hasta completar la adición. La mezcla se agitó por 4 h y una vez transcurrido el tiempo la mezcla fue vertida lentamente en 200 g de escarcha de hielo y se dejó en reposo durante toda la noche. Posteriormente se filtró y se recrystalizó en MeOH caliente obteniendo **66** [12,1 g, sólido blanco, 63 %]. p.f. 178-180 °C; ¹H RMN (DMSO-*d*₆): δ 11,72 (sa, 1H, O-H), 7,63 (d, 1H, Ar-H, *J* = 12,0 Hz), 6,82 (dd, 1H, Ar-H, *J* = 12,0, 1,0 Hz), 6,73 (d, 1H, Ar-H, *J* = 1,0 Hz), 6,39 (s, 1H, =C-H), 4,91 (s, 2H, -CH₂-) [36].

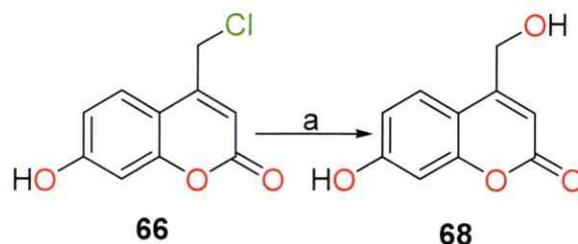
4.3.13. 4-Clorometil-7-metoxi-2H-cromen-2-ona (**67**).



Condiciones: a) Me₂SO₄, K₂CO₃, DMF.

El compuesto **67** fue sintetizado a partir de **66** (2,24 g, 10,6 mmol), K₂CO₃ (2,37 g, 20,0 mmol) y 2,5 mL de (CH₃)₂SO₄ (26 mmol), de acuerdo al método B [1,7 g, sólido blanco, 76 %]. pf 174-176 °C; RMN ¹H (CDCl₃): δ 7,57 (d, 1H, Ar-H, *J* = 8,8 Hz), 6,90 (dd, 1H, Ar-H, *J* = 8,8, 2,5 Hz), 6,85 (d, 1H, Ar-H, *J* = 2,5 Hz), 6,41 (s, 1H, =C-H), 4,63 (s, 2H, -CH₂-), 3,90 (s, 3H, O-CH₃) [36].

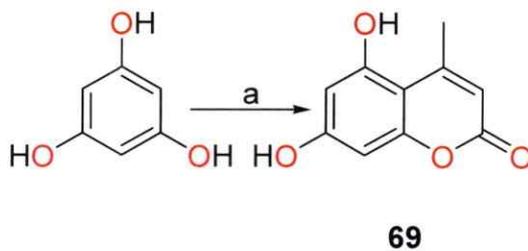
4.3.14. 4-Hidroximetil-7-hidroxi-2H-cromen-2-ona (68).



Condiciones: a) H₂O, reflujo, 12 h.

A 400 mL de agua se adicionó 1,0 g (4,8 mmol) de 4-clorometil-7-hidroxi-2H-cromen-2-ona (**66**) y la mezcla fue calentada a reflujo por 7 h. Seguidamente la solución fue concentrada hasta alcanzar un volumen de 100 mL y se dejó en reposo enfriando hasta 0 °C. El filtrado que se formó fue filtrado y purificado por CC utilizando como fase móvil CH₂Cl₂:acetona 9:1 para dar **68** [0,812 g, sólido blanco, 87 %]. p.f. 178-180 °C; RMN ¹H (DMSO-*d*₆): δ 10,59 (sa, 1H, O-H), 7,49 (d, 1H, Ar-H, *J* = 8,6 Hz), 6,76 (dd, 1H, Ar-H, *J* = 8,6, 2,0 Hz), 6,71 (d, 1H, Ar-H, *J* = 2,0 Hz), 6,22 (s, 1H, Ar-H), 5,63 (sa, 1H, O-H), 4,68 (s, 2H, -CH₂-) [71].

4.3.15. 5,7-Dihidroxi-4-metil-2H-cromen-2-ona (69).

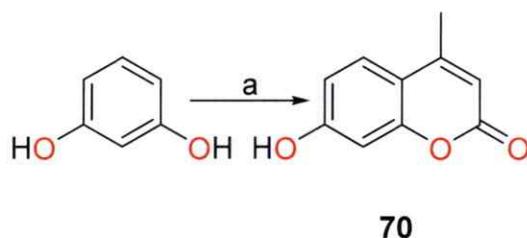


Condiciones: a) acetoacetato de etilo, H₂SO₄, 0 °C.

La síntesis de **69** se hizo a partir de 1,3,5-trihidroxibenceno (3,8 g, mmol) y acetoacetato de etilo (3,9 g 30 mmol), de acuerdo a la metodología K [2,7 g, sólido blanco, 52 %]. p.f. 221-223 °C; RMN ¹H (CDCl₃): δ 10,53 (sa, 1H, O-H), 10,31 (sa, 1H, O-H), 6,25 (d,

1H, Ar-H, $J = 1,0$ Hz), 6,16 (d, 1H, Ar-H, $J = 1,0$ Hz), 5,84 (s, 1H, =C-H), 2,48 (s, 3H, -CH₃-).

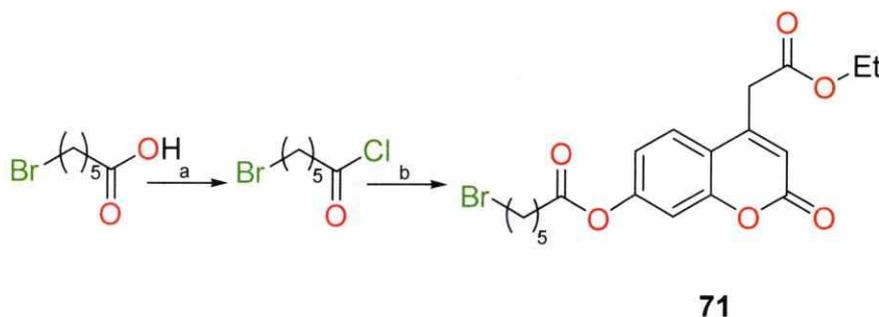
4.3.16. 7-Hidroxi-4-metil-2H-cromen-2-ona (70).



Condiciones: a) acetoacetato de etilo, H₂SO₄, 0 °C.

El compuesto **70** se sintetizó a partir de 1,3-dihidroxibenceno (10,0 g, 90,9 mmol) y 11 mL (92,8 mmol) de acetoacetato de etilo, según método K [12,5 g, sólido cristalino, 78 %]. p.f. 154-156 °C; RMN ¹H (DMSO-*d*₆): δ 10,54 (sa, 1H, O-H), 7,55 (d, 1H, Ar-H, $J = 8,0$ Hz), 6,78 (dd, 1H, Ar-H, $J = 8,0, 2,0$ Hz), 6,68 (d, 1H, Ar-H, $J = 2,0$ Hz), 6,10 (s, 1H, =C-H), 2,33 (s, 3H, -CH₃) [72, 73].

4.3.17. Procedimiento L; preparación de 6-bromohexanoato de 4-(2-etoxi-2-oxoetil)-2-oxo-2H-cromen-7-ilo (71).

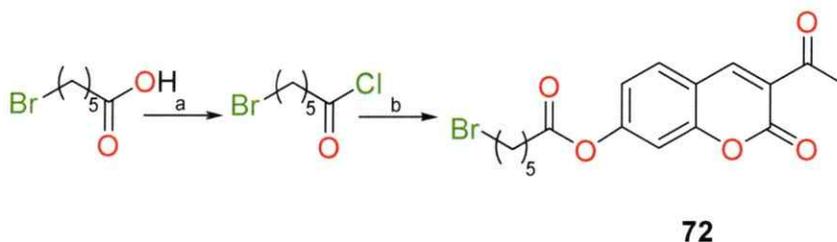


Condiciones: a) SOCl₃, reflujo 4 h., b) 2-(7-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-4-il)etil éster, TEA.

2,00 g de ácido 6-bromohexanoico (10 mmol) fueron adicionados a 10 mL de cloruro de tionilo, la mezcla se hirvió bajo reflujo por un periodo de 4 h, seguidamente se concentró

a presión reducida y se lavó con DCM tres veces obteniendo el cloruro de ácido intermediario. Éste se disolvió en 15 mL de DCM y se dejó gotear lentamente a una solución en 30 mL de DCM que contenía 2,3 g de 2-(7-hidroxi-2-oxo-2*H*-cromen-4-il) acetato de etilo (10 mmol) y 1,5 mL de trietilamina (TEA) (11 mmol). La mezcla fue agitada por 4 h y se concentró a presión reducida, luego se purificó en CC utilizando como fase móvil DCM para obtener **71** [3,85 g, sólido blanco, 96 %]. p.f. 64-66 °C; ¹H RMN (CDCl₃): δ 7,60 (d, 1H, Ar-H, *J* = 8,6 Hz), 7,14 (d, 1H, Ar-H, *J* = 2,0 Hz), 7,07 (dd, 1H, Ar-H, *J* = 8,6, 2,0 Hz), 6,37 (s, 1H, =C-H), 4,19 (dd, 2H, *J* = 14,2, 7,0 Hz), 3,76 (s, 2H), 3,45 (t, 2H, -CH₂-, 6,6), 2,63 (t, 2H, -CH₂-, *J* = 7,3 Hz), 1,94 (qui, 2H, -CH₂-, *J* = 7,0 Hz), 1,80 (qui, 2H, -CH₂-, *J* = 7,7 Hz), 1,59 (m, 2H, -CH₂-), 1,26 (t, 3H, *J*=7,1 Hz); ¹³C RMN (CDCl₃): δ 14,1, 23,9, 27,5, 32,3, 33,4, 34,1, 38,3, 61,9, 110,7, 116,5, 116,7, 118,3, 125,5, 147,7, 153,3, 154,4, 160,0, 168,4, 171,1.

4.3.18. 6-Bromohexanoato de 3-acetil-2-oxo-2*H*-cromen-7-ilo (**72**).

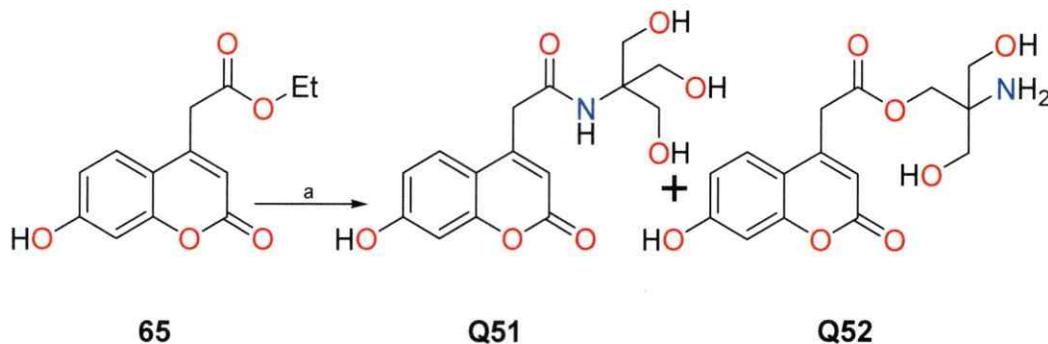


Condiciones: a) SOCl₃, reflujo 4 h., b) 2-(7-hidroxi-2-oxo-2*H*-cromeno-4-il)etil ester, TEA.

El compuesto **72** se sintetizó a partir de ácido 6-bromohexanoico (1,00 g, 5,1 mmol) y **57** (1,00 g, 5,1 mmol), siguiendo el método L [1,75 g, sólido blanco, 96 %]. p.f. 100-102 °C; ¹H RMN (CDCl₃): δ 8,47 (s, 1H, =C-H), 7,64 (d, 1H, Ar-H, *J* = 8,6 Hz), 7,14 (d, 1H, Ar-H, *J* = 2,0 Hz), 7,09 (dd, 1H, Ar-H, *J* = 8,6, 2,0 Hz), 3,42 (t, 2H, -CH₂-, *J* = 6,6 Hz), 2,69 (s, 3H, CO-CH₃), 2,62 (t, 2H, -CH₂-, *J* = 7,3 Hz), 1,91 (qui, 2H, -CH₂-, *J* = 7,1 Hz), 1,78 (qui, 2H, -CH₂-, *J* = 7,8 Hz), 1,6 (m, 2H, -CH₂-); ¹³C RMN (CDCl₃): δ 23,9, 27,5, 30,5, 32,3, 33,3, 34,1, 110,1, 116,0, 119,1, 123,7, 131,1, 146,98, 155,3, 156,1, 158,9, 170,9, 195,2.

4.4. CUMARINAS DERIVADAS CON TRIS(HIDROXIMETIL)AMINOMETANO.

4.4.1. Procedimiento M. Preparación de *N*-(1,3-dihidroxi-2-(hidroximetil)propan-2-il)-2-(7-hidroxi-2-oxo-2*H*-cromen-4-il)acetamida (**Q51**) y 2-amino-3-hidroxi-2-(hidroximetil)propil 2-(7-hidroxi-2-oxo-2*H*-cromen-4-il)acetato (**Q52**).

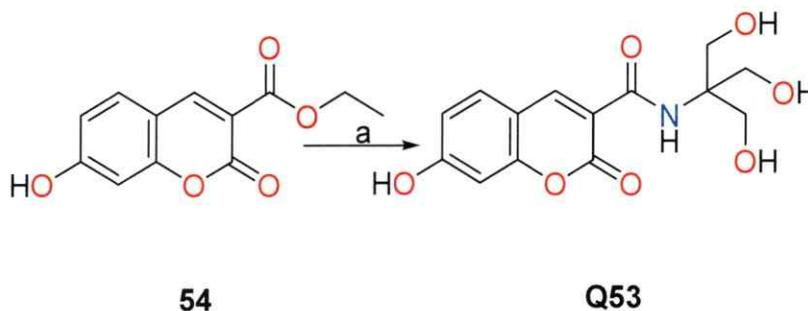


Condiciones: a) EtOH, TRIS, reflujo 48 h.

Procedimiento La; 1,0 g de 2-(7-hidroxi-2-oxo-2*H*-cromen-4-il) acetato de etilo (**13**) (4 mmol) y 0,6 g de 2-amino-2-(hidroximetil)propano-1,3-diol (“tris”) (5 mmol) fueron disueltos en 30 mL de etanol y la mezcla fue calentada a reflujo durante 20 h. El producto se purificó por cromatografía en columna utilizando como fase móvil DCM/MeOH 98:2, obteniendo el compuesto **Q51** [0,9 g, sólido blanco, 70 %], p.f. 145-147 °C [74]. Procedimiento Lb; cuando la reacción se prolongaba por 48 horas adicionales permitiendo la casi desaparición del solvente y se obtuvo una mezcla de los compuestos **Q51** y **Q52** que se fraccionó por cromatografía en columna utilizando como fase móvil DCM/MeOH 98:2; **Q51** [0,5 g, sólido blanco, 39 %] p.f. 145-147 °C; ¹H RMN **Q51**(DMSO-*d*₆): δ 7,65 (s, 1H, Ar-H), 7,62 (d, 1H, Ar-H, *J* = 8,6 Hz), 6,76 (dd, Ar-H, 1H, *J* = 8,6, 2,0 Hz), 6,69 (d, 1H, Ar-H, *J* = 2,0 Hz), 6,17 (s, 1H, =C-H), 4,70 (sa, 3H, O-H), 3,70 (s, 2H, -CH₂-), 3,55 (s, 6H, -CH₂-OH); ¹³C RMN (DMSO-*d*₆): δ 60,8, 63,0, 102,7, 111,7, 111,8, 113,5, 127,3, 152,1, 155,5, 160,8, 162,0, 169,3; y **Q52** [0,35 g, sólido blanco, 27 %], p.f 240-242; ¹H RMN (DMSO-*d*₆): δ 10,58 (sa, 1H, O-H), 7,63 (d, 1H, Ar-H, *J* = 8,8 Hz), 6,77 (dd, 1H, Ar-H, *J* = 8,8, 2,0 Hz), 6,71 (d, 1H, Ar-H, *J* = 2,0 Hz), 6,30 (s, 1H, =C-H), 4,79 (sa, 2H, -CH₂-), 4,10 (s, 2H, -NH₂), 3,78 (s, 2H, -CH₂-),

3,43-3,30 (m, 4H, -CH₂-); ¹³C RMN (DMSO-d₆): δ 31,2, 64,2, 71,1, 77,2, 102,7, 111,6, 113,4, 127,2, 151,2, 155,4, 160,1, 161,7, 163,1.

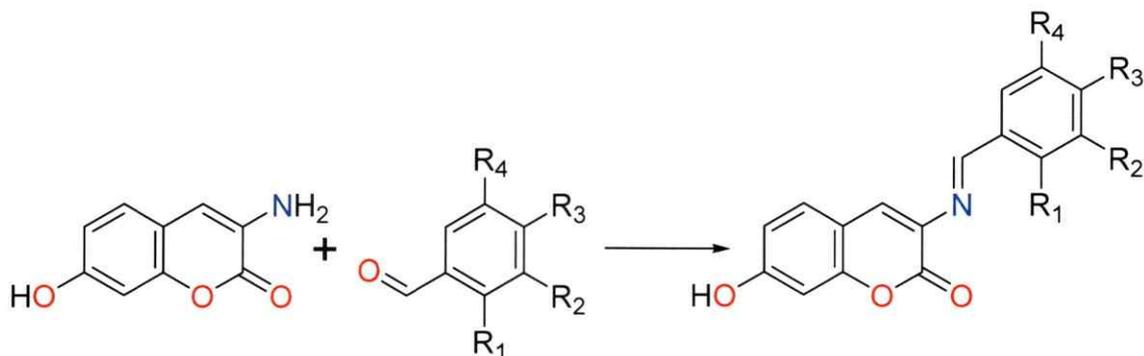
4.4.2. Síntesis de *N*-(1,3-dihidroxi-2-(hidroximetil)propan-2-il)-7-hidroxi-2-oxo-2*H*-cromen-3-carboxamida (Q53).



Condiciones: a) EtOH, TRIS, reflujo 48 h.

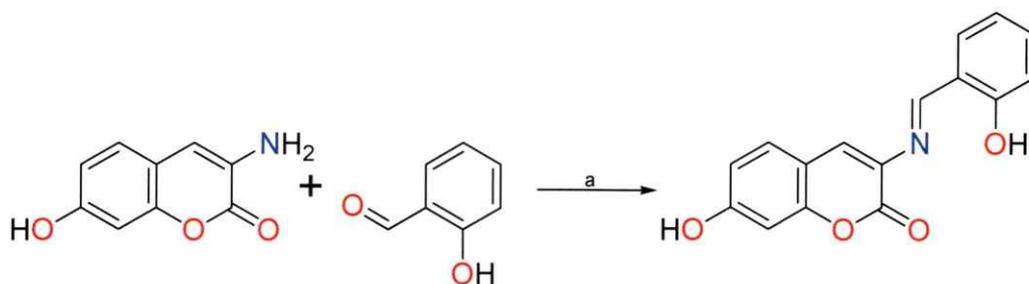
El compuesto **Q53** se sintetizó a partir de **2** (1,0 g, 4 mmol) y 2-amino-2-(hidroximetil)propano-1,3-diol (tris) (0,52 g, 5 mmol) de acuerdo al método La, [0,98 g, sólido blanco, 76 %], p.f 252-254 °C; ¹H RMN (DMSO-*d*₆): δ 8,98 (s, 1H, =C-H), 8,74 (s, 1H, CO-NH-), 7,72 (d, 1H, Ar-H, *J* = 8,6 Hz), 6,79 (dd, 1H, Ar-H, *J* = 8,6, 2,0 Hz), 6,68 (d, 1H, Ar-H *J* = 2,0 Hz), 4,78 (sa, 3H, O-H), 3,63 (s, 6H, -CH₂-); ¹³C RMN (DMSO-*d*₆): δ 60,8, 62,7, 102,4, 110,7, 112,5, 115,9, 132,4, 148,4, 157,3, 161,9, 162,6, 166,8.

4.5. DERIVADOS DE (3E)-3-(BENCILIDENAMINO)-2H-CROMEN-2-ONA (BS).



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
BS-1	OH	H	H	H
BS-2	OMe	H	H	H
BS-3	OH	OMe	H	H
BS-4	OMe	OMe	H	H
BS-5	OH	H	OH	H
BS-6	H	H	O(CS)N(Me) ₂	H
BS-7	OMe	H	H	OMe

4.5.1. Procedimiento N. (E)-7-Hidroxi-3-(2-hidroxibencilidenamino)-2H-cromen-2-ona (BS-1).



63

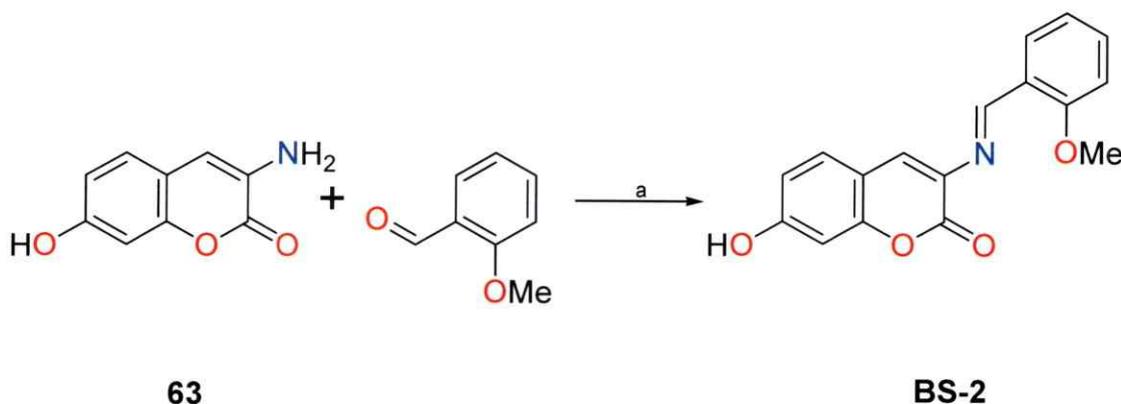
BS-1

Condiciones: a) EtOH, reflujo 5 h.

A partir de **63** (0,56 g, 31 mmol) y *o*-hidroxibenzaldehído (0,38 g, 3 mmol), se adicionaron en 10 mL de EtOH absoluto y se calentaron a reflujo por 2-4 h, a medida que transcurría el tiempo de reacción se formó un precipitado. Finalmente el sólido se

lavo con un exceso de EtOH absoluto caliente obteniendo **BS-1** [0,85 g, sólido amarillo pálido, 80 %]. p.f. 248-250 °C; ^1H RMN (DMSO- d_6): δ 12,89 (s, 1H, O-H- -O=C), 10,62 (sa, 1H, O-H), 9,21 (s, 1H, N=CH-Ar), 8,03 (s, 1H, =C-H) 7,60 (d, 1H, Ar-H, $J = 8,6$ Hz), 7,55 (d, 1H, Ar-H, $J = 8,6$ Hz), 7,40 (dd, 1H, Ar-H, $J = 8,6, 2,0$ Hz), 6,96 (m, 2H, Ar-H), 6,82 (d, 1H, Ar-H, $J = 8,6$ Hz), 6,76 (s, 1H, Ar-H); ^{13}C RMN (DMSO- d_6): δ 102,5, 112,1, 114,2, 117,2, 119,7, 119,8, 129,6, 130,4, 132,2, 132,7, 134, 153,3, 158,5, 160,8, 161,6, 164,4 [75].

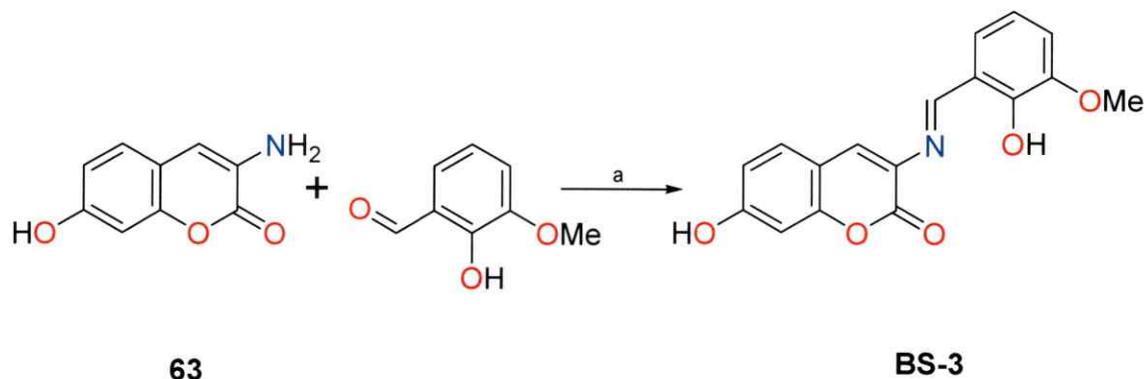
4.5.2. (*E*)-7-Hidroxi-3-(2-metoxibencilidenamino)-2*H*-cromen-2-ona (**BS-2**).



Condiciones: a) EtOH, reflujo 4 h.

La síntesis de **BS-2** se realizó a partir de **63** (0,56 g, 31 mmol) y *o*-metoxibenzaldehído (0,42 g, 31 mmol) siguiendo el método N [0,80 g, sólido amarillo pálido, 87 %]. p.f. 232-234 °C; ^1H RMN (DMSO- d_6): δ 10,61 (sa, 1H, O-H), 9,41 (s, 1H, N=C-Ar), 8,08 (d, 1H, Ar-H, $J = 8,2$ Hz), 7,88 (s, 1H, =C-H), 7,61 (m, 2H, Ar-H), 7,23 (d, 1H, Ar-H, $J = 8,0$), 7,13 (t, 1H, Ar-H, $J = 8,0$), 6,89 (d, 1H, Ar-H, $J = 8,2$ Hz), 6,83 (s, 1H, Ar-H), 3,97 (s, 3H, OCH₃).

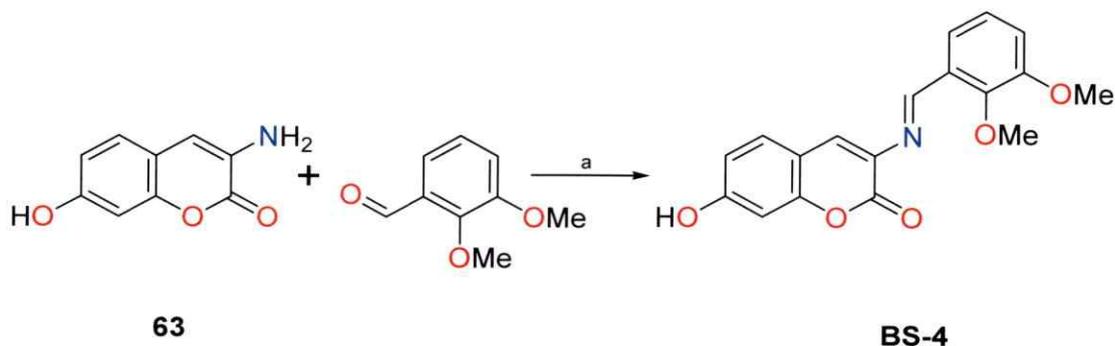
4.5.3. (*E*)-7-Hidroxi-3-(2-hidroxi-3-metoxibencilidenamino)-2*H*-cromen-2-ona (BS-3).



Condiciones: a) EtOH, reflujo 4 h.

El compuesto **BS-3** se sintetizó a partir de **63** (0,56 g, 31 mmol) y 2-hidroxi-3-metoxibenzaldehido (0,47 g, 31 mmol) de acuerdo a la metodología N [0,83 g, sólido amarillo, 86 %]. p.f. 222-224 °C; ¹H RMN (DMSO-*d*₆): δ 12,95 (s, 1H, O-H- -O=C), 10,63 (sa, 1H, O-H), 9,21 (s, 1H, N=C-Ar), 8,03 (s, 1H, =C-H), 7,56 (d, 1H, Ar-H, *J* = 8,2 Hz), 7,19 (d, 1H, Ar-H, *J* = 8,2 Hz) 7,11 (d, 1H, Ar-H, *J* = 8,2 Hz), 6,89 (d, 1H, Ar-H, *J* = 8,2 Hz), 6,83 (d, 1H, Ar-H, *J* = 7,1 Hz), 6,79 (s, 1H, Ar-H), 3,81 (s, 3H, OCH₃).

4.5.4. (*E*)-3-(2,3-Dimetoxibencilidenamino)-7-hidroxi-2*H*-cromen-2-ona (BS-4).

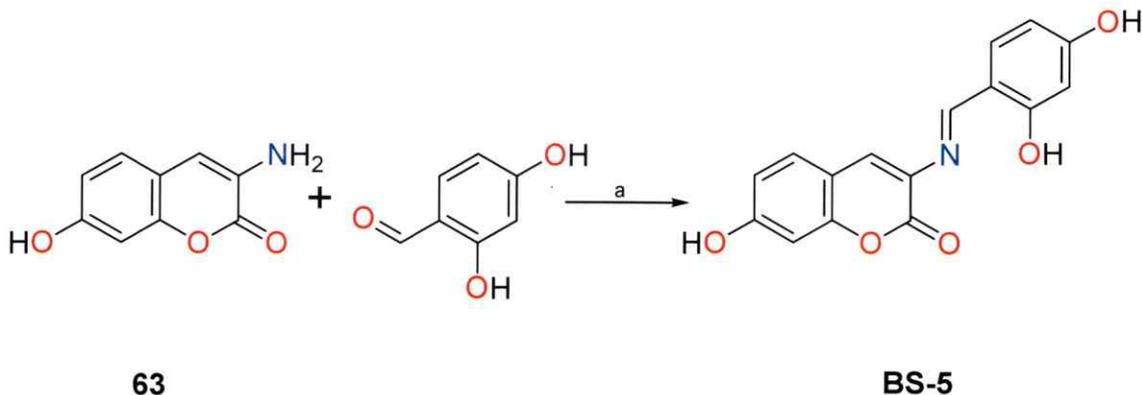


Condiciones: a) EtOH, reflujo 4 h.

La síntesis de **BS-4** fue hecha a partir de **63** (0,56 g, 31 mmol) y 2,3-dimetoxibenzaldehido (0,51 g, 31 mmol) siguiendo el método N [0,93 g, sólido amarillo,

92 %]. p.f. 236-238 °C; ^1H RMN (DMSO- d_6): δ 10,63 (sa, 1H, O-H), 9,35 (s, 1H, N=C-Ar), 7,11 (s, 1H, =C-H), 7,66 (m, 2H, Ar-H) 7,30 (m, 3, Ar-H), 6,90 (d, 1H, Ar-H, $J = 8,2$ Hz), 6,84 (s, 1H, Ar-H), 6,74 (m, 1H, Ar-H), 3,92 (s, 3H, OCH₃), 3,9475 (s, 3H, OCH₃).

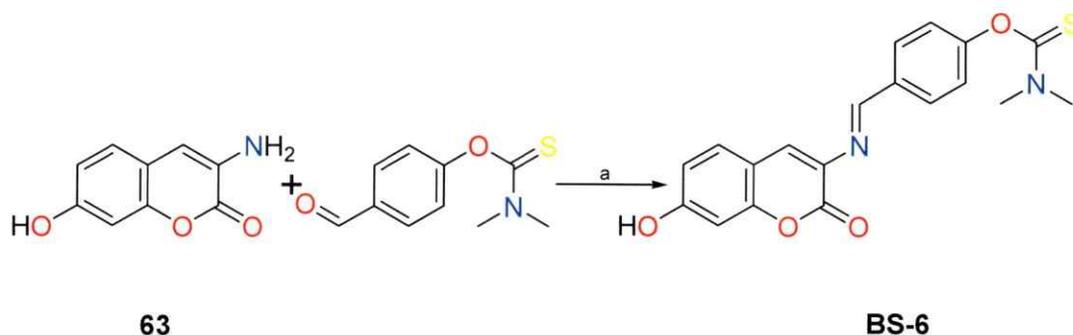
4.5.5. (*E*)-3-(2,4-Dihidroxibencilidenamino)-7-hidroxi-2*H*-cromen-2-ona (BS-5).



Condiciones: a) EtOH, reflujo 4 h.

La síntesis de **BS-5** se realizó a partir de **63** (0,56 g, 31 mmol) y 2,4-dihidroxibenzaldehído (0,43 g, 31 mmol) de acuerdo al método N [0,91 g, sólido amarillo, 98 %]. p.f. > 320 °C; ^1H RMN (DMSO- d_6): δ 13,36 (s, 1H, O-H- -O=C), 10,57 (sa, 1H, O-H), 10,37 (sa, 1H, O-H), 9,02 (s, 1H, N=C-Ar), 7,93 (s, 1H, =C-H), 7,52 (d, 1H, $J = 8,6$ Hz), 7,39 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz) 6,81 (dd, 1H, $J = 8,4, 2,0$ Hz), 6,75 (s, 1H), 6,40 (dd, 1H, $J = 8,6, 2,0$ Hz), 6,28 (d, 1H, $J = 2,0$ Hz).

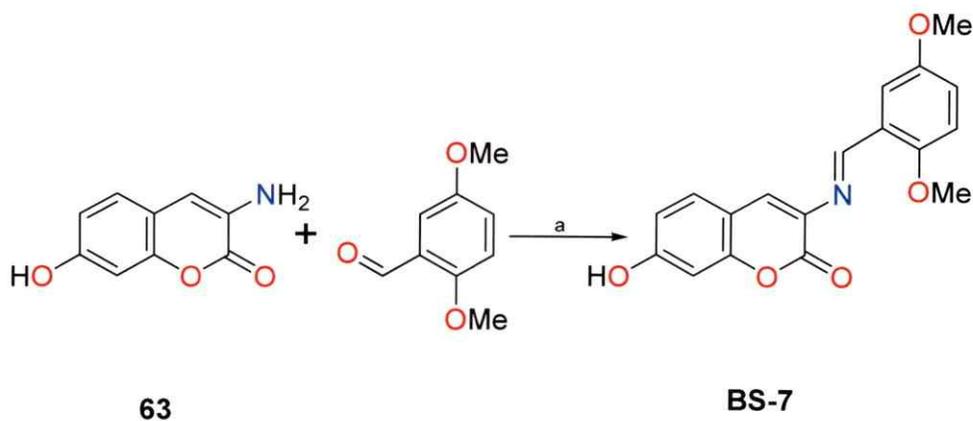
4.5.6. **(E)-4-((7-Hidroxi-2H-cromen-2-on-3-ilimino)metil)fenil-*N,N*-dimetiltioncarbamato (BS-6).**



Condiciones: a) EtOH, reflujo 5 h.

El compuesto **BS-6** fue sintetizado a partir de **63** (0,56 g, 31 mmol) y (4-*N,N*-dimetiltioncarbamato)benzaldehído (0,65 g, 31 mmol) siguiendo el método M, [0,85 g, sólido amarillo pálido, 80 %]. p.f. 240-242 °C; ^1H RMN (DMSO- d_6): δ 10,56 (sa, 1H, O-H), 9,00 (s, 1H, N=C-Ar), 7,93 (d, 2H, =C-H, $J = 8,0$ Hz), 7,82 (s, 1H, Ar-H), 7,55 (d, 1H, Ar-H, $J = 8,6$ Hz), 7,22 (d, 2H, Ar-H, $J = 8,0$ Hz), 6,81 (dd, 1H, Ar-H, $J = 8,6, 2,0$ Hz), 6,76 (d, 1H, Ar-H, $J = 2,0$ Hz), 3,37 (s, 3H, N(CH $_3$) $_2$), 3,37 (s, 3H, N(CH $_3$) $_2$); ^{13}C RMN (DMSO- d_6): δ 60,8, 62,7, 102,4, 110,7, 112,5, 115,9, 132,4, 148,3, 157,3, 161,9, 162,6, 166,8.

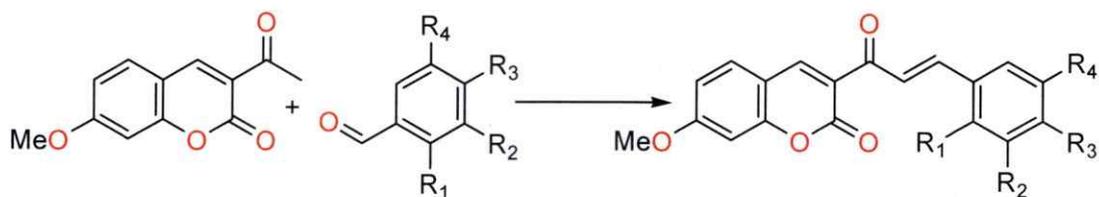
4.5.7. **(E)-3-(2,5-Dimetoxibencilidenamino)-7-hidroxi-2H-cromen-2-ona (BS-7).**



Condiciones: a) EtOH, reflujo 4 h.

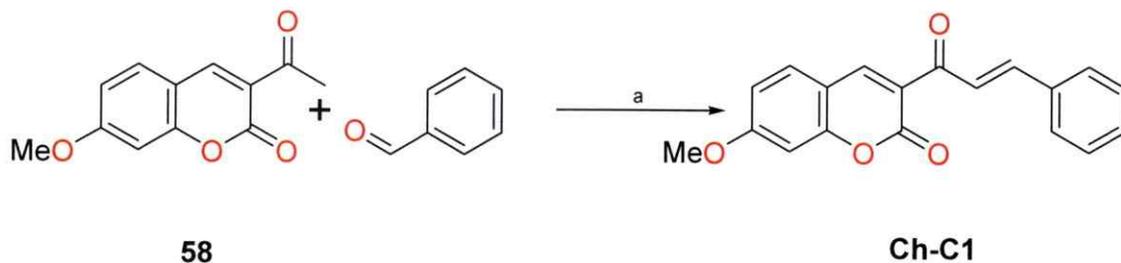
La síntesis de **BS-7** se hizo a partir de **63** (0,56 g, 31 mmol) y 2,5-dimetoxibenzaldehído (0,51 g, 31 mmol) según el procedimiento N [0,9 g, sólido amarillo, 89 %]. p.f 206-208 °C; ¹H RMN (DMSO-*d*₆): δ 10,53 (sa, 1H, O-H), 9,31 (s, 1H, N=C-Ar), 7,81 (s, 1H, =C-H), 7,54 (d, 1H, Ar-H, *J* = 8,2 Hz) 7,50 (s, 2H, Ar-H), 7,09 (s, 2H, Ar-H), 6,80 (d, 1H, Ar-H, *J* = 8,2 Hz), 6,74 (s, 1H, Ar-H), 3,92 (s, 3H, OCH₃), 3,84 (s, 3H, OCH₃).

4.6. DERIVADOS DE 3-((*E*)-3-FENILACRILIL)-2*H*-CROMEN-2-ONA (Ch-C).



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Ch-C1	H	H	H	H
Ch-C2	OH	H	H	H
Ch-C3	H	OH	H	H
Ch-C4	H	H	OH	H
Ch-C5	OMe	H	H	H
Ch-C6	H	OMe	H	H
Ch-C7	H	H	OMe	H
Ch-C8	H	H	OEt	H
Ch-C9	H	H	SH	H
Ch-C10	H	H	N(Me) ₂	H
Ch-C11	OMe	OMe	H	H
Ch-C12	OMe	H	H	OMe
Ch-C13	H	OMe	OMe	H
Ch-C14	H	-OCH ₂ ⁻	-OCH ₂ ⁻	H

4.6.1. Procedimiento M. Preparación de 3-cinamil-7-metoxi-2*H*-cromen-2-ona (Ch-C1).

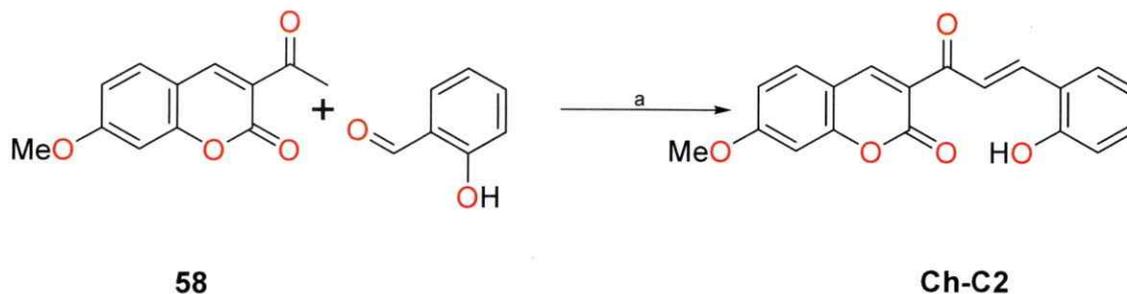


Condiciones: a) piperidina, DCM, 10 h.

0,44 g (2 mmol) de 3-acetil-7-metoxi-2*H*-cromen-2-ona (**58**) y 0,21 g (2 mmol) de benzaldehído fueron disueltos en 25 mL de DCM y a esta solución fueron adicionados 0,5 mL de piperidina. Seguidamente se hirvió bajo reflujo y se monitoreó la reacción por medio de CCF por un tiempo de 10 h. La solución fue concentrada bajo presión

reducida y se disolvió en una pequeña alícuota de DCM y luego se adicionó MeOH en exceso para inducir la precipitación del producto. Este procedimiento se realizó dos veces. El precipitado fue purificado finalmente en CC en gel de sílice utilizando como fase móvil DCM (**Ch-C1**) [0,25 g, sólido amarillo, 41 %]. p.f. 190-192 °C; ^1H RMN (CDCl_3): δ 8,59 (s, 1H, =C-H), 8,03 (d, 1H, Ar-CH=, $J = 15,8$ Hz), 7,86 (d, 1H, CO-CH=, $J = 15,8$ Hz), 7,68 (sa, 2H, Ar-H), 7,57 (d, 1H, Ar-H, $J = 8,6$ Hz), 7,41 (sa, 3H, Ar-H), 6,91 (dd, 1H, Ar-H, $J = 8,6, 1,0$ Hz), 6,86 (s, 1H, Ar-H), 3,92 (s, 3H, OCH_3).

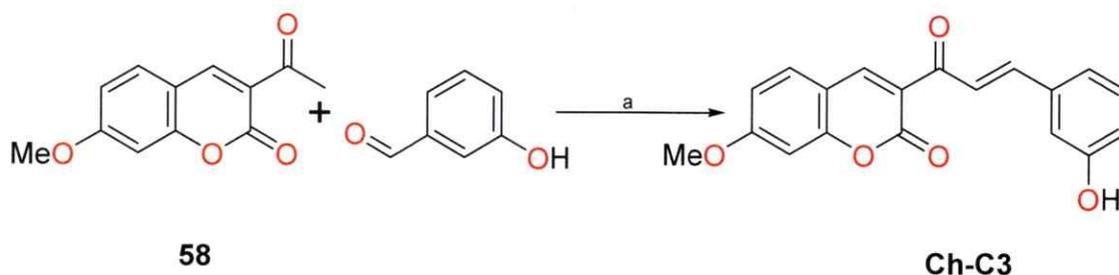
4.6.2. (*E*)-3-(3-(2-Hidroxifenil)acrilil)-7-metoxi-2H-cromen-2-ona (**Ch-C2**).



Condiciones: a) piperidina, DCM, reflujo 8 h.

La síntesis de **Ch-C2** fue realizada a partir de **58** (0,44 g, 2 mmol) y de *o*-hidroxibenzaldehído (0,24 g, 2 mmol) de acuerdo al procedimiento M [0,45 g, sólido amarillo, 70 %]. p.f. 188-190 °C; ^1H RMN ($\text{DMSO-}d_6$): δ 10,44 (sa, 1H, O-H), 8,71 (s, 1H, =C-H), 8,04 (d, 1H, Ar-CH= $J = 15,9$ Hz), 7,92 (d, 1H, Ar-H, $J = 8,8$ Hz), 7,89 (d, 1H, CO-CH=, $J = 15,9$ Hz), 7,69 (dd, 1H, Ar-H, $J = 7,7, 1,0$ Hz), 7,35 (dd, 1H, Ar-H, $J = 7,0, 1,0$ Hz), 7,12 (d, 1H, Ar-H, $J = 2,2$ Hz), 7,07 (dd, 1H, Ar-H, $J = 8,6, 2,2$ Hz), 7,00 (d, 1H, Ar-H, $J = 8,0$ Hz), 6,94 (t, 1H, Ar-H, $J = 7,5$ Hz), 3,96 (s, 3H, OCH_3); ^{13}C RMN ($\text{DMSO-}d_6$): δ 56,7, 100,8, 112,5, 113,9, 116,8, 120,0, 121,8, 121,9, 124,3, 129,2, 132,3, 132,6, 139,5, 148,2, 157,4, 157,8, 159,4, 165,1, 187,1.

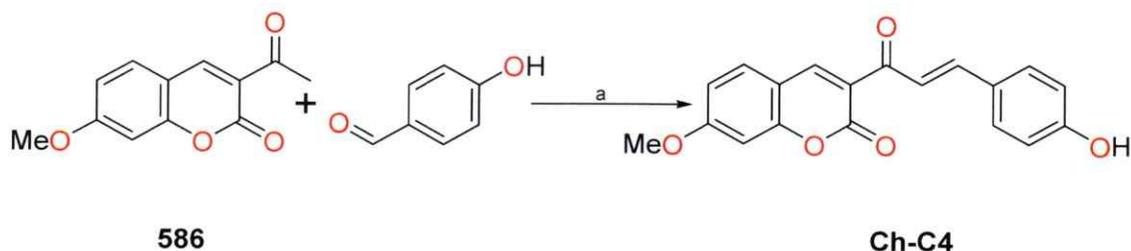
4.6.3. (*E*)-3-(3-(3-Hidroxifenil)acrilil)-7-metoxi-2*H*-cromen-2-ona (Ch-C3).



Condiciones: a) piperidina, ACN, reflujo 8 h.

La preparación de **Ch-C3** se realizó a partir de **58** (0,44 g, 2 mmol) y *m*-hidroxibenzaldehído (0,24 g, 2 mmol) de acuerdo al procedimiento M [0,195 g, sólido amarillo, 30 %]. p.f. 184-186 °C; ¹H RMN (DMSO-*d*₆): δ 9,68 (sa, 1H), 8,67 (s, 1H, =C-H), 7,85 (d, 1H, Ar-CH=, *J* = 15,9 Hz), 7,73 (d, 1H, CO-CH=, *J* = 15,9 Hz), 7,62 (d, 1H, Ar-H, *J* = 8,6 Hz), 7,25 (dd, 1H, Ar-H, *J* = 8,0 Hz), 7,13 (d, 1H, Ar-H, *J* = 8,0 Hz), 7,11 (s, 1H, Ar-H), 7,06 (s, 1H, Ar-H), 7,0 (dd, 1H, Ar-H, *J* = 8,6, 1,8 Hz), 6,85 (dd, 1H, Ar-H, *J* = 8,0 Hz), 3,88 (s, 3H, OCH₃); ¹³C RMN (DMSO-*d*₆): δ 56,7, 100,8, 112,5, 114, 114,8, 118,5, 120,5, 121,6, 124,9, 130,6, 132,5, 136,4, 143,9, 148,6, 157,5, 158,2, 159,4, 165,3, 186,7.

4.6.4. (*E*)-3-(3-(4-Hidroxifenil)acrilil)-7-metoxi-2*H*-cromen-2-ona (Ch-C4).

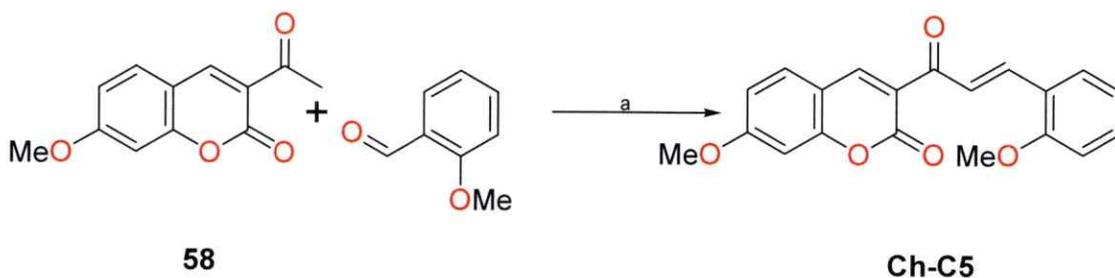


Condiciones: a) piperidina, DCM, reflujo 8 h.

El compuesto **Ch-C4** fue preparado a partir de **58** (0,44 g, 2 mmol) y *p*-hidroxibenzaldehído (0,24 g, 2 mmol) de acuerdo al procedimiento M [0,170 g, sólido

amarillo, 26 %]. p.f. 180-182 °C; ^1H RMN (DMSO- d_6): δ 8,63 (s, 1H, =C-H), 7,85 (d, 1H, Ar-H, $J = 8,6$ Hz), 7,66 (d, 1H, Ar-CH=, $J = 15,9$ Hz), 7,58 (d, 1H, Ar-H, $J = 6,3$ Hz), 7,57 (d, 1H, CO-CH=, $J = 15,9$ Hz), 7,07 (s, 1H, Ar-H), 7,01 (d, 1H, Ar-H, $J = 8,6$ Hz), 6,83 (d, 1H, Ar-H, $J = 8,3$ Hz), 3,88 (s, 3H, OCH₃); ^{13}C RMN (DMSO- d_6): δ 56,7, 100,8, 112,6, 113,9, 116,3, 116,5, 121,7, 122,0, 126,1, 131,3, 132,3, 132,6, 144,5, 148,0, 157,3, 159,4, 160,8, 165,0, 186,8.

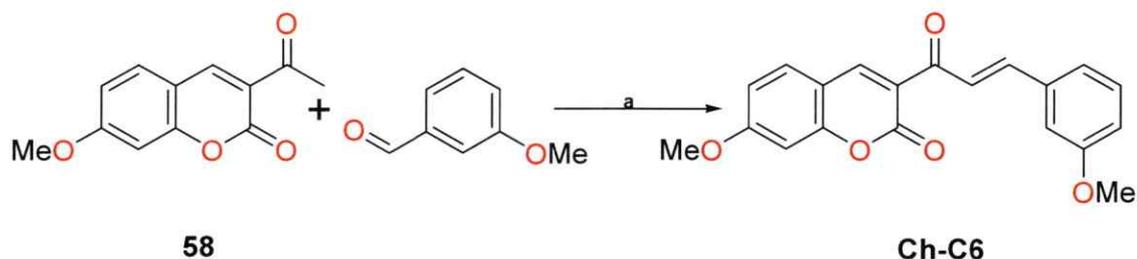
4.6.5. (*E*)-7-Metoxi-3-(3-(2-metoxifenil)acrilil)-2H-cromen-2-ona (Ch-C5).



Condiciones: a) piperidina, DCM, reflujo 9 h.

La síntesis de **Ch-C5** fue realizada a partir de **58** (0,44 g, 2 mmol) y de *o*-metoxibenzaldehído (0,27 g, 2 mmol), de acuerdo al procedimiento M [0,330 g, sólido amarillo pálido, 49 %]. p.f. 184-186 °C; ^1H RMN (CDCl₃): δ 8,56 (s, 1H, =C-H), 8,21 (d, 1H, Ar-CH=, $J = 15,8$ Hz), 8,04 (d, 1H, CO-CH=, $J = 15,8$ Hz), 7,71 (d, 1H, Ar-H, $J = 7,6$ Hz), 7,56 (d, 1H, Ar-H, $J = 8,4$ Hz), 7,37 (t, 1H, Ar-H, $J = 7,9$), 6,98 (t, 1H, Ar-H, $J = 7,7$ Hz), 6,92 (d, 1H, Ar-H, $J = 8,2$ Hz), 6,90 (d, 1H, Ar-H, $J = 8,5$ Hz), 6,85 (s, 1H, Ar-H), 3,91 (s, 6H, 2 OCH₃); ^{13}C RMN (DMSO- d_6): δ 55,6, 56,0, 100,4, 111,2, 112,5, 113,7, 120,8, 121,9, 124,1, 124,6, 129,3, 131,3, 132, 139,9, 148,2, 157,6, 159,0, 159,8, 165,0, 186,8.

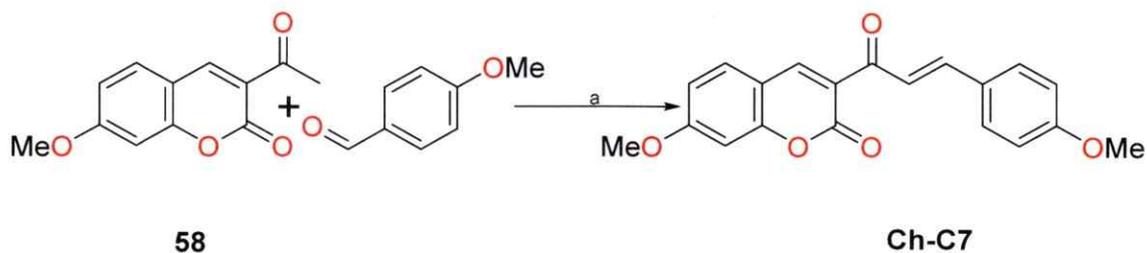
4.6.6. (*E*)-7-Metoxi-3-(3-(3-metoxifenil)acrilil)-2*H*-cromen-2-ona (Ch-C6).



Condiciones: a) piperidina, DCM, reflujo 9 h.

La preparación de **Ch-C6** se realizó a partir de **58** (0,44 g, 2 mmol) y *m*-metoxibenzaldehido (0,27 g 2 mmol) de acuerdo al procedimiento M [0,280 g, sólido amarillo, 42 %]. p.f. 164-166 °C; ¹H RMN (CDCl₃): δ 8,58 (s, 1H, =C-H), 7,99 (d, 1H, Ar-CH=, *J* = 15,9 Hz), 7,82 (d, 1H, CO-CH=, *J* = 15,9 Hz), 7,57 (d, 1H, Ar-H, *J* = 8,0 Hz), 7,35-7,25 (m, 2H, Ar-H), 7,18 (s, 1H, Ar-H) 6,96 (dd, 1H, Ar-H, *J* = 8,0, 2,0 Hz), 6,91 (dd, 1H, Ar-H, *J* = 8,8, 2,0 Hz), 6,85 (d, 1H, Ar-H, *J* = 2,0 Hz), 3,83 (s, 3H, OCH₃), 3,76 (s, 3H, OCH₃); ¹³C RMN (CDCl₃): δ 55,8, 56,5, 100,8, 112,8, 113,9, 114,3, 117,1, 121,7, 122,0, 124,9, 130,3, 131,8, 136,8, 144,8, 149,0, 158,1, 160,2, 160,3, 165,8, 186,8.

4.6.7. (*E*)-7-Metoxi-3-(3-(4-metoxifenil)acrilil)-2*H*-cromen-2-ona (Ch-C7).

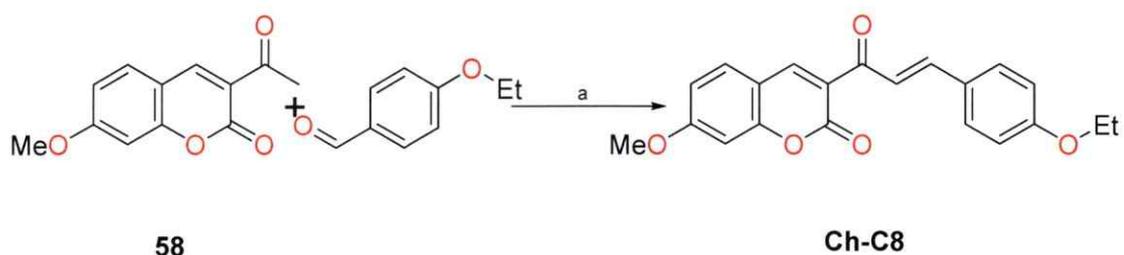


Condiciones: a) piperidina, DCM, reflujo 9 h.

El compuesto **Ch-C7** fue preparado a partir de **58** (0,44 g, 2 mmol) y *p*-metoxibenzaldehido (0,27 g, 2 mmol) de acuerdo al procedimiento M [0,26 g, sólido amarillo pálido, 39 %]. p.f. 158-160 °C; ¹H RMN (CDCl₃): δ 8,49 (s, 1H, =C-H), 7,90

(d, 1H, Ar-CH=, $J = 15,9$ Hz), 7,73 (d, 1H, CO-CH=, $J = 15,9$ Hz), 7,66 (d, 1H, Ar-H, $J = 8,0$ Hz), 7,56 (d, 1H, Ar-H, $J = 8,8$ Hz), 6,93 (d, 1H, Ar-H, $J = 8,0$ Hz), 6,91 (dd, 1H, Ar-H, $J = 8,8, 2,0$ Hz), 6,85 (d, 1H, Ar-H, $J = 2,0$ Hz), 3,83 (s, 3H, OCH₃), 3,76 (s, 3H, OCH₃); ¹³C RMN (CDCl₃): δ 57,2, 57,8, 102,0, 114,2, 115,5, 116,1, 123,4, 123,6, 129,6, 132,5, 133,0, 146,3, 150,0, 159,4, 161,6, 163,5, 166,8, 188,0.

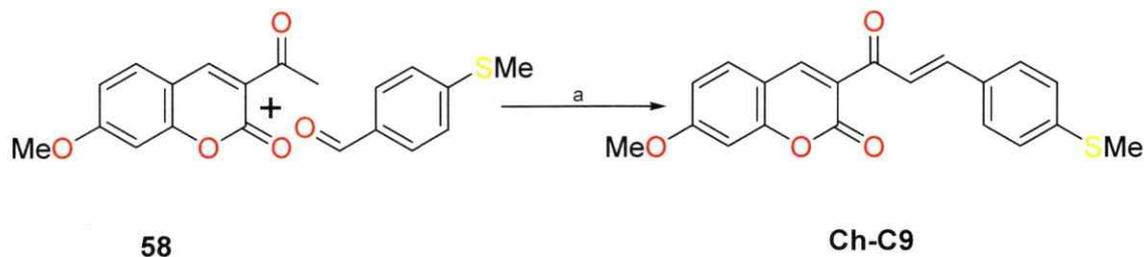
4.6.8. (*E*)-7-Metoxi-3-(3-(4-etoxifenil)acrilil)-2H-cromen-2-ona (Ch-C8).



Condiciones: a) piperidina, ACN, reflujo 5 h.

La síntesis **Ch-C8** fue realizada a partir de **58** (0,44 g, 2 mmol) y *p*-etoxibenzaldehído (0,3 g, 2 mmol) de acuerdo al procedimiento M [0,31 g, sólido amarillo pálido, 44 %]. p.f. 168-170 °C; ¹H RMN (CDCl₃): δ 8,54 (s, 1H, =C-H), 7,87 (d, 1H, Ar-CH=, $J = 15,7$ Hz), 7,80 (d, 1H, CO-CH=, $J = 15,7$ Hz), 7,60 (d, 1H, Ar-H, $J = 8,6$ Hz), 7,53 (d, 1H, Ar-H, $J = 8,6$ Hz), 6,88 (d, 1H, Ar-H, $J = 8,6$ Hz), 6,82 (s, 1H, Ar-H), 4,05 (q, 2H, O-CH₂-CH₃, $J = 6,8$ Hz), 3,89 (s, 3H, OCH₃), 1,4 (t, 3H, -CH₃, $J = 6,8$ Hz); ¹³C RMN (CDCl₃): δ 15,2, 56,4, 64,1, 100,7, 112,9, 114,2, 115,2, 122, 122,2, 128, 131,2, 131,7, 145, 148,7, 158, 160,2, 161,7, 165,5, 186,6.

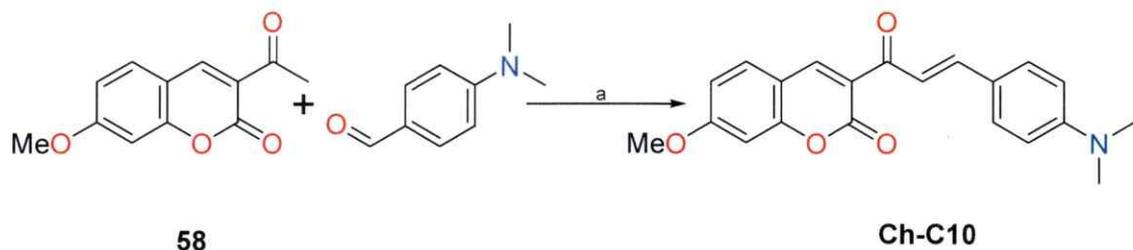
4.6.9. (*E*)-7-Metoxi-3-(3-(4-(metiltio)fenil)acrilil)-2*H*-cromen-2-ona (Ch-C9).



Condiciones: a) piperidina, ACN, reflujo 3h.

El compuesto **Ch-C9** se sintetizó a partir de **58** (0,44 g, 2 mmol) y *p*-metiltiobenzaldehído (0,27 (2 mmol) de acuerdo al procedimiento M [0,305 g, sólido amarillo, 43 %]. p.f. 196-198 °C; ^1H RMN (CDCl_3): δ 8,58 (s, 1H, =C-H), 7,97 (d, 1H, Ar-CH=, $J = 15,7$ Hz), 7,81 (d, 1H, CO-CH=, $J = 15,7$ Hz), 7,58 (d, 1H, Ar-H, $J = 8,6$ Hz), 7,56 (d, 2H, Ar-H, $J = 8,6$ Hz), 7,23 (d, 2H, Ar-H, $J = 8,6$ Hz), 6,90 (dd, 1H, Ar-H, $J = (8,6, 2,0)$), 6,84 (d, 1H, Ar-H, $J = 2,0$ Hz), 3,91 (s, 3H, OCH_3), 2,50 (s, 3H, SCH_3); (CDCl_3): δ 15,5, 56,4, 100,8, 112,9, 114,3, 121,9, 123,6, 126,3, 129,6, 131,7, 131,9, 142,9, 144,4, 148,8, 158,1, 160,2, 165,5, 165,6, 186,7.

4.6.10. (*E*)-3-(3-(4-(Dimetilamino)fenil)acrilil)-7-metoxi-2*H*-cromen-2-ona (Ch-C10).

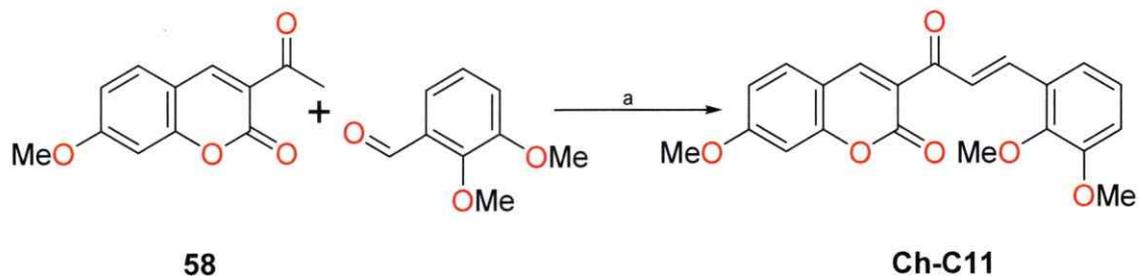


Condiciones: a) piperidina, ACN, reflujo 4 h.

La preparación de **Ch-C10** fue hecha a partir de **58** (0,44 g, 2 mmol) y *p*-dimetilaminobenzaldehído (0,27 g, 2 mmol) de acuerdo al procedimiento M [0,15 g, sólido rojo, 22 %]. p.f 220-222 °C; ^1H RMN (CDCl_3): δ 8,56 (s, 1H, =C-H), 7,96 (d, 1H, Ar-CH=, $J = 15,7$ Hz), 7,80 (d, 1H, CO-CH=, $J = 15,7$ Hz), 7,58 (d, 1H, Ar-H, $J = 8,8$

Hz), 7,54 (d, 2H, Ar-H, $J = 8,6$ Hz), 6,88 (d, 1H, Ar-H, $J = 8,6, 2,2$ Hz), 6,84 (d, 1H, Ar-H, $J = 2,2$ Hz), 6,67 (d, 2H, Ar-H, $J = 8,8$ Hz), 3,90 (s, 3H, OCH₃), 3,04 (s, 6H, N(CH₃)₂); ¹³C RMN (CDCl₃): δ 40,5, 56,4, 64,1, 100,7, 112,2, 113,0, 114,0, 119,3, 122,6, 123,3, 131,4, 131,5, 146,4, 148,2, 152,6, 157,9, 160,3, 165,2, 186,4.

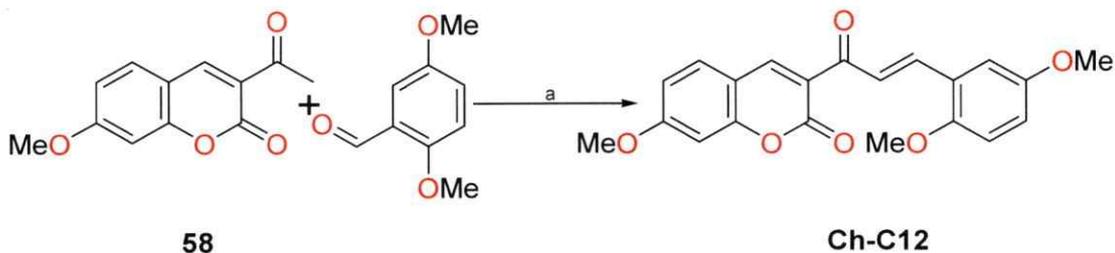
4.6.11. (*E*)-3-(3-(2,3-Dimetoxifenil)acrilil)-7-metoxi-2*H*-cromen-2-ona (Ch-C11).



Condiciones: a) piperidina, DCM, reflujo 7 h.

El compuesto **Ch-C11** se sintetizó a partir de **58** (0,44 g, 2 mmol) y 2,3-dimetoxibenzaldehído (0,33 g, 2 mmol) de acuerdo a la metodología M, [0,435 g, sólido amarillo luminoso, 59 %]. p.f. 184-186 °C; ¹H RMN (CDCl₃): δ 8,57 (s, 1H, =C-H), 8,18 (d, 1H, Ar-CH=, $J = 16,0$ Hz), 8,02 (d, 1H, CO-CH=, $J = 16,0$ Hz), 7,57 (d, 1H, Ar-H, $J = 8,6$ Hz), 7,36 (d, 1H, Ar-H, $J = 7,9$ Hz), 7,09 (t, 1H, Ar-H, $J = 8,1$ Hz), 6,97 (d, 1H, Ar-H, $J = 7,9$ Hz), 6,90 (dd, 1H, Ar-H, $J = 8,6, 2,0$ Hz), 6,84 (d, 1H, Ar-H, $J = 2,0$ Hz), 3,92 (s, 3H, OCH₃), 3,91 (s, 3H, OCH₃), 3,89 (s, 3H, OCH₃); ¹³C RMN (CDCl₃): δ 55,9, 56,0, 61,2, 100,4, 112,4, 113,4, 114,4, 119,9, 121,6, 124,2, 125,6, 129,2, 131,3, 139,1, 148,4, 149,2, 153,2, 157,7, 159,7, 165,1, 186,7.

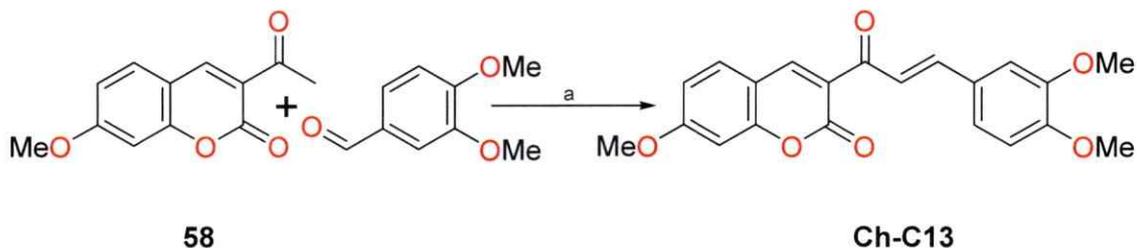
4.6.12. (*E*)-3-(3-(2,5-dimetoxifenil)acrilil)-7-metoxi-2*H*-cromen-2-ona (Ch-C12).



Condiciones: a) piperidina, DCM, reflujo 7 h.

La preparación de **Ch-C12** fue hecha a partir de **58** (0,44 g, 2 mmol) y 2,4-dimetoxibenzaldehído (0,33 g, 2 mmol) según método M [0,45 g, sólido amarillo luminoso, 62 %]. p.f. 174-176 °C; ^1H RMN (CDCl_3): δ 8,52 (s, 1H, =C-H), 8,14 (d, 1H, Ar-CH=, $J = 15,6$ Hz), 7,97 (d, 1H, CO-CH=, $J = 15,6$ Hz), 7,51 (d, 1H, Ar-H, $J = 8,8$ Hz), 7,19 (dd, 1H, Ar-H, $J = 8,3, 1,6$ Hz), 6,92-6,97 (m, 4H, Ar-H), 3,89 (s, 3H, OCH_3), 3,84 (s, 3H, OCH_3), 3,79 (s, 3H, OCH_3); ^{13}C RMN (CDCl_3): δ 58,4, 58,6, 58,8, 102,9, 115,1, 115,9, 116,3, 116,5, 120,5, 127,3, 133,9, 134,1, 142,2, 150,4, 150,8, 156,1, 156,2, 160,2, 162,4, 167,6, 189,3.

4.6.13. (*E*)-3-(3-(3,4-Dimetoxifenil)acrilil)-7-metoxi-2*H*-cromen-2-ona (Ch-C13).

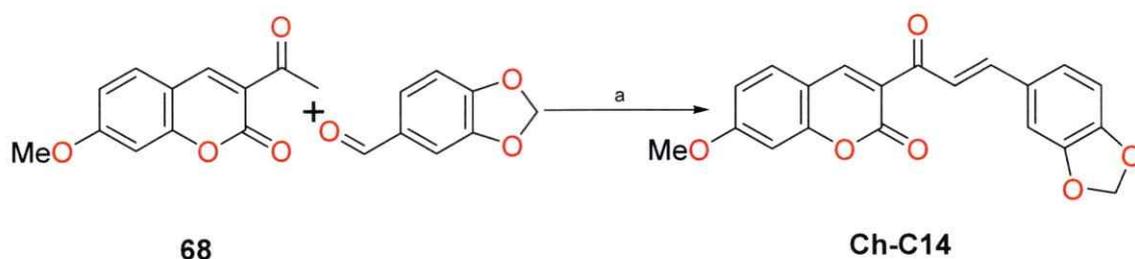


Condiciones: a) piperidina, DCM, reflujo 7 h.

La síntesis **Ch-C13** fue hecha a partir de **58** (0,44 g, 2 mmol) y 3,4-dimetoxibenzaldehído (0,33 g, 2 mmol) de acuerdo al método M [0,42 g, sólido amarillo luminoso, 57, %]. p.f. 182-184 °C; ^1H RMN (CDCl_3): δ 8,54 (s, 1H, =C-H), 8,17 (d, 1H, Ar-CH=, $J = 15,9$ Hz), 8,00 (d, 1H, CO-CH=, $J = 15,9$ Hz), 7,55 (d, 1H, Ar-H, $J = 8,6$

Hz), 7,21 (d, 1H, Ar-H, $J = 1,0$ Hz), 6,93 (dd, 1H, Ar-H, $J = 9,0, 1,0$ Hz), 6,89 (dd, 1H, Ar-H, $J = 8,6, 2,0$ Hz), 6,85 (d, 1H, Ar-H, $J = 9,0$ Hz), 6,83 (d, 1H, Ar-H, $J = 2,0$ Hz), 3,91 (s, 3H, OCH₃), 3,87 (s, 3H, OCH₃), 3,81 (s, 3H, OCH₃); ¹³C RMN (CDCl₃): δ 56,0, 100,3, 110,4, 111,1, 112,5, 113,8, 121,6, 122,1, 123,8, 128,1, 131,3, 144,7, 148,3, 149,3, 151,6, 157,6, 159,9, 165,1, 186,1.

4.6.14. (*E*)-3-(3-(Benzo[*d*][1,3]dioxol-5-il)acrilil)-7-metoxi-2*H*-cromen-2-ona (Ch-C14).



Condiciones: a) piperidina, ACN, reflujo 7 h.

El compuesto **Ch-C14** se sintetizó a partir de **68** (0,44 g, 2 mmol) y piperonal (0,3 g, 2 mmol) según el procedimiento M [0,29 g, sólido amarillo, 41 %]. p.f 178-180 °C; ¹H RMN (DMSO-*d*₆): δ 8,62 (s, 1H, =C-H), 7,83 (d, 1H, Ar-H, $J = 8,6$ Hz), 7,63 (d, 1H, Ar-CH=, $J = 15,9$ Hz), 7,56 (d, 1H, CO-CH=, $J = 15,9$ Hz), 7,33 (s, 1H, Ar-H), 7,25 (d, 1H, Ar-H, $J = 8,0$ Hz), 7,06 (sa, 1H, Ar-H), 7,00 (dd, 1H, Ar-H, $J = 8,6, 2,0$ Hz), 6,97 (d, 1H, Ar-H, $J = 8,0$ Hz), 6,07 (d, 2H, O-CH₂-O, $J_{ap} = 2,0$ Hz), 3,87 (s, 3H, OCH₃).

4.7. DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL CRISTALOGRÁFICA.

El sólido fue cristalizado en EtOH, dando como resultado unos cristales amarillos. La colección de los datos de intensidad se llevó a cabo con el programa SMART.⁶³ El refinamiento de la celda y la reducción de datos fueron realizados por el Dr. Antonio Galdámez usando SAINT [76]. El paquete de programas cristalográficos SHELXL fueron usados para resolver y refinar la estructura [77]. Los átomos de hidrógeno fueron

determinados a partir del mapa de densidad electrónica y de refinados libremente. Los programas DIAMOND y PLATON [78, 79], fueron utilizados para editar el material cristalográfico.

4.8. FOTOFÍSICA.

4.8.1. Excitación.

Los espectros de absorción fueron registrados en una solución de buffer HEPES 20 mM a un pH de 7,4 (para los compuestos **Q51**, **Q52**, **Q53** y **Ch-C1**) o ACN (para los compuestos **BS1**, **BS2**, **BS3**, **BS4**, **BS5**, **BS6** y **BS7**). Las mediciones se hicieron utilizando espectrómetros de UV-Vis Perkin-Elmer Lambda 11 y Varian Cary® 50. Los espectros se registraron a diferentes concentraciones (10 μM para **Q51**, **Q52**, **Q53**, **BS1**, **BS2**, **BS3**, **BS4**, **BS5**, **BS6**, **BS7** y **Ch-C1**), y con los diferentes iones a 200 μM para observar su comportamiento en forma preliminar, para después estudiar el comportamiento en función de la concentración del ión en casos específicos.

4.8.2. Estudio de fluorescencia y estudio de afinidad por iones metálicos.

A los compuestos **Q51**, **Q52**, **Q53** y **Ch-C1** se les registraron los espectros de emisión en una solución buffer de HEPES 20 mM a un pH de 7,4 y **BS1**, **BS2**, **BS3**, **BS4**, **BS5**, **BS6** y **BS7** en ACN, utilizando un espectrofluorímetro ISS PC1 o Edinburgh Instruments FLS900, excitando a diferentes longitudes de onda, seguidamente se realizó un estudio de apagamiento y/o aumento de la intensidad de la fluorescencia de los compuestos por iones Fe^{+2} , Fe^{+3} , Ca^{+2} , Cu^{+2} , Co^{+2} , Mg^{+2} , Mn^{+2} , Zn^{+2} , Cd^{+2} , Pb^{+2} y Hg^{+2} a 200 μM .

4.8.3. Cálculo de rendimiento cuántico (Φ).

El rendimiento cuántico fue determinado usando como patrón sulfato de quinina en una solución de H_2SO_4 0,5 M ($\Phi_r = 0,546$) y fue calculado utilizando la ecuación 4 como se reporta [80-83]:

$$\Phi_s = \Phi_r (A_r F_s / A_s F_r) (\eta_s^2 / \eta_r^2) \quad (\text{Ec. 4})$$

Donde, s y r denotan muestra y referencia, A es absorbancia, F es la relación integrada de la intensidad fluorescente y η es el índice de refracción del solvente.

4.8.4. Desactivación de la fluorescencia.

Se analizó mediante la relación de *Stern-Volmer*:

$$I_0 / I = 1 + K_{sv}[Q]$$

Donde K_{sv} es la constante de *Stern-Volmer* [84], que está relacionada con la accesibilidad del fluoróforo al apagador (mayor accesibilidad, mayor K_{sv}), y cuando la extinción es *colisional* (dinámico) es igual al producto de la constante cinética de reacción entre el estado excitado y el apagador (K_q) y el tiempo de vida media del fluoróforo (τ_0) (Ecuación 5) [85, 86].

$$K_{sv} = K_q \cdot \tau_0 \quad (\text{Ec. 5})$$

4.8.5. Determinación de las constantes de asociación.

La constante de asociación K_a de los compuestos **Q51**, **Q52**, **Q53** y **BS-7** fue determinada mediante la ecuación de Benesi-Hildebrand (ecuación 5) [87-90]:

$$1/(F-F_0) = 1/(F_{\max}-F_0) + 1/(F_{\max}-F_0) * 1/K_a [Fe] \quad (\text{Ec. 5})$$

Donde F es la intensidad de la fluorescencia a la longitud de onda de emisión (nm) de los compuestos dada cualquier concentración del metal, F_0 es la intensidad de fluorescencia en ausencia del metal, y F_{\max} es la máxima intensidad de fluorescencia a la longitud de onda de emisión (nm) de los compuestos en presencia del metal en solución. La constante de asociación (K_a) fue evaluada gráficamente empleando el gráfico de $1/(F-F_0)$ contra $1/[M]$, los datos se ajustaron de forma lineal de acuerdo a la Ec. 1 y los valores de K_a fueron obtenidos de la pendiente y el intercepto de la línea.

4.8.6. Determinación de la estequiometría de asociación.

La determinación de la estequiometría de asociación entre los ligandos y los metales utilizó el método de Job o de la variación continua [91, 92], para un equilibrio donde se forma un complejo entre un ligando (L) y el metal. La representación gráfica de la concentración del complejo $[MmLn]$ en función de la fracción molar (X) del ligando da

lugar a una curva con un máximo situado a: $\frac{1}{m/n + 1}$, siendo X:

$$X = \frac{[M]}{[L] + [M]}$$

Para aplicar el sistema se grafica la variación de la intensidad de fluorescencia del ligando por la fracción molar del mismo en el eje Y ($I-I_0$) en función de dicha fracción molar en el eje X. El máximo de la curva nos indica la estequiometría para el sistema.

4.9. BIOLOGÍA.

4.9.1. Cultivo celular para la determinación de Fe.

4.9.1.1. Condiciones de cultivo.

La línea celular SH-SY5Y (CRL-2266, American Type Culture Collection, Rockville, MD) fue cultivada por la Dra. Natalia Mena bajo humedad, a 37 °C en 5% de CO₂, en el medio DMEM + F12, suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF), 10 unidades/mL de penicilina, 10 mg/mL de estreptomina y 10% de aminoácidos no esenciales. El medio fue cambiado cada 2 días [93].

4.9.1.2. Fluorescencia basal.

Inicialmente las células SH-SY5Y fueron tratadas durante 24 h con 20 µM Fe-NTA (nitrilotriacetato férrico). Luego se agregan las sondas **Q51**, **Q52** y **Q53** (5-10 µM por 20 min), registrándose una fluorescencia basal. Posteriormente, se añade el quelante de hierro bipyridilo (5 µM), el cual compite con la sonda por el hierro, produciéndose un cambio en la fluorescencia. La diferencia de fluorescencia es un indicador de la cantidad de hierro captado por la sonda. Finalmente, para corroborar que los efectos se deben a cambios dados por diferentes niveles de hierro en cada sonda, es que se adiciona FAS (sulfato amoniacal de hierro), obteniéndose nuevamente una baja en la fluorescencia (control).

4.9.2. Cultivo celular e imagenología de fluorescencia para determinación de Cu⁺².

Células de neuroblastoma humano SH-SY5Y (CRL-2266, American Type Culture Collection, Rockville, MD) fueron cultivadas por la Dra. Natalia Mena en medio MEM-F12 suplementado con 10% SBF, aminoácidos no esenciales, mezcla de antibióticos-

antimicóticos, y buffer de HEPES 20 mM, pH 7,2. El medio fue reemplazado cada dos días [93].

Las células fueron tratadas con la sonda BS-7 (10 μ M, 20 min), seguidamente las células son lavadas y la fluorescencia basal fue medida. Después, las células fueron incubadas con Cu-His (200 μ M, 15 min) y la fluorescencia fue obtenida usando un lector de fluorescencia en microplacas y por microscopía de fluorescencia.

4.9.3. Cultivo celular e imagenología de fluorescencia para determinación de tioles endógenos.

Células de neuroblastoma humano SH-SY5Y (CRL-2266, American Type Culture Collection, Rockville, MD) fueron cultivadas por la Dra. Natalia Mena en medio MEM-F12 suplementado con 10% SBF, aminoácidos no esenciales, mezcla de antibióticos-antimicóticos, y buffer de HEPES 20 mM, pH 7,2. El medio fue reemplazado cada dos días. Las células fueron tratadas con N-acetilcisteína (NAC) 30 mM o cisteína (Cys) 5 mM. Las células fueron incubadas por 20 min con **Ch-C1** y **Ch-C2** 5 μ M y la fluorescencia fue medida usando un lector de fluorescencia en microplacas y por microscopía de fluorescencia [93].

5. RESULTADOS Y DISCUSION

5.1. SINTESIS.

En el presente trabajo se propuso la síntesis de derivados de 2*H*-cromen-2-ona (cumarinas) como intermediarios para sintetizar los productos finales (sondas fluorescentes). Estos compuestos fueron escogidos como el profluoróforo por su pequeño peso molecular, por ser biocompatibles y fácilmente manipulables sintéticamente. Una de las prioridades fijadas era obtener cumarinas sustituidas en las posiciones C-3 y C-7. En la posición C-7 se pretendió especialmente tener un grupo dador de electrones como OH. Este es un requerimiento necesario para generar un fuerte impacto en la fluorescencia [94, 95]. Para la obtención de los fluoróforos se utilizaron dos rutas sintéticas ya conocidas: las condensaciones de Pechmann [96-99] y de Knoevenagel [100-102], ambas rutas llevan a la síntesis de 7-hidroxicumarinas, pero cada método utilizado produce un patrón de sustitución distinto en el anillo de la α -pirona. La condensación de Knoevenagel produce compuestos sustituidos en el C-3 (54 - 63), mientras que la condensación de Pechmann genera compuestos sustituidos en el C-4 (64 - 70). Los patrones de sustitución modifican los espectros de ^1H RMN de las cumarinas. Las sustituidas en C-3 presentan la señal del H-4 a campo bajo debido al desapantallamiento que presenta este protón, mientras que en las cumarinas sustituidas en C-4 el H-3 resuenan a campo más alto (Figura 6).

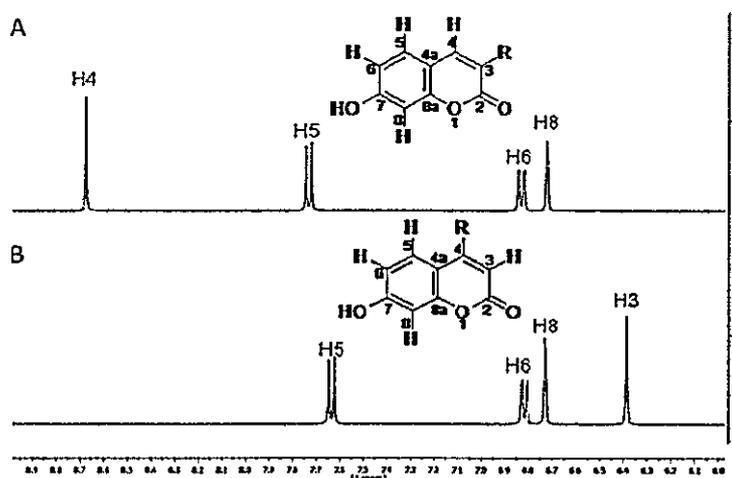
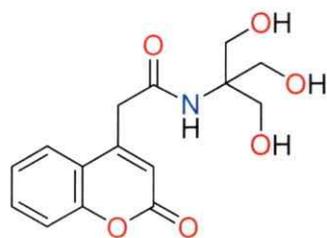


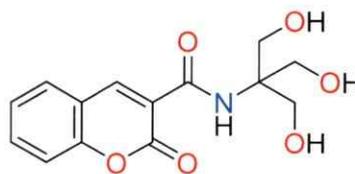
Fig. 6. Espectros característicos de 7-hidroxicumarinas sustituidas en C-3 y C-4.

Los espectros de ^1H RMN de las cumarinas sintetizadas se encuentran resumidos en las Tablas 1a y 1b.

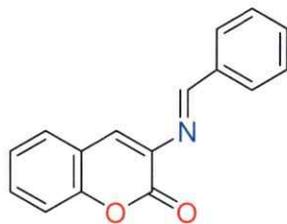
Con las cumarinas sintetizadas se evaluó los posibles fluoróforos y partiendo de ellas se sintetizaron los compuestos finales que han sido divididos en tres grupos denominados cumarinas modificadas con TRIS (2-amino-2-(hidroximetil) propano-1,3-diol) (**73** - **74**), derivados de bases de Schiff ((3*E*)-3-(bencilidenamino)-2*H*-cromen-2-onas) (**75**) y chalcocumarinas ((3-((*E*)-3-fenilacriloil)-2*H*-cromen-2-onas) (**76**).



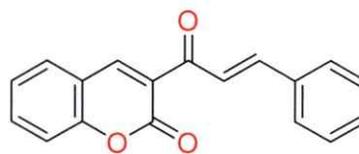
73



74



75



76

Tabla 1a. Asignaciones de las señales de ¹H RMN de cumarinas sustituidas en C-3.

Posición	Compuestos										
	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	
4	8,60 (s, 1H, =C-H)	8,50 (s, 1H, =C-H)	8,66 (s, 1H, =C-H)	8,38 (s, 1H, =C-H)	8,44 (s, 1H, =C-H)	8,50 (s, 1H, =C-H)	8,50 (s, 1H, =C-H)	8,90 (s, 1H, =C-H)	8,68 (s, 1H, =C-H)	9,80 (s, 1H, =C-H)	
5	7,74 (d, 1H, Ar-H, J = 8,6 Hz)	7,50 (d, 1H, Ar-H, J = 8,6 Hz)	7,73 (d, 1H, Ar-H, J = 8,6 Hz)	7,52 (d, 1H, Ar-H, J = 8,8 Hz)	7,50 (d, 1H, Ar-H, J = 8,8 Hz)	7,65-7,60 (m, 1H, Ar-H)	7,60-7,50 (m, 2H, Ar-H)	7,80 (d, 1H, Ar-H, J = 8,6 Hz)	7,51 (d, 1H, Ar-H, J = 8,4 Hz)	7,20 (d, 1H, Ar-H, J = 8,4 Hz)	
6	6,82 (dd, 1H, Ar-H, J = 8,6, 2,0 Hz)	6,86 (dd, 1H, Ar-H, J = 8,6, 2,0 Hz)	6,83 (dd, 1H, Ar-H, J = 8,6-2,1 Hz)	6,51 (d, 1H, Ar-H, J = 8,8 Hz)	6,86 (d, 1H, Ar-H, J = 8,8 Hz)	7,35-7,30 (m, 1H, Ar-H)	7,32-7,29 (m, 2H, Ar-H)	6,86 (dd, 1H, Ar-H, J = 8,6, 2,0 Hz)	7,07 (dd, 1H, Ar-H, J = 8,4, 2,0 Hz)	6,66 (d, 1H, Ar-H, J = 8,4 Hz)	
7		3,90 (s, 3H, O-CH ₃)	11,93 (sa, 1H, O-H)		3,88 (s, 3H, O-CH ₃)	7,65-7,60 (m, 1H, Ar-H)	7,60-7,50 (m, 2H, Ar-H)	11,20 (sa, 1H, OH)			
8	6,71 (d, 1H, Ar-H, J = 2,0 Hz)	6,80 (d, 1H, Ar-H, J = 2,0 Hz)	6,72 (d, 1H, Ar-H, J = 2,1 Hz)	6,31 (s, 1H, Ar-H)	6,78 (s, 1H, Ar-H)	7,35-7,30 (m, 1H, Ar-H)	7,32-7,29 (m, 2H, Ar-H)	6,75 (d, 1H, Ar-H, J = 2,0 Hz)	7,12 (d, 1H, Ar-H, J = 2,0 Hz)	6,70 (s, 1H, Ar-H)	
1'									8,20 (sa, 1H, -NH-)	5,20 (sa, 2H, -NH ₂)	
2'			11,93 (sa, 1H, O-H)	2,47 (s, 3H, -CO-CH ₃)	2,66 (s, 3H, CO-CH ₃)				2,34 (s, 3H, -CH ₃)		
1''	4,24 (q, 2H, O-CH ₂ , J = 7,0 Hz)	4,36 (q, 2H, O-CH ₂ , J = 7,1 Hz)					4,4 (q, 2H, COO-CH ₂ , J = 7,1 Hz)	7,20 (d, 2H, Ar-H, J = 7,5 Hz)			
2''	1,28 (t, 3H, -CH ₃ , J = 7,0 Hz)	1,40 (t, 3H, -CH ₃ , J = 7,1 Hz)					1,4 (t, 3H, -CH ₃ , J = 7,1 Hz)	7,50 (t, 2H, Ar-H, J = 7,5 Hz)			
3''								7,30 (t, 1H, Ar-H, J = 7,5 Hz)	2,25 (s, 3H, -CH ₃)		

Tabla 1b. Asignaciones de las señales de ^1H RMN de cumarinas sustituidas en C-4.

Posición	64	65	66	67	68	69	70
3	6,00 (s, 1H, =C-H)	6,20 (s, 1H, =C-H)	6,39 (s, 1H, =C-H)	6,41 (s, 1H, =C-H)	6,22 (s, 1H, Ar-H)	5,84 (s, 1H, =C-H)	6,10 (s, 1H, =C-H)
5	7,35 (d, 1H, Ar-H, $J = 8,8$ Hz)	7,50 (d, 1H, Ar-H, $J = 8,4$ Hz)	7,63 (d, 1H, Ar-H, $J = 8,6, 0$ Hz)	7,57 (d, 1H, Ar-H, $J = 8,8$ Hz)	7,49 (d, 1H, Ar-H, $J = 8,6$ Hz)	10,31 (sa, 1H, O-H)	7,55 (d, 1H, Ar-H, $J = 8,0$ Hz)
6	6,67 (dd, 1H, Ar-H, $J = 8,8, 2,4$ Hz)	6,80 (dd, 1H, Ar-H, $J = 8,4, 2,0$ Hz)	6,82 (dd, 1H, Ar-H, $J = 8,6, 1,0$ Hz)	6,90 (dd, 1H, Ar-H, $J = 8,8, 2,5$ Hz)	6,76 (dd, 1H, Ar-H, $J = 8,6, 2,0$ Hz)	6,25 (d, 1H, Ar-H, $J = 1,0$ Hz)	6,78 (dd, 1H, Ar-H, $J = 8,0-2,0$ Hz)
7		10,60 (sa, 1H, O-H)	11,72 (sa, 1H, O-H)	3,90 (s, 3H, O-CH ₃)	10,59 (sa, 1H, O-H)	10,53 (sa, 1H, O-H)	δ 10,54 (sa, 1H, O-H)
8	6,50 (d, 1H, Ar-H, $J = 2,4$ Hz)	6,70 (d, 1H, Ar-H, $J = 2,0$ Hz)	6,73 (d, 1H, Ar-H, $J = 1,0$ Hz)	6,85 (d, 1H, Ar-H, $J = 2,5$ Hz)	6,71 (d, 1H, Ar-H, $J = 2,0$ Hz)	6,16 (d, 1H, Ar-H, $J = 1,0$ Hz)	6,68 (d, 1H, Ar-H, $J = 2,0$ Hz)
1'	3,50 (s, 2H, -CH ₂ -)	3,90 (s, 2H, -CH ₂ -)	4,91 (s, 2H, -CH ₂ -)	4,63 (s, 2H, -CH ₂ -)	4,68 (s, 2H, -CH ₂ -)	2,48 (s, 3H, -CH ₃ -)	2,33 (s, 3H, -CH ₃ -)
2'					5,63 (sa, 1H, O-H)		
1''		4,10 (q, 2H, O-CH ₂ -, $J = 7,0$ Hz),					
2''		1,2 (t, 3H, -CH ₃ -, $J = 7,0$ Hz)					

Algunas de las cumarinas sintetizadas se lograron cristalizar. Entre éstas se cuenta el monohidrato del 7-hidroxicumarin-3-carboxilato de etilo **54** [103], el cual consiste en una molécula $C_{12}H_{10}O_5$ con una molécula de agua de cristalización. Una perspectiva de la estructura molecular con los átomos etiquetados se muestra en la Figura 7. Una búsqueda en la Cambridge Structural Database (CSD version 5.31, August 2010) muestra algunos compuestos similares como el 7-hidroxi-4-cumarinacetato de etilo [CSD refcode SICREB (Subramanian *et al.*, 1990)] y el monohidrato del ácido 7-hidroxi-4-cumarina [CSD refcode SICRIF (Sivakumar *et al.*, 1990)] [104, 105].

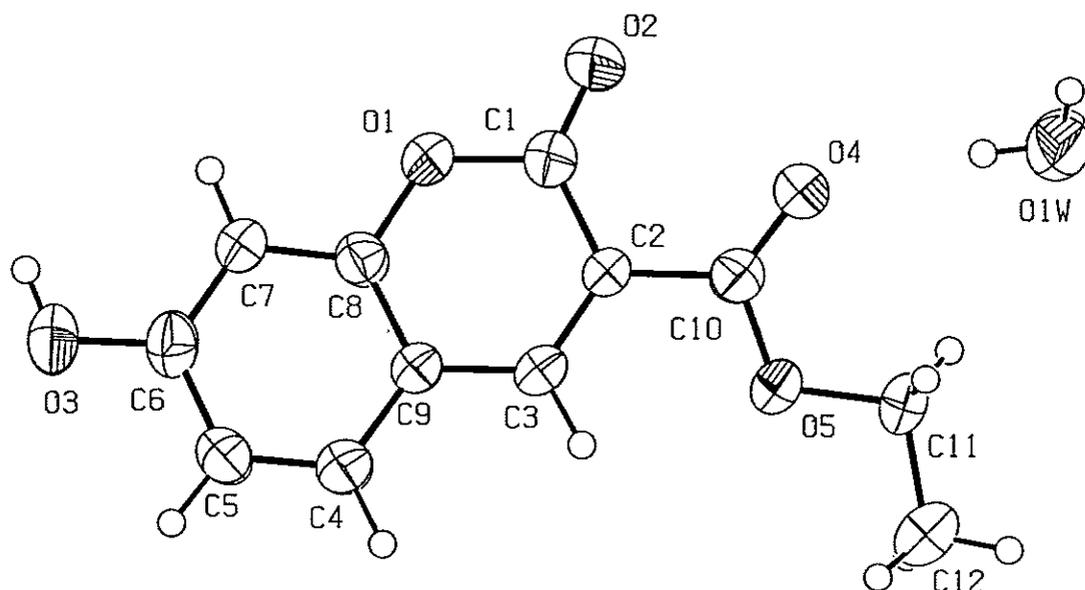
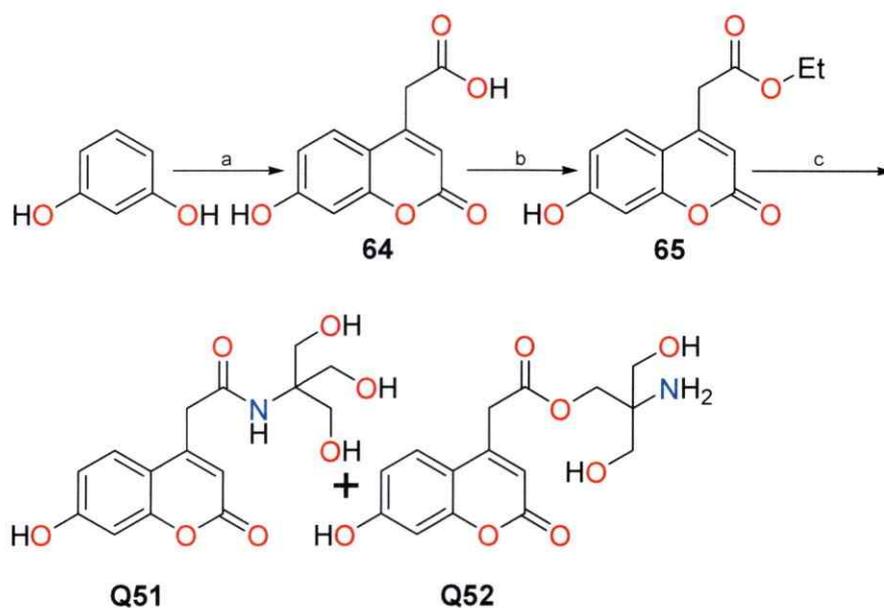


Fig. 7. Estructura cristalina de **54**.

En total, de las cumarinas modificadas con TRIS se sintetizaron tres (**Q51 - Q53**), de los derivados de bases de Schiff siete (**BS-1 - BS-7**) y de las chalcocumarinas catorce (**Ch-C1 - Ch-C14**).

5.1.1. Ruta sintética para obtener los derivados de TRIS.

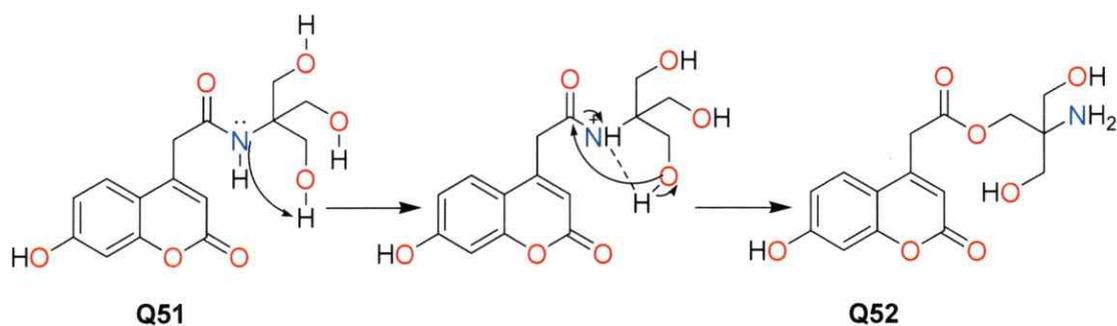
Los derivados de TRIS se sintetizaron en tres pasos (Esquema 1). La purificación de cada producto fue muy simple y se logró con rendimiento del 70 % en el caso de obtener solamente **Q51** y del 39 % y 27 % para **Q51** y **Q52** respectivamente. Para obtener los compuestos **Q51** y **Q52** se parte del resorcinol (1,3-dihidroxibenceno) y ácido cítrico pretratado con H_2SO_4 para inducir su descarboxilación en el C-2. Se adiciona el resorcinol predisoluto en H_2SO_4 a 0°C , gota a gota, para evitar polimerizaciones. En este paso es crucial el control de la temperatura. De esta manera fue sintetizado el compuesto **64**, el que fue esterificado en condiciones de Fischer-Speier [106]. Una vez preparado el compuesto **65** se hizo reaccionar con 2-amino-2-(hidroximetil)propano-1,3-diol.



Esquema 1. Síntesis de **Q51** y **Q52**. Condiciones: a) ácido cítrico, H_2SO_4 , agitación 48 h., b) EtOH, H_2SO_4 , reflujo 5-8 h., c) EtOH, TRIS, reflujo 48 h.

Este paso ocurre rápidamente entre el éster de la cumarina y el grupo amino del TRIS utilizando como solvente EtOH, precipitando espontáneamente el producto de reacción. Sin embargo, dejando proseguir la reacción y evaporarse un poco el solvente, comienza

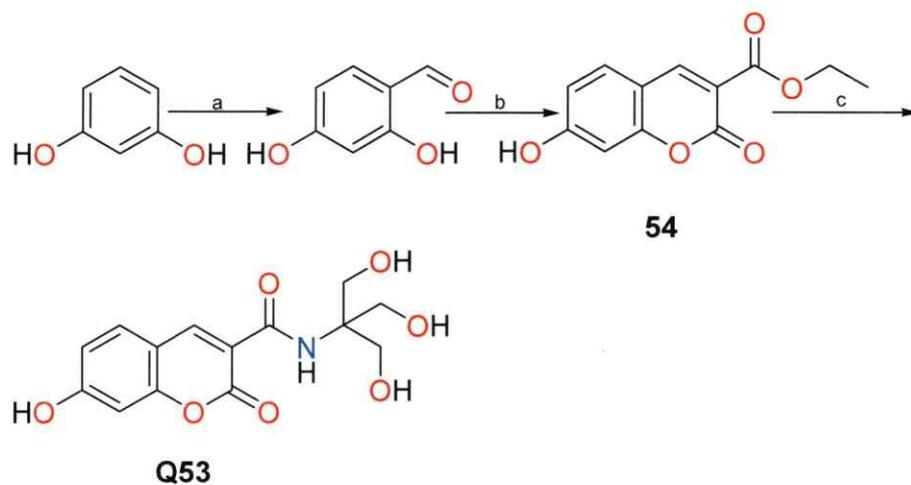
a formarse el compuesto **Q52** caracterizado espectroscópicamente y no reportado en la bibliografía. Un hipotético esquema mecanístico de la reacción supone la formación de **Q51** previo a la formación del compuesto **Q52**. Este último puede formarse presumiblemente por rearrreglo molecular (Esquema 2) bajo control cinético.



Esquema 2. Posible mecanismo para la obtención de **Q52**.

El compuesto **Q51** ha sido reportado [74] como sustrato fluorescente para la determinación de actividad enzimática de tipo galactosidasa, pero su uso como sonda fluorescente para iones no ha sido descrito.

El compuesto **Q53** se sintetizó de manera muy similar a los compuestos **Q51** y **Q52**. Para obtener dicho compuesto se partió del resorcinol que mediante una formilación de Vilsmeier-Haack, dio un único compuesto (2,4-dihidroxibenzaldehído) con rendimiento del 88 %. Este último compuesto se hizo reaccionar con malonato de dietilo utilizando una condensación de Knoevenagel obteniendo el compuesto **54**. Seguidamente se hizo una amidación mediante una reacción de sustitución nucleofílica entre el TRIS y la función éster de la cumarina, obteniendo el compuesto **Q53** como único producto con un rendimiento de 76 % (Esquema 3).



Esquema 3. Síntesis de **Q53**. Condiciones: a) POCl_3 , DMF, ACN.; b) Malonato de dietilo, piperidina, AcOH, EtOH, $70\text{ }^\circ\text{C}$, 6 h., c) EtOH, TRIS, reflujo 48 h.

Los espectros de ^1H RMN de los compuestos **Q51** (Anexo 1a) y **Q53** (Anexo 3a) son muy similares y ellos presentan una señal particular que los identifica: el protón amídico aparece a campo bajo muy cerca de la región de los protones aromáticos (Figura 8).

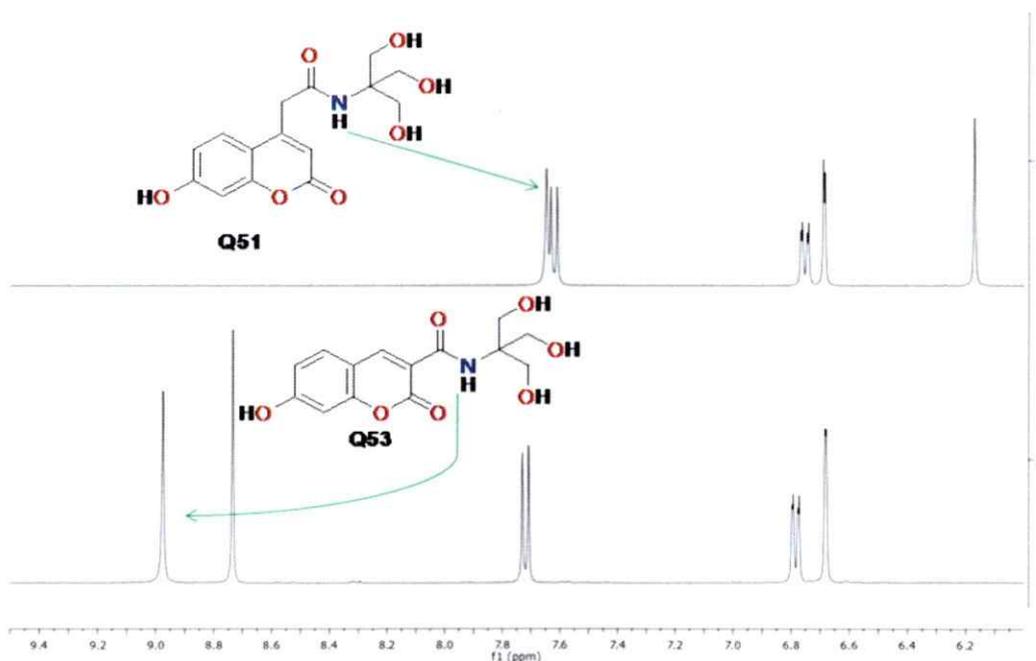


Fig. 8. Espectros de ^1H RMN señal mostrando las señales de los protones amídicos de los compuestos **Q51** y **Q53**.

Estos espectros también tienen en común la presencia de señales a campo alto típicas de metilenos equivalentes correspondientes al TRIS, y así mismo la presencia de señales a campo bajo propias de protones del anillo aromático de la cumarina. El compuesto **Q52** (Anexo 2a) presenta un espectro muy diferente en la región alifática debido a que sólo dos de los metilenos son equivalentes. Asimismo aparece una nueva señal propia de los protones del grupo amino.

Los espectros de ^{13}C RMN presentaron señales típicas de átomos de carbono con hibridación sp^2 y sp^3 . Los espectros de los compuestos **Q51**, **Q52** y **Q53** se encuentran en los Anexos 1b, 2b y 3b. Y en la tabla 2 se consignan los desplazamientos químicos de protones y carbonos de cada uno de los compuestos.

Tabla 2. Asignaciones de las señales ^1H RMN y ^{13}C RMN de Q51 – Q53.

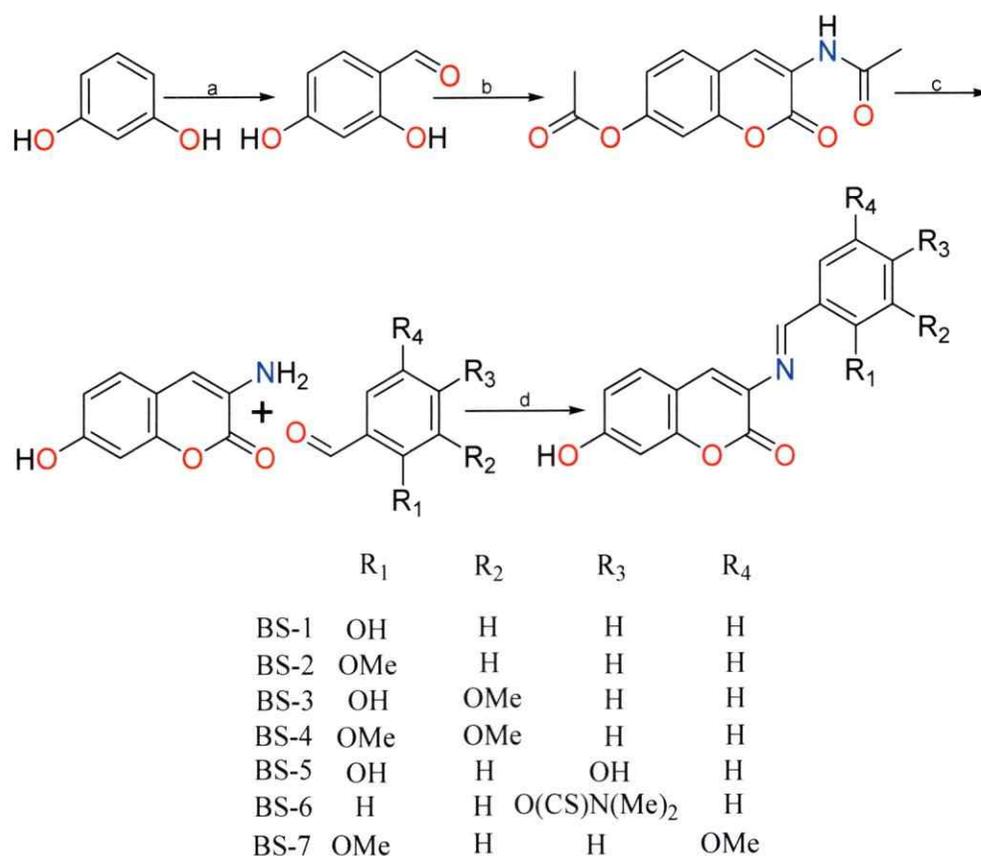
Posición	Q51		Q52		Q53	
	^1H RMN	^{13}C RMN	^1H RMN	^{13}C RMN	^1H RMN	^{13}C RMN
2		162,0		161,7		166,8
3	6,17 (s, 1H, =C-H)	111,7	6,30 (s, 1H, =C-H)	111,6		112,5
4		155,5		155,4	8,98 (s, 1H, =C-H)	148,4
4a		113,5		113,4		115,9
5	7,62 (d, 1H, Ar-H, $J = 8,6$ Hz)	127,3	7,63 (d, 1H, Ar-H, $J = 8,8$ Hz)	127,3	7,72 (d, 1H, Ar-H, $J = 8,6$ Hz)	132,4
6	6,75 (dd, Ar-H, 1H, $J = 8,6, 2,0$ Hz)	111,8	6,77 (dd, 1H, Ar-H, $J = 8,8, 2,0$ Hz)	111,6	6,78 (dd, 1H, Ar-H, $J = 8,6, 2,0$ Hz)	110,7
7		160,8	10,58 (sa, 1H, O-H)	160,1		161,9
8	6,69 (d, 1H, Ar-H, $J = 2,0$ Hz)	102,7	6,71 (d, 1H, Ar-H, $J = 2,0$ Hz)	102,7	6,68 (d, 1H, Ar-H, $J = 2,0$ Hz)	102,4
8a		152,1		151,2		157,3
1'	3,70 (s, 2H, -CH ₂ -)		3,78 (s, 2H, -CH ₂ -)	31,2		162,6
2'		169,3		163,1	8,74 (s, 1H, CO-NH-)	
3'	7,65 (s, 1H, N-H)					62,7
4'		60,8	4,10 (s, 2H, -CH ₂ -)	77,2	3,63 (s, 6H, -CH ₂ -), 4,78 (sa, 3H, O-H)	60,8
5'	3,55 (s, 6H, -CH ₂ -OH), 4,70 (sa, 3H, O-H)	63,0	3,43-3,30 (m, 2H, -NH ₂ -)	64,2	3,63 (s, 6H, -CH ₂ -), 4,78 (sa, 3H, O-H)	60,8
6'	3,55 (s, 6H, -CH ₂ -OH), 4,70 (sa, 3H, O-H)	63,0	3,43-3,30 (m, 2H, -CH ₂ -)	71,1	3,63 (s, 6H, -CH ₂ -), 4,78 (sa, 3H, O-H)	60,8
7'	3,55 (s, 6H, -CH ₂ -OH), 4,70 (sa, 3H, O-H)	63,0	3,43-3,30 (m, 2H, -CH ₂ -)	71,1		

5.1.2. Ruta sintética para obtener derivados de (3E)-3-(bencilidenamino)-2H-cromen-2-ona.

El segundo grupo de compuestos estudiados son derivados de bases de Schiff de la 3-amino-7-hidroxicumarina ((3E)-3-(bencilidenamino)-2H-cromen-2-onas). Éstos fueron

sintetizados por una sola ruta en 4 pasos (Esquema 4). Para obtener la aminocumarina se utilizó N-acetilglicina o CBZ-glicina obteniendo el mismo producto final con rendimientos semejantes.

Los rendimientos de la formación de imina son muy buenos, variando entre un 80-98 %, dependiendo de la sustitución del anillo aromático (Esquema 4).



Esquema 4. Síntesis de **BS-1** – **BS-7**. Condiciones: a) Acetilglicina, anhídrido acético, acetato de sodio anhidro, b) HCl/H₂O 2:1 reflujo, 2 h, c) EtOH, reflujo.

Los espectros de ¹H RMN de los compuestos **BS-1** – **BS-7** (Anexos 4 - 10) son muy similares y ellos también presentan una señal particular que los identifica, el protón imínico aparece a campo bajo a δ entre 8,0 y 9,0 Hz (Figura 9), el cual varía

dependiendo de los sustituyentes presentes en el anillo aromático. En la tabla 3 se presentan todas las asignaciones espectrales de RMN de los 7 compuestos.

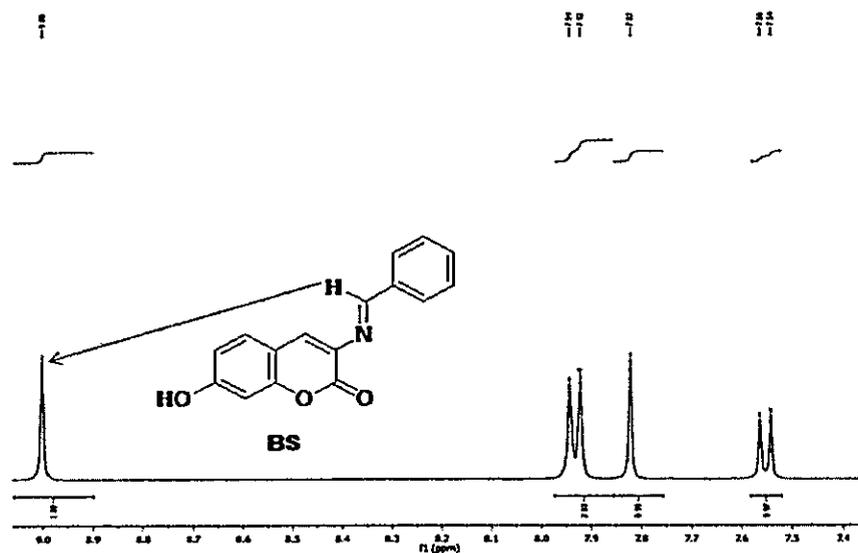


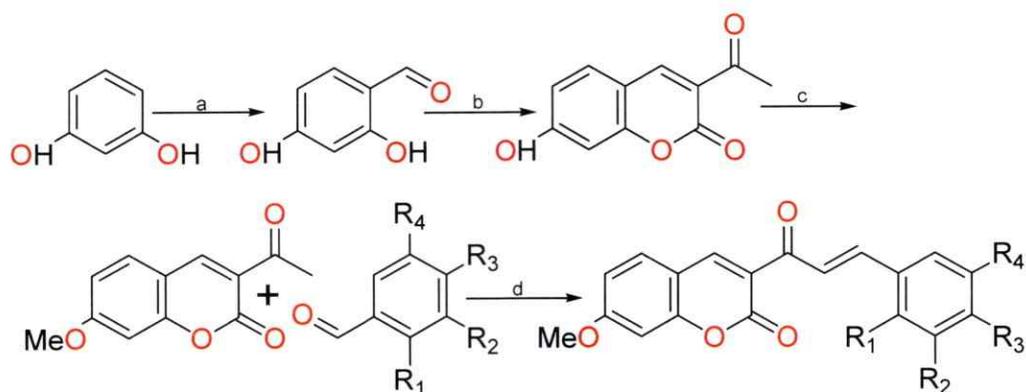
Fig. 9. Espectro de ^1H RMN de BS, destacando la señal del protón de la imina.

Tabla 3. Asignaciones de las señales ^1H RMN de **BS-1** – **BS-7**.

Posición	Compuestos						
	BS-1	BS-2	BS-3	BS-4	BS-5	BS-6	BS-7
4	8,03 (s, 1H, =C-H)	7,88 (s, 1H, =C-H)	8,03 (s, 1H, =C-H)	7,81 (s, 1H, =C-H)	7,93 (s, 1H, =C-H)	7,82 (s, 1H, =C-H)	7,81 (s, 1H, =C-H)
5	7,60 (d, 1H, Ar-H, $J = 8,6$ Hz)	8,08 (d, 1H, Ar-H, $J = 8,2$ Hz)	7,56 (d, 1H, Ar-H, $J = 8,2$ Hz)	7,54 (d, 1H, Ar-H, $J = 8,2$ Hz)	7,52 (d, 1H, $J = 8,6$ Hz)	7,55 (d, 1H, Ar-H, $J = 8,6$ Hz)	7,54 (d, 1H, Ar-H, $J = 8,2$ Hz)
6	6,82 (d, 1H, Ar-H, $J = 8,6$ Hz)	6,89 (d, 1H, Ar-H, $J = 8,2$ Hz)	6,83 (d, 1H, Ar-H, $J = 8,2$ Hz)	6,80 (d, 1H, Ar-H, $J = 8,2$ Hz)	6,40 (dd, 1H, $J = 8,6, 2,0$ Hz)	6,81 (dd, 1H, Ar-H, $J = 8,6, 2,0$ Hz)	6,80 (d, 1H, Ar-H, $J = 8,2$ Hz)
7	10,62 (sa, 1H, O-H)	10,61 (sa, 1H, O-H)	10,63 (sa, 1H, O-H)	10,53 (sa, 1H, O-H)	10,57 (sa, 1H, O-H)	10,56 (sa, 1H, O-H)	10,53 (sa, 1H, O-H)
8	6,76 (s, 1H, Ar-H)	6,83 (s, 1H, Ar-H)	6,79 (s, 1H, Ar-H)	6,74 (s, 1H, Ar-H)	6,28 (d, 1H, $J = 2,0$ Hz)	6,76 (d, 1H, Ar-H, $J = 2,0$ Hz)	6,74 (s, 1H, Ar-H)
2'	9,21 (s, 1H, N=C-Ar)	9,41 (s, 1H, N=C-Ar)	9,21 (s, 1H, N=C-Ar)	9,31 (s, 1H, N=C-Ar)	9,02 (s, 1H, N=C-Ar)	9,00 (s, 1H, N=C-Ar)	9,31 (s, 1H, N=C-Ar)
2''	12,89 (s, 1H, O-H-O=C)	3,97 (s, 3H, OCH ₃)	12,95 (s, 1H, O-H-O=C)	3,83 (s, 3H, OCH ₃)	13,36 (s, 1H, O-H-O=C)	7,22 (d, 1H, Ar-H, $J = 8,0$ Hz)	3,83 (s, 3H, OCH ₃)
3''	7,55 (d, 1H, Ar-H, $J = 8,6$ Hz)	7,61 (m, 2H, Ar-H)	3,81 (s, 3H, OCH ₃)	3,75 (s, 3H, OCH ₃)	6,75 (s, 1H)	7,93 (d, 1H, Ar-H, $J = 8,0$ Hz)	7,09 (s, 2H, Ar-H)
4''	6,96 (m, 2H, Ar-H)	7,61 (m, 2H, Ar-H)	7,11 (d, 1H, Ar-H, $J = 8,2$ Hz)	7,50 (s, 2H, Ar-H)	10,37 (sa, 1H, O-H)	3,37, 3,33 (s, 6H, N(CH ₃) ₂)	7,09 (s, 2H, Ar-H)
5'''	6,96 (m, 2H, Ar-H)	7,13 (t, 1H, Ar-H, $J = 8,0$)	6,89 (t, 1H, Ar-H, $J = 8,2$ Hz)	7,09 (s, 2H, Ar-H)	6,81 (dd, 1H, $J = 8,4, 2,0$ Hz)	7,93 (d, 1H, Ar-H, $J = 8,0$ Hz)	3,75 (s, 3H, OCH ₃)
6'''	7,40 (dd, 1H, Ar-H, $J = 8,6, 2,0$ Hz)	7,23 (d, 1H, Ar-H, $J = 8,0$)	7,19 (d, 1H, Ar-H, $J = 8,2$ Hz)	7,50 (s, 2H, Ar-H)	7,39 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz)	7,22 (d, 1H, Ar-H, $J = 8,0$ Hz)	7,50 (s, 1H, Ar-H)

5.1.3. Ruta sintética para obtener derivados de ((3-((*E*)-3-fenilacrilil)-2*H*-cromen-2-ona).

La síntesis de las chalcocumarinas (**Ch-C1** – **Ch-C14**) se logró mediante una ruta en 4 pasos sintéticos. (Esquema 5).



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Ch-C1	H	H	H	H
Ch-C2	OH	H	H	H
Ch-C3	H	OH	H	H
Ch-C4	H	H	OH	H
Ch-C5	OMe	H	H	H
Ch-C6	H	OMe	H	H
Ch-C7	H	H	OMe	H
Ch-C8	H	H	OEt	H
Ch-C9	H	H	SH	H
Ch-C10	H	H	N(Me) ₂	H
Ch-C11	OMe	OMe	H	H
Ch-C12	OMe	H	H	OMe
Ch-C13	H	OMe	OMe	H
Ch-C14	H	-OCH ₂ -	-OCH ₂ -	H

Esquema 5. Síntesis de **Ch-C1** – **Ch-C14**. Condiciones: a) POCl₃, DMF, ACN.; b) Acetoacetato de etilo, piperidina, AcOH, EtOH, reflujo 6 h.; c) Me₂SO₄, K₂CO₃, DMF.; d) piperidina, DCM y/o ACN, reflujo 3-12 h.

Los espectros de ¹H RMN de los compuestos **Ch-C1** – **Ch-C14** (Anexos 11 - 24) presentan patrones de desplazamientos químicos muy similares con una señal particular que identifica este tipo de moléculas, los protones vinílicos vecinos a la cetona α,β-insaturada aparecen a campo bajo muy cercano de la región de los protones aromáticos

presentando dos dobletes con δ variable entre 8,0 y 7,0 con $J_{ab} = 15,9$ Hz, demostrando su relación *trans* (Figura 10). En la tabla 4 se presentan todas las asignaciones de los 15 compuestos.

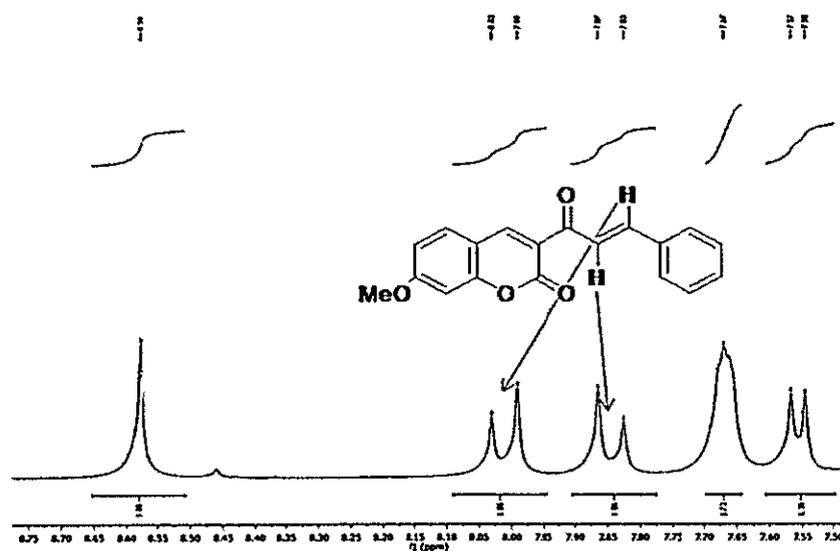


Fig. 10. Espectro de ¹H RMN destacando las señales de los protones vecinos al carbonilo del fragmento cinámico de los compuestos Ch-C.

Tabla 4. Asignaciones de ^1H RMN de **Ch-C1** – **Ch-C5**.

Posición	Compuestos				
	Ch-C1	Ch-C2	Ch-C3	Ch-C4	Ch-C5
4	8,59 (s, 1H, =C-H)	8,71 (s, 1H, =C-H)	8,67 (s, 1H, =C-H)	8,63 (s, 1H, =C-H)	8,56 (s, 1H, =C-H)
5	7,57 (d, 1H, Ar-H, $J = 8,6$ Hz)	7,92 (d, 1H, Ar-H, $J = 8,8$ Hz)	7,85 (d, 1H, Ar-CH=, $J = 8,6$ Hz)	7,85 (d, 1H, Ar-H, $J = 8,6$ Hz)	7,56 (d, 1H, Ar-H, $J = 8,5$ Hz)
6	6,91 (dd, 1H, Ar-H, $J = 8,6, 1,0$ Hz)	7,07 (dd, 1H, Ar-H, $J = 8,6, 2,2$ Hz)	7,0 (dd, 1H, Ar-H, $J = 8,8, 1,8$ Hz)	7,01 (d, 1H, Ar-H, $J = 8,6$ Hz)	6,90 (d, 1H, Ar-H, $J = 8,5$ Hz)
7	3,92 (s, 3H, OCH ₃)	3,96 (s, 3H, OCH ₃)	3,88 (s, 3H, OCH ₃)	3,88 (s, 3H, OCH ₃)	3,91 (s, 6H, 2 OCH ₃)
8	6,86 (s, 1H, Ar-H)	7,12 (d, 1H, Ar-H, $J = 2,2$ Hz)	7,06 (s, 1H, Ar-H)	7,07 (s, 1H, Ar-H)	6,85 (s, 1H, Ar-H)
2'	7,86 (d, 1H, CO-CH=, $J = 15,8$ Hz)	7,89 (d, 1H, CO-CH=, $J = 15,9$ Hz)	7,62 (d, 1H, Ar-H, $J = 15,9$ Hz)	7,57 (d, 1H, CO-CH=, $J = 15,9$ Hz)	8,04 (d, 1H, CO-CH=, $J = 15,8$ Hz)
3'	8,03 (d, 1H, Ar-CH=, $J = 15,8$ Hz)	8,04 (d, 1H, Ar-CH=, $J = 15,9$ Hz)	7,73 (d, 1H, CO-CH=, $J = 15,9$ Hz)	7,66 (d, 1H, Ar-CH=, $J = 15,9$ Hz)	8,21 (d, 1H, Ar-CH=, $J = 15,8$ Hz)
2''	7,68 (sa, 1H, Ar-H)	10,44 (sa, 1H, O-H)	7,11 (s, 1H, Ar-H)	7,58 (d, 1H, Ar-H, $J = 8,3$ Hz)	3,91 (s, 6H, 2 OCH ₃)
3''	7,41 (sa, 1H, Ar-H)	7,35 (dd, 1H, Ar-H, $J = 7,0, 1,0$ Hz)	9,68 (sa, 1H, O-H)	6,83 (d, 1H, Ar-H, $J = 8,3$ Hz)	7,71 (d, 1H, Ar-H, $J = 7,7$ Hz)
4''	7,41 (sa, 1H, Ar-H)	6,94 (t, 1H, Ar-H, $J = 7,5$ Hz)	6,85 (d, 1H, Ar-H, $J = 8,0$ Hz)	6,85 (d, 1H, Ar-H, $J = 8,0$ Hz)	6,98 (t, 1H, Ar-H, $J = 7,7$ Hz)
5'''	7,41 (sa, 1H, Ar-H)	7,00 (t, 1H, Ar-H, $J = 8,0$ Hz)	7,25 (t, 1H, Ar-H, $J = 8,0$ Hz)	6,83 (d, 1H, Ar-H, $J = 8,3$ Hz)	7,37 (t, 1H, Ar-H, $J = 7,9$ Hz)
6'''	7,68 (sa, 1H, Ar-H)	7,69 (dd, 1H, Ar-H, $J = 7,7, 1,0$ Hz)	7,13 (d, 1H, Ar-H, $J = 8,0$ Hz)	7,58 (d, 1H, Ar-H, $J = 8,3$ Hz)	6,92 (d, 1H, Ar-H, $J = 7,7$ Hz)

Tabla 4. Asignaciones de ^1H RMN de **Ch-C6** – **Ch-C10**.

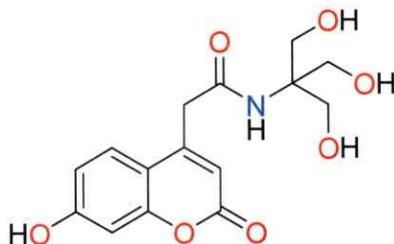
Posición	Compuestos				
	Ch-C6	Ch-C7	Ch-C8	Ch-C9	Ch-C10
4	8,58 (s, 1H, =C-H)	8,57 (s, 1H, =C-H)	8,54 (s, 1H, =C-H)	8,58 (s, 1H, =C-H)	8,56 (s, 1H, =C-H)
5	7,57 (d, 1H, Ar-H, <i>J</i> = 8,8 Hz)	7,63 (d, 1H, Ar-H, <i>J</i> = 8,6 Hz)	7,60 (d, 1H, Ar-H, <i>J</i> = 8,6 Hz)	7,58 (d, 1H, Ar-H, <i>J</i> = 8,6 Hz)	7,58 (d, 1H, Ar-H, <i>J</i> = 8,8 Hz)
6	6,91 (dd, 1H, Ar-H, <i>J</i> = 8,8, 2,0 Hz)	6,98-6,91 (m, 1H, Ar-H)	6,88 (d, 1H, Ar-H, <i>J</i> = 8,6 Hz)	6,90 (dd, 1H, Ar-H, 8,6, 2,0)	6,88 (d, 1H, Ar-H, <i>J</i> = 8,6, 2,2 Hz)
7	3,83 (s, 3H, OCH ₃)	3,91 (s, 3H, OCH ₃)	3,89 (s, 3H, OCH ₃)	3,91 (s, 3H, OCH ₃)	3,90 (s, 3H, OCH ₃)
8	6,85 (d, 1H, Ar-H, <i>J</i> = 2,0 Hz)	6,84 (d, 1H, Ar-H, <i>J</i> = 2,2 Hz)	6,82 (s, 1H, Ar-H)	6,84 (d, 1H, Ar-H, <i>J</i> = 2,0 Hz)	6,84 (d, 1H, Ar-H, <i>J</i> = 2,2 Hz)
2'	7,82 (d, 1H, CO-CH=, <i>J</i> = 15,9 Hz)	7,83 (d, 1H, CO-CH=, <i>J</i> = 15,7 Hz)	7,80 (d, 1H, CO-CH=, <i>J</i> = 15,7 Hz)	7,81 (d, 1H, CO-CH=, <i>J</i> = 15,7 Hz)	7,80 (d, 1H, CO-CH=, <i>J</i> = 15,7 Hz)
3'	7,99 (d, 1H, Ar-CH=, <i>J</i> = 15,9 Hz)	7,90 (d, 1H, Ar-CH=, <i>J</i> = 15,7 Hz)	7,87 (d, 1H, Ar-CH=, <i>J</i> = 15,7 Hz)	7,97 (d, 1H, Ar-CH=, <i>J</i> = 15,7 Hz)	7,96 (d, 1H, Ar-CH=, <i>J</i> = 15,7 Hz)
2''	7,18 (s, 1H, Ar-H)	7,53 (d, 1H, Ar-H, <i>J</i> = 8,8 Hz)	7,53 (d, 1H, Ar-H, <i>J</i> = 8,6 Hz)	7,56 (d, 1H, Ar-H, <i>J</i> = 8,6 Hz)	7,54 (d, 1H, Ar-H, <i>J</i> = 8,6 Hz)
3''	3,76 (s, 3H, OCH ₃)	6,91 (d, 1H, Ar-H, <i>J</i> = 8,6 Hz)	6,88 (d, 1H, Ar-H, <i>J</i> = 8,6 Hz)	7,23 (d, 1H, Ar-H, <i>J</i> = 8,6 Hz)	6,67 (d, 1H, Ar-H, <i>J</i> = 8,8 Hz)
4''	6,96 (dd, 2H, Ar-H, <i>J</i> = 8,0, 2,0)	3,84 (s, 3H, OCH ₃)	4,05 (q, 2H, O-CH ₂ -CH ₃ , <i>J</i> = 6,8 Hz), 1,4 (t, 3H, -CH ₃ , <i>J</i> = 6,8 Hz)	2,50 (s, 3H, SCH ₃)	3,04 (s, 6H, N(CH ₃) ₂)
5'''	7,35-7,25 (m, 1H, Ar-H)	6,91 (d, 1H, Ar-H, <i>J</i> = 8,6 Hz)	6,88 (d, 1H, Ar-H, <i>J</i> = 8,6 Hz)	7,23 (d, 1H, Ar-H, <i>J</i> = 8,6 Hz)	6,67 (d, 1H, Ar-H, <i>J</i> = 8,8 Hz)
6'''	7,35-7,25 (m, 1H, Ar-H)	7,53 (d, 1H, Ar-H, <i>J</i> = 8,8 Hz)	7,53 (d, 1H, Ar-H, <i>J</i> = 8,6 Hz)	7,56 (d, 1H, Ar-H, <i>J</i> = 8,6 Hz)	7,54 (d, 1H, Ar-H, <i>J</i> = 8,6 Hz)

Tabla 4. Asignaciones de ^1H RMN de **Ch-C11** – **Ch-C14**.

Posición	Compuestos		
	Ch-C11	Ch-C12	Ch-C13
4	8,57 (s, 1H, =C-H)	8,52 (s, 1H, =C-H)	8,54 (s, 1H, =C-H)
5	7,57 (d, 1H, Ar-H, $J = 8,6$ Hz)	7,51 (d, 1H, Ar-H, $J = 8,8$ Hz)	7,55 (d, 1H, Ar-H, $J = 8,6$ Hz)
6	6,90 (dd, 1H, Ar-H, $J = 8,6, 2,0$ Hz)	6,92-6,97 (m, 4H, Ar-H)	6,89 (dd, 1H, Ar-H, $J = 8,6, 2,0$ Hz)
7	3,91 (s, 3H, OCH ₃)	3,89 (s, 3H, OCH ₃)	3,91 (s, 3H, OCH ₃)
8	6,84 (d, 1H, Ar-H, $J = 2,0$ Hz)	6,92-6,97 (m, 4H, Ar-H)	6,83 (d, 1H, Ar-H, $J = 2,0$ Hz)
2'	8,02 (d, 1H, CO-CH=, $J = 16,0$ Hz)	7,97 (d, 1H, CO-CH=, $J = 15,6$ Hz)	8,00 (d, 1H, CO-CH=, $J = 15,9$ Hz)
3'	8,18 (d, 1H, Ar-CH=, $J = 16,0$ Hz)	8,14 (d, 1H, Ar-CH=, $J = 15,6$ Hz)	8,17 (d, 1H, Ar-CH=, $J = 15,9$ Hz)
2''	3,92 (s, 3H, OCH ₃)	3,84 (s, 3H, OCH ₃)	7,21 (d, 1H, Ar-H, $J = 3,0$ Hz)
3''	3,89 (s, 3H, OCH ₃)	6,92-6,97 (m, 4H, Ar-H)	3,87 (s, 3H, OCH ₃)
4''	6,97 (d, 1H, Ar-H, $J = 7,9$ Hz)	7,19 (dd, 1H, Ar-H, $J = 8,3, 1,6$ Hz)	3,81 (s, 3H, OCH ₃)
5''	7,09 (t, 1H, Ar-H, $J = 8,1$ Hz)	3,79 (s, 3H, OCH ₃)	6,85 (d, 1H, Ar-H, $J = 9,0$ Hz)
6''	7,36 (d, 1H, Ar-H, $J = 7,9$ Hz)	6,92-6,97 (m, 4H, Ar-H)	6,93 (dd, 1H, Ar-H, $J = 9,0, 3,0$ Hz)
			8,62 (s, 1H, =C-H)
			7,83 (d, 1H, Ar-H, $J = 8,6$ Hz)
			7,00 (dd, 1H, Ar-H, $J = 8,6, 2,0$ Hz)
			3,87 (s, 3H, OCH ₃)
			7,06 (sa, 1H, Ar-H)
			7,56 (d, 1H, CO-CH=, $J = 15,9$ Hz)
			7,63 (d, 1H, Ar-CH=, $J = 15,9$ Hz)
			7,23 (d, 1H, Ar-H, $J = 3,0$ Hz)
			6,07 (d, 2H, O-CH ₂ -O, $J = 2,0$ Hz)
			6,07 (d, 2H, O-CH ₂ -O, $J = 2,0$ Hz)
			6,97 (d, 1H, Ar-H, $J = 9,0$ Hz)
			7,33 (d, 1H, Ar-H, $J = 8,6$ Hz)

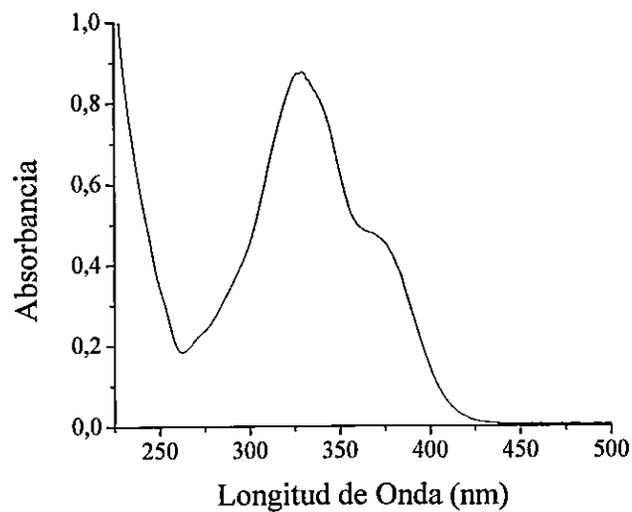
5.2. FOTOFÍSICA.

5.2.1. Estudio fotofísico de *N*-(1,3-dihidroxi-2-(hidroximetil)propan-2-il)-2-(7-hidroxi-2-oxo-2*H*-cromen-4-il)acetamida (Q51).



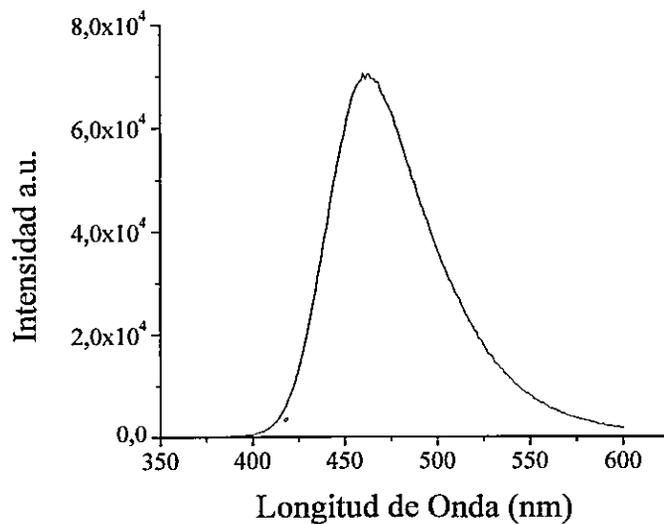
Q51

El estudio realizado sobre los compuestos **Q51**, **Q52** y **Q53** mostró características espectroscópicas muy similares (Tabla 5). En la mayoría de las moléculas de esta familia está presente un grupo dador de electrones en el C-7, especialmente OH. Por lo tanto revisaremos el efecto de la función hidroxilo en estos compuestos [107, 108]. El compuesto **Q51** mostró un espectro de absorción con un máximo en 330 nm y un hombro cerca de 370 nm (Gráfico 1). Los estudios espectroscópicos de absorción de 7-hidroxicumarinas no son concluyentes debido a que esta familia de compuestos presentan bandas de absorción desde 320-400 nm, y el desplazamiento al rojo aumenta a medida que el compuesto presenta mayor conjugación [109-111]. En el caso de los compuestos **Q51** y **Q52** presentan espectros de absorción en el rango de 330 nm y **Q53** en 400 nm que se debe a la conjugación que presenta este compuesto y a la sustitución presente en C-3.



Graf. 1. Espectro de absorción de **Q51** 10 μM en solución acuosa Buffer HEPES pH 7,2.

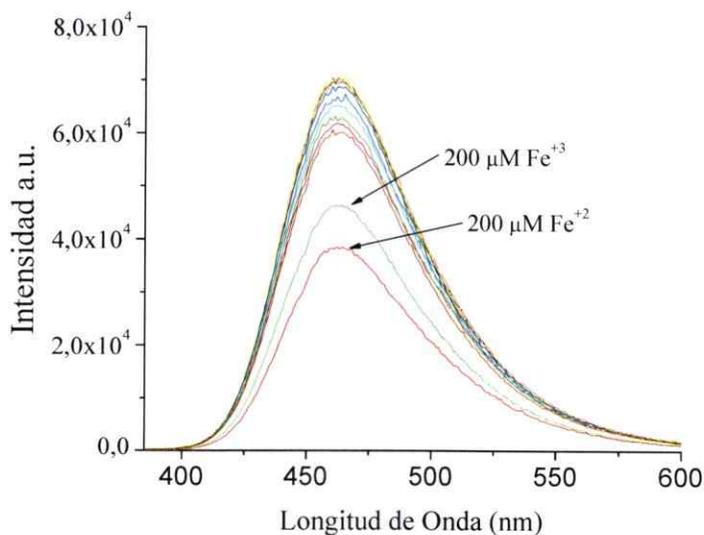
Normalmente las cumarinas fluorescen emitiendo en la región azul-verde (400-550 nm). El compuesto **Q51** presenta una banda de emisión a 460 (Gráfico 2), presentando un desplazamiento de Stokes de 8564 cm^{-1} .



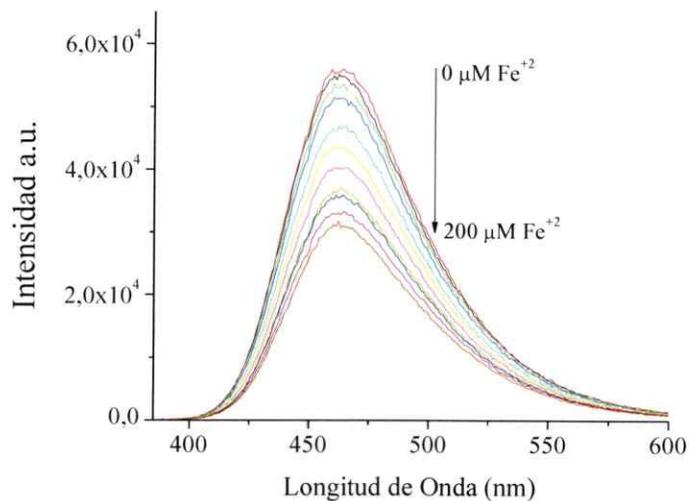
Graf. 2. Espectro de fluorescencia de **Q51** 10 μM en solución acuosa Buffer HEPES pH 7,2.

Una vez conocidas las principales características espectroscópicas de excitación y emisión del compuesto **Q51** se procedió a evaluar el efecto de los diferentes iones frente a dicho compuesto, mostrando éste una disminución importante de la intensidad de fluorescencia sólo en presencia de Fe^{+2} y Fe^{+3} (Gráfico 3).

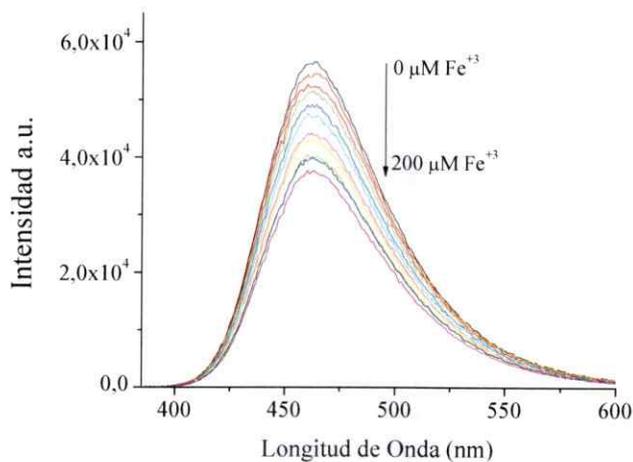
Al evaluar la fluorescencia de **Q51** con diferentes concentraciones (0-200 μM) de Fe^{+2} (Gráfica 4) y Fe^{+3} (Gráfica 5) se ve que hay un efecto de apagamiento en presencia de ambos iones. Sin embargo, este apagamiento es mucho mayor en presencia de Fe^{+2} .



Graf. 3. Espectro de fluorescencia de **Q51** 20 μM en presencia de diferentes iones a 200 μM en solución acuosa Buffer HEPES pH 7,2.



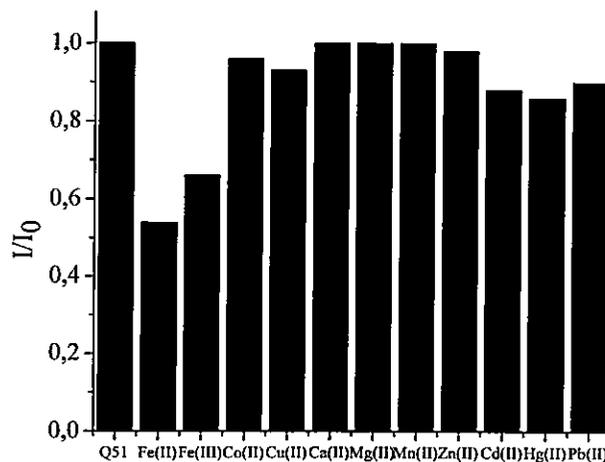
Graf. 4. Espectros de fluorescencia de **Q51** 20 μM en presencia de 0-200 μM Fe^{+2} en solución acuosa Buffer HEPES pH 7,2.



Graf. 5. Espectros de fluorescencia de **Q51** 20 μM en presencia de 0-200 μM Fe^{+3} en solución acuosa Buffer HEPES pH 7,2.

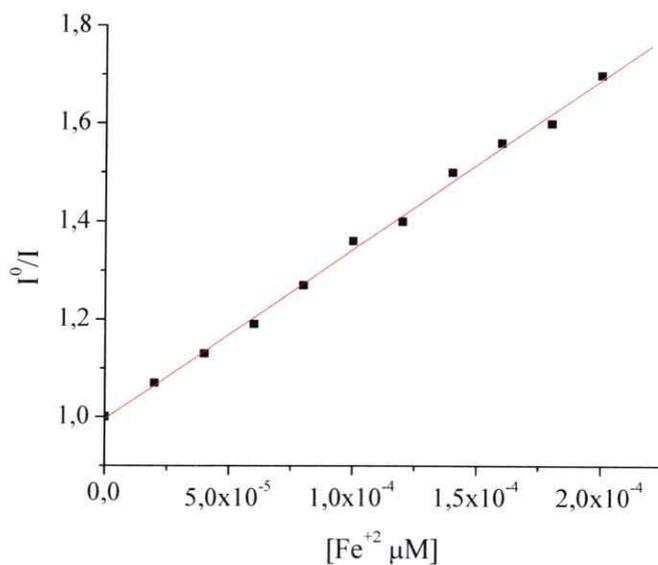
Al graficar I/I_0 vs. **Q51** e iones (200 μM) se encontró que en presencia de Fe^{+2} el apagamiento era de alrededor de 50 %, mientras al evaluar el mismo ligando con Fe^{+3} la intensidad se redujo al 65 % (Gráfico 6), Utilizando la teoría de Pearson, se puede

postular que el nitrógeno amídico puede estar participando en la quelación del metal por ser una base de fuerza intermedia.

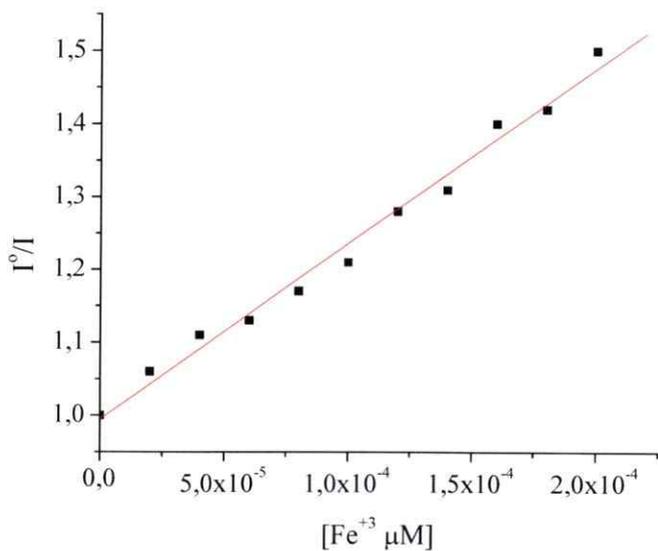


Graf. 6. Análisis de selectividad de iones con Q51. La concentración de todos los iones fue 200 μ M.

Para cuantificar la extinción bimolecular (apagamiento) de Q51, Q52 y Q53, se utilizó la ecuación de Stern-Volmer. La representación gráfica de I^0/I frente a la concentración del apagador, debe dar lugar a una recta cuya pendiente es la constante de Stern-Volmer (Gráficos 7 y 8 para Fe^{+2} y Fe^{+3} respectivamente). También a partir de estos gráficos se concluyó que la representación lineal mostrada, indica que la unión metal-ligando presenta una estequiometría 1:1 y que el apagamiento es 100 % estático. Esto último fue comprobado al determinar τ en presencia y ausencia del metal, como también al determinar la constante de velocidad k_q arrojando valores del orden de 10^{11} propios de este tipo de apagamiento (Tabla 6) [112].



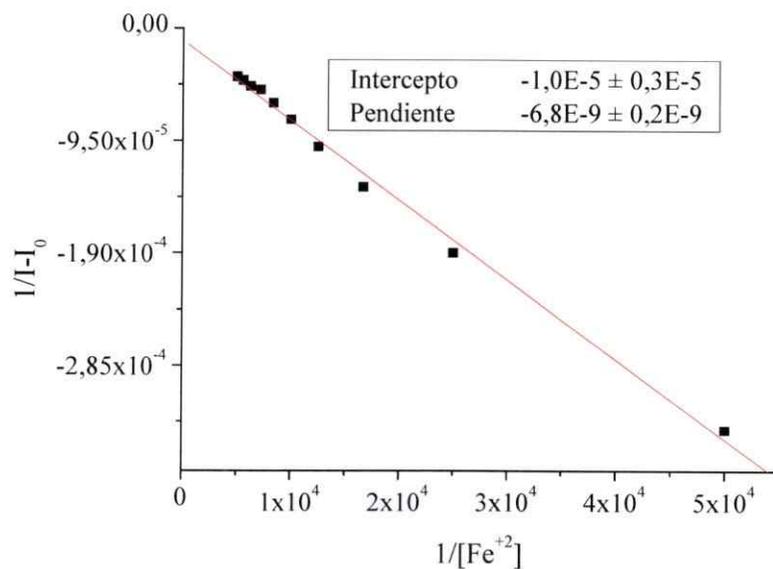
Graf. 7. Gráfico de Stern-Volmer para **Q51** en presencia de Fe^{+2}



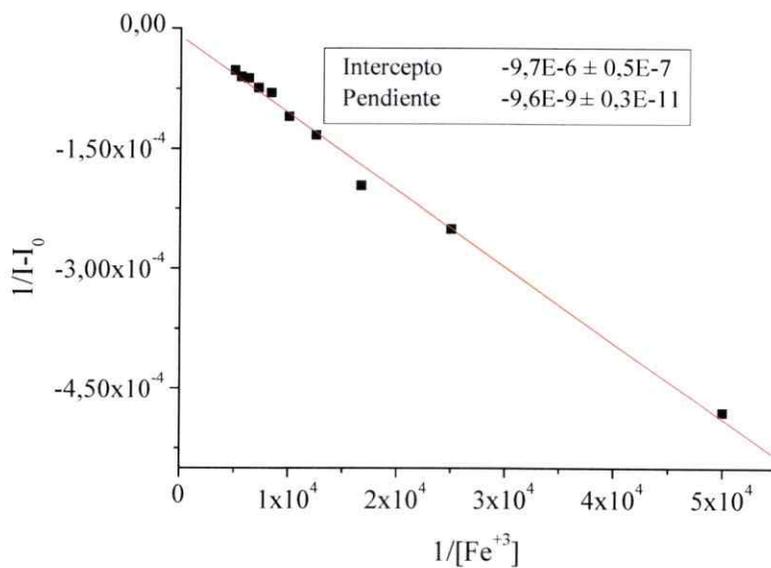
Graf. 8. Gráfico de Stern-Volmer para **Q51** en presencia de Fe^{+3} .

La determinación de las constantes de asociación de los complejos **Q51- Fe^{+2}** y **Q51- Fe^{+3}** (Tabla 7) se obtuvieron a partir de los espectros de fluorescencia, cuyos parámetros

iniciales fueron obtenidos por el método de Benesi-Hildebrand [87-90], de donde se obtuvieron los valores aproximados de K_a , como se ejemplifica en los gráficos 9 y 10.



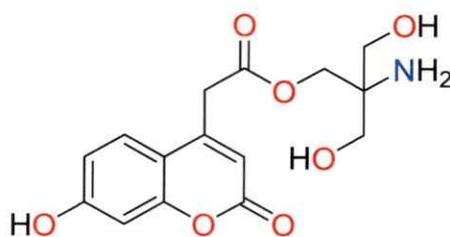
Graf. 9. Gráfico de Benesi-Hildebrand para **Q51** en presencia de Fe^{+2} .



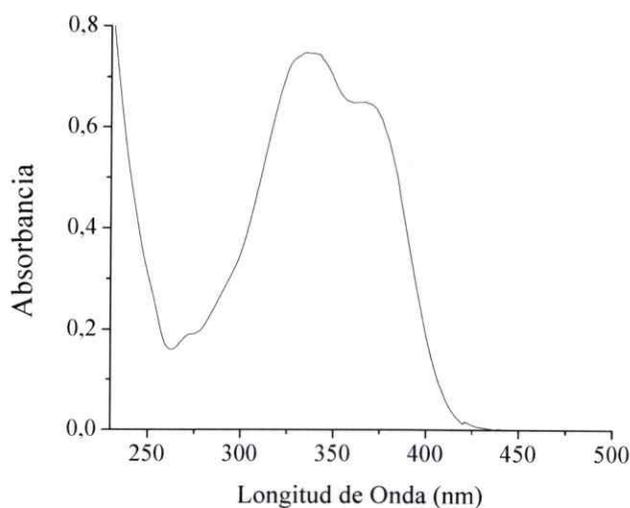
Graf. 10. Gráfico de Benesi-Hildebrand para **Q51** en presencia de Fe^{+3} .

5.2.2. Estudio fotofísico de 2-amino-3-hidroxi-2-(hidroximetil)propil-2-(7-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-4-il)acetato (Q52).

El compuesto **Q52**, obtenido como subproducto e isómero de **Q51**, muestra características espectroscópicas muy similares al anterior. Presenta un máximo $\lambda_{\text{máx}}$ de absorción en 336 nm típica de transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ (Gráfico 11), una emisión a 460 nm (Gráfico 12) (Tabla 5), con un desplazamiento de Stokes de 8022 cm^{-1} . El comportamiento mostrado ante los diferentes iones fue también similar al mostrado por el compuesto **Q51**, al igual que su comportamiento ante la presencia de Fe^{+2} y Fe^{+3} .

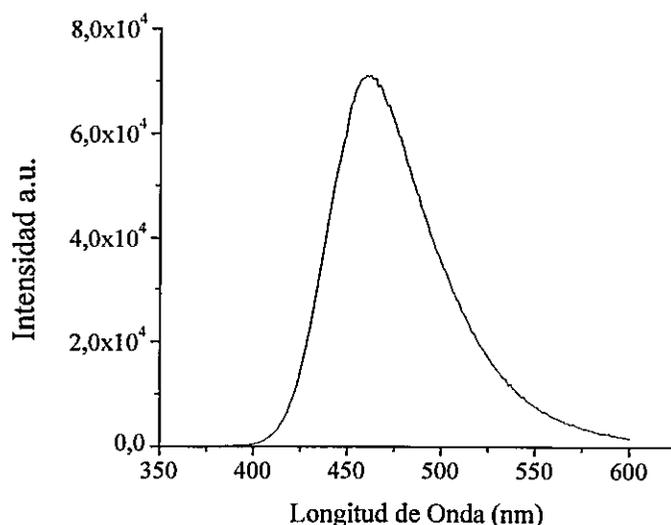


Q52



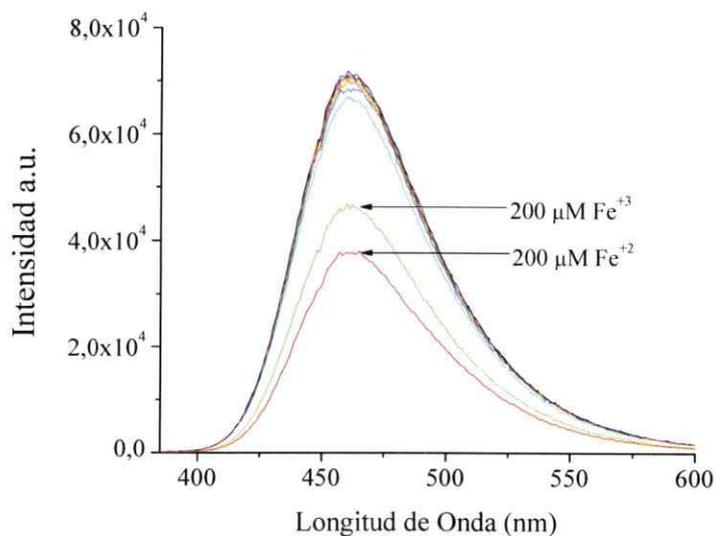
Graf. 11. Espectro de absorción de **Q52** $10 \mu\text{M}$ en solución acuosa Buffer HEPES pH 7,2.

Al evaluar los efectos de Fe^{+2} , Fe^{+3} y otros iones, se demostró que hay apagamiento de fluorescencia con Fe^{+2} (Gráfica 13). Cabe resaltar que se observó un efecto igual ante la presencia de Hg^{+2} , la cual se hace muy significativa cuando se prolonga la incubación, siendo el único ion que presenta dicha característica frente a **Q52** (Gráfica 14).

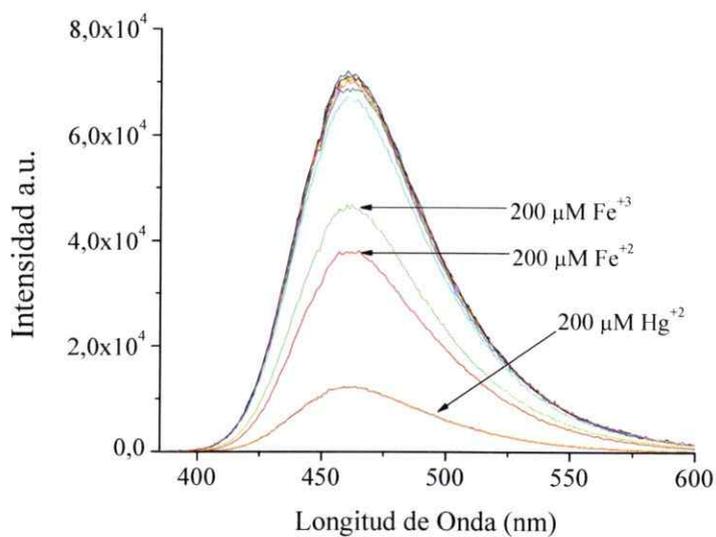


Graf. 12. Espectro de fluorescencia de **Q52** 10 μM en solución acuosa Buffer HEPES pH 7,2.

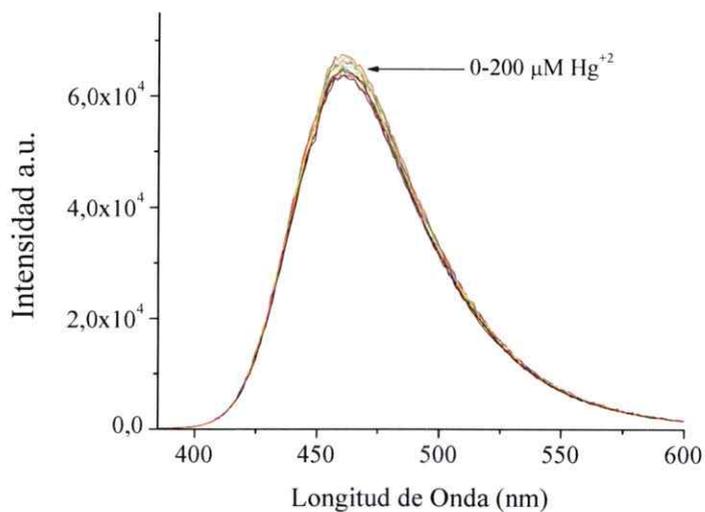
Para conocer mejor este efecto se hizo una incubación (0, 5 y 10 min) para seguir con la adquisición de los espectros (Gráficas 15, 16 y 17). En éstos se muestra como el tiempo influye en el apagamiento de la fluorescencia, atribuible a una cinética lenta de quelación y la presencia de un grupo amino libre que presumiblemente se encuentra involucrado en la interacción metal-ligando. Sin embargo cabe destacar que el interés biológico de esta característica sería poco, ya que las concentraciones de Hg^{+2} en células son casi nulas. Por lo tanto la aplicabilidad de **Q52** estaría limitada a su uso como quelante de hierro.



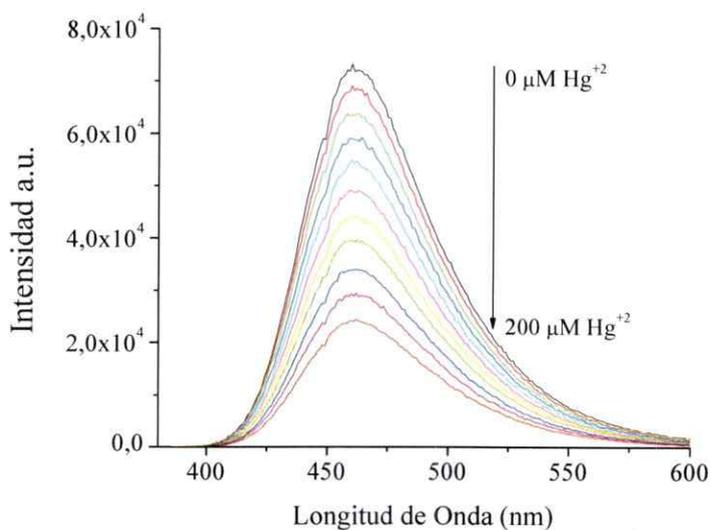
Graf. 13. Espectro de fluorescencia de **Q52** 20 μM con diferentes iones 200 μM a 0 minutos, en solución acuosa Buffer HEPES pH 7,2.



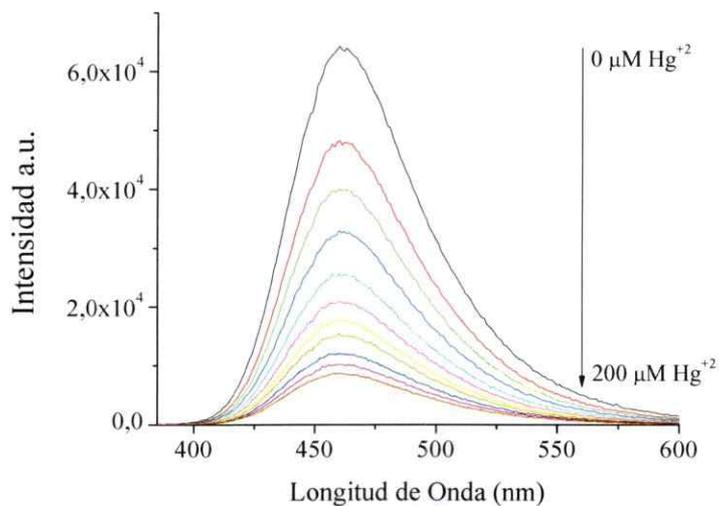
Graf. 14. Espectro de fluorescencia de **Q52** 20 μM con diferentes iones 200 μM a 15 minutos, en solución acuosa Buffer HEPES pH 7,2.



Graf. 15. Espectro de fluorescencia de **Q52** 20 μM con 0-200 μM Hg^{+2} a 0 minutos, en solución acuosa Buffer HEPES pH 7,2.

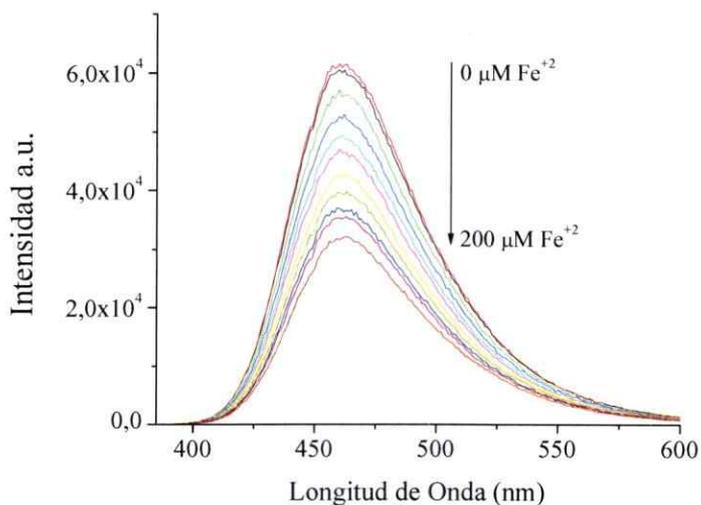


Graf. 16. Espectro de fluorescencia de **Q52** 20 μM con 0-200 μM de Hg^{+2} a 5 minutos, en solución acuosa Buffer HEPES pH 7,2.

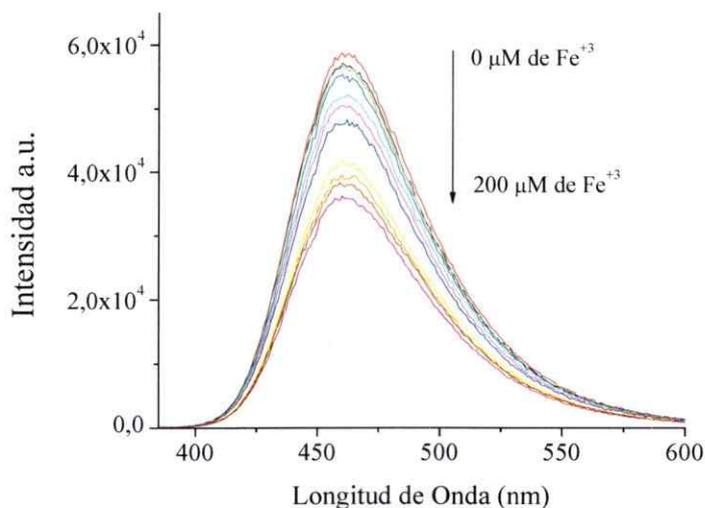


Graf. 17. Espectro de fluorescencia de **Q52** 20 μM con 0-200 μM de Hg^{+2} a 10 minutos, en solución acuosa Buffer HEPES pH 7,2.

Al hacer el estudio de **Q52** con diferentes concentraciones de Fe^{+2} y Fe^{+3} se notó de igual manera como en **Q51** un apagamiento mayor con Fe^{+2} que con Fe^{+3} (Gráficas 18 y 19). En este caso el modo de interacción metal-ligando no está claro.

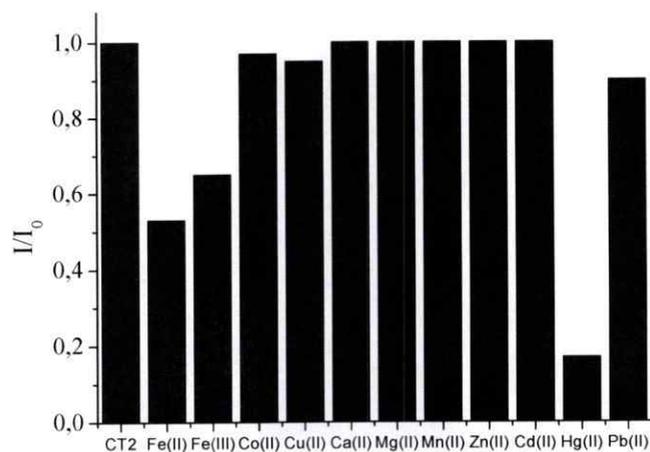


Graf. 18. Espectro de fluorescencia de **Q52** 20 μM con 0-200 μM Fe^{+2} en solución acuosa Buffer HEPES pH 7,2.



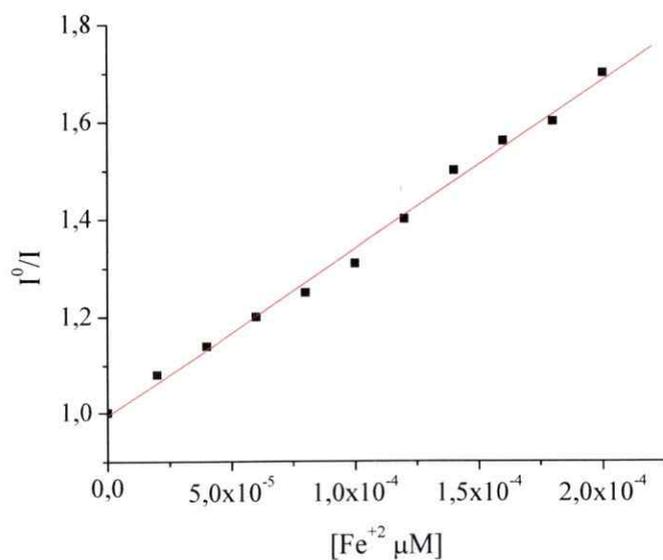
Graf. 19. Espectro de fluorescencia de **Q52** 20 µM con 0-200 µM Fe⁺³ en solución acuosa Buffer HEPES pH 7,2.

Al graficar I/I_0 para **Q52** e iones se encontró que en presencia de Fe⁺² y Fe⁺³ el apagamiento era muy similar al mostrado por el compuesto **Q51**. Esto muestra que una vez más en presencia de Fe⁺² la eficiencia de apagamiento es mucho mayor (Gráfico 20). Sin embargo, hay que resaltar el hecho que en presencia de mercurio existe un apagamiento que alcanza el 12 %, lo que hace que esta molécula sea más selectiva para dicho metal pero a largo tiempo. Esto permitiría proponer para trabajos futuros un estudio más a fondo del comportamiento de esta sonda para eventuales estudios medioambientales.



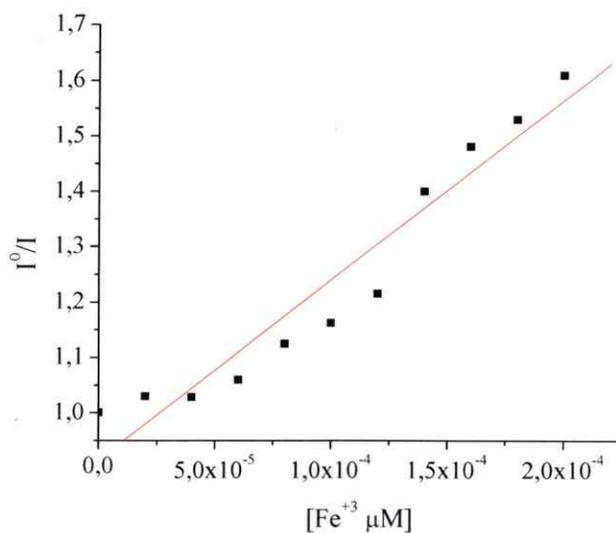
Graf. 20. Análisis de selectividad de iones con **Q52**. La concentración de todos los iones a 200 μM .

Las constantes de Stern-Volmer [87-90] se obtuvieron graficando I^0/I vs. Concentración de Fe^{+2} (Gráfico 21) y Fe^{+3} (Gráfico 22), obteniendo los resultados que se presentan en la Tabla 6. Los resultados encontrados nos dan a conocer que la estequiometría de los complejos formados es 1:1 y que el apagamiento es estático [112].

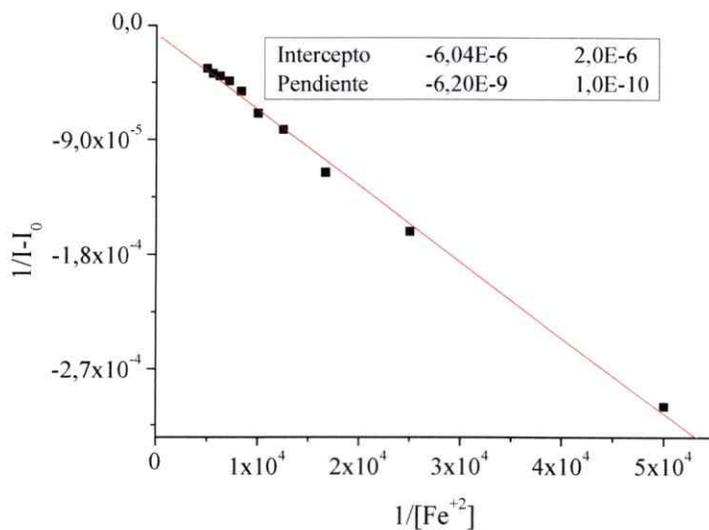


Graf. 21. Gráfico de Stern-Volmer para **Q52** en presencia de Fe^{+2} .

La constante de asociación (K_a) del complejo **Q52**- Fe^{+2} (Tabla 7) se obtuvo a partir de los espectros de fluorescencia utilizando el método de Benesi-Hildebrand (gráfico 23). Los resultados para el complejo **Q52**- Fe^{+3} fueron incalculables debido a errores de medición.



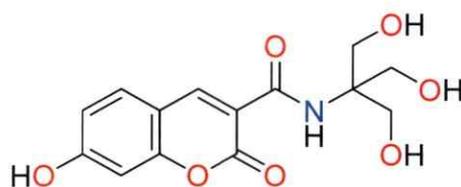
Graf. 22. Gráfico de Stern-Volmer para **Q52** en presencia de Fe^{+3} .



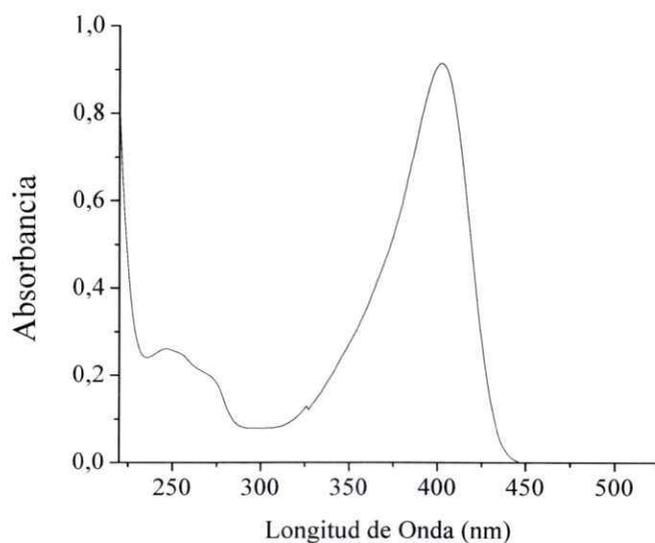
Graf. 23. Gráfico de Benesi-Hildebrand para **Q52** en presencia de Fe^{+2} .

5.2.3. Estudio fotofísico de *N*-(1,3-dihidroxi-2-(hidroximetil)propan-2-il)-7-hidroxi-2-oxo-2*H*-cromen-3-carboxamida (Q53).

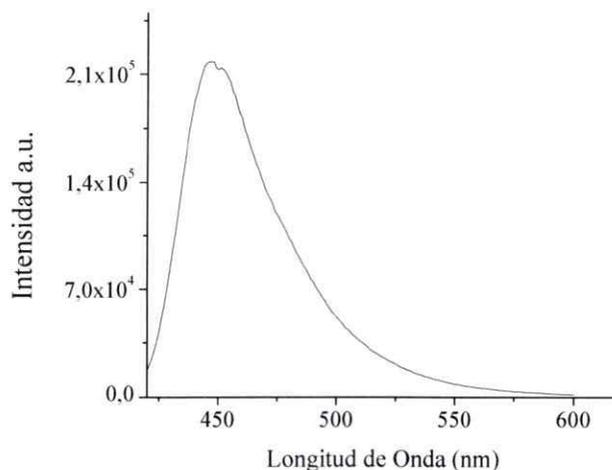
El compuesto **Q53** presenta una banda de absorción a 400 nm (Gráfico 24) y una de emisión a 448 nm (Gráfico 25). Las características espectroscópicas completas se encuentran en la Tabla 5. Cabe resaltar que el comportamiento que presenta **Q53** ante la presencia de Fe^{+2} y Fe^{+3} difiere en cuanto a los desplazamientos de las $\lambda_{\text{máx}}$ de excitación y emisión. En esta molécula disminuye el desplazamiento de Stokes a 2679 cm^{-1} .



Q53

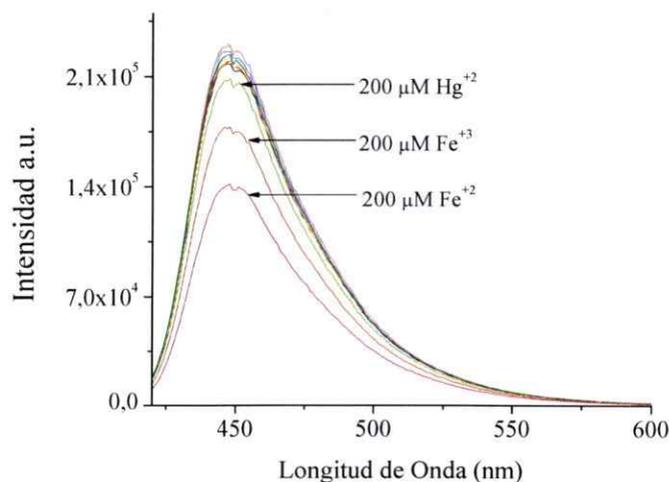


Graf. 24. Espectro de absorción de **Q53** 10 μM en solución acuosa Buffer HEPES pH 7,2.



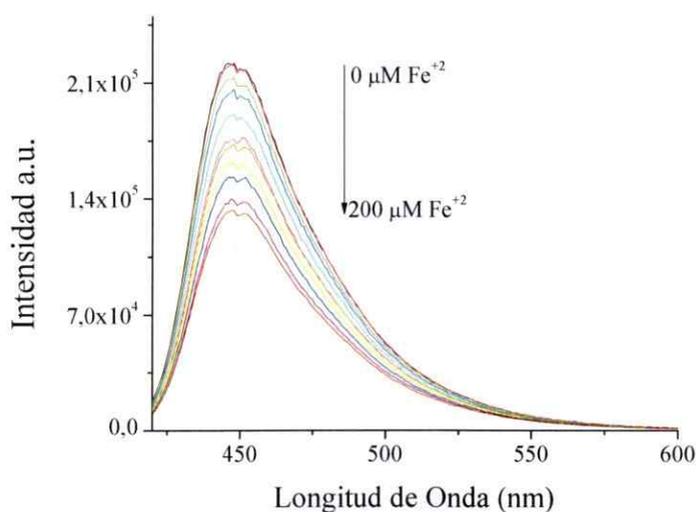
Graf. 25. Espectro de fluorescencia de **Q53** 10 μM en solución acuosa Buffer HEPES pH 7,2.

Al evaluar los efectos de Fe^{+2} , Fe^{+3} y otros iones se demostró que la extinción es muy selectiva a hierro, especialmente a Fe^{+2} (Gráfico 26). La extinción producida por Fe^{+3} presenta el mismo comportamiento a lo mostrado anteriormente en **Q52** y **Q53**. En cuanto a lo mostrado por Hg^{+2} , el efecto es despreciable con respecto al apagamiento producido especialmente por Fe^{+2} .

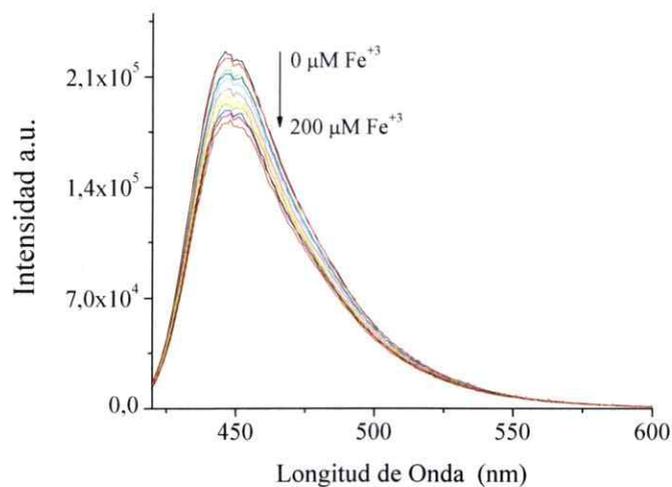


Graf. 26. Espectro de fluorescencia de **Q53** 20 μM con diferentes iones 200 μM en solución acuosa Buffer HEPES pH 7,2.

El estudio con Fe^{+2} y Fe^{+3} (Gráficas 27 y 28) pone de manifiesto nuevamente la selectividad por Fe^{+2} . Resaltando que la intensidad de fluorescencia mostrada por este compuesto es tres veces mayor con respecto a la mostrada por los compuestos anteriores a la misma concentración. Esto se ve reflejado en el rendimiento cuántico $\Phi = 0,56 \pm 0,056$. Este resultado mostrado por **Q53** es muy diferente a los publicados por Jao *et al.* [42], donde informan sobre un compuesto muy similar que sólo difiere de **Q53** al no presentar grupo dadores electrónicos como el OH en C-7, que magnifica la fluorescencia de los compuestos [113-115].

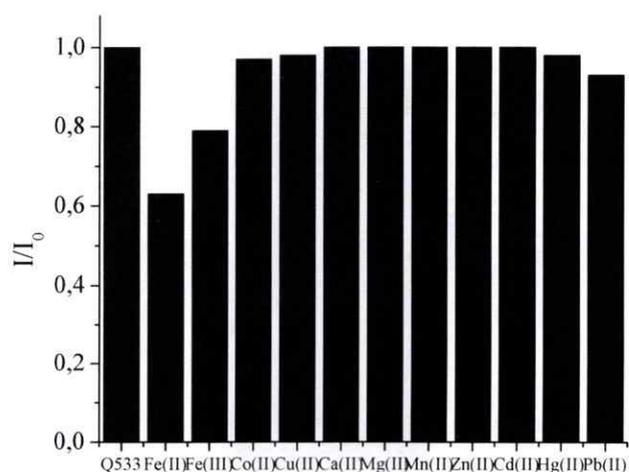


Graf. 27. Espectro de fluorescencia de **Q53** 20 μM con 0-200 μM Fe^{+2} en solución acuosa Buffer HEPES pH 7,2.



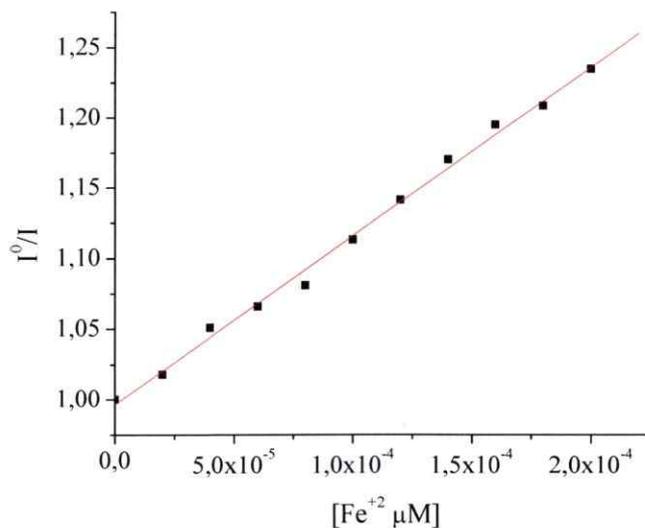
Graf. 28. Espectro de emisión de **Q53** 20 μM con 0-200 μM Fe^{+3} en solución acuosa Buffer HEPES pH 7,2.

Al graficar I/I_0 vs **Q53** e iones se encontró que en presencia de Fe^{+2} el apagamiento era de alrededor de 60 %, mientras que al evaluar el mismo ligando con Fe^{+3} fue del 80 %. Esto muestra una vez más que en presencia de Fe^{+2} el apagamiento de la fluorescencia de estos compuestos es mucho mayor (Gráfica 29),

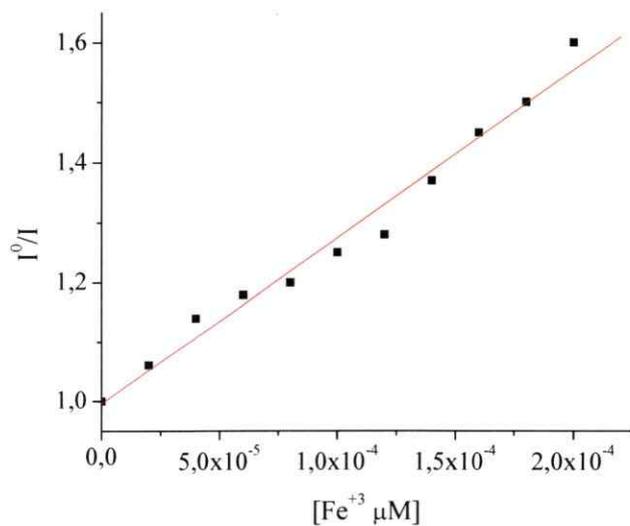


Graf. 29. Análisis de selectividad de iones con **Q53**. La concentración de todos los iones fue 200 μM .

La constante de Stern-Volmer [87-90], se calculó graficando I^0/I vs. concentración para Fe^{+2} y Fe^{+3} (Gráficos 30 y 31), obteniendo los resultados que se presentan en la Tabla 6, que dan a conocer que la estequiometría de los complejos es 1:1 y que el apagamiento es de tipo estático [112].

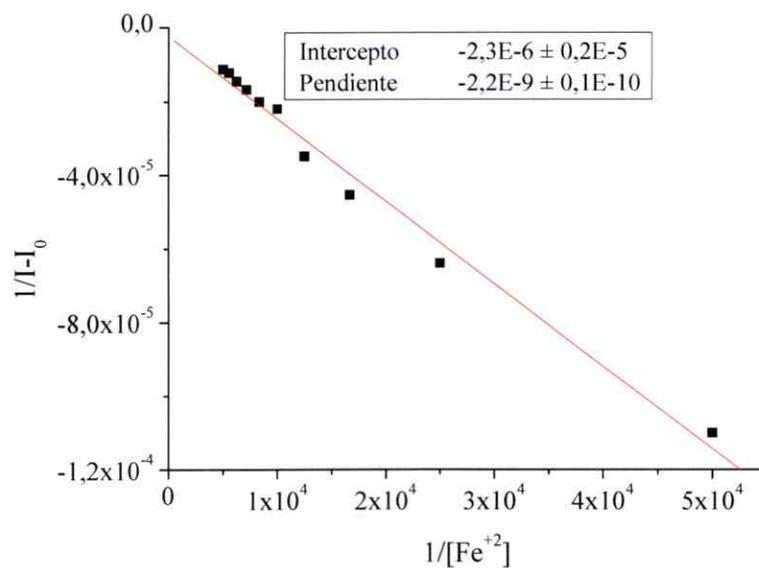


Graf. 30. Gráfico de Stern-Volmer para **Q53** en presencia de Fe^{+2} .

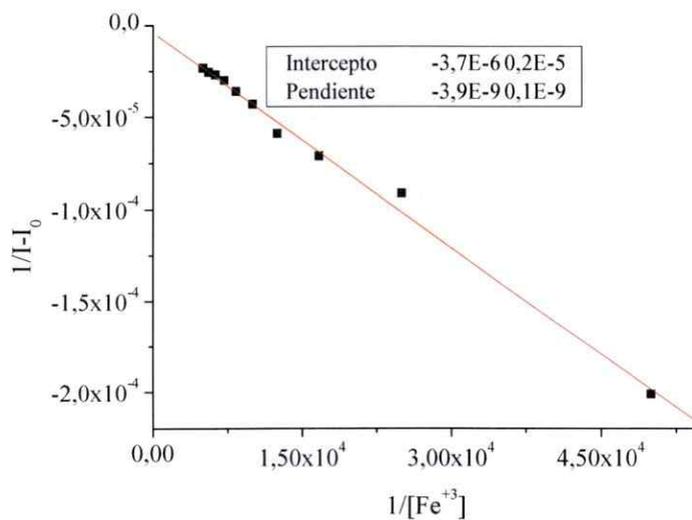


Graf. 31. Gráfico de Stern-Volmer para **Q53** en presencia de Fe^{+3} .

La determinación de la constante de asociación de los complejos **Q53-Fe⁺²** y **Q53-Fe⁺³** (Tabla 7) se obtuvieron a partir de los espectros de fluorescencia, utilizando el método de Benesi-Hildebrand, obteniendo los valores aproximados de Ka (gráficos 32 y 33).



Graf. 32. Gráfico de Benesi-Hildebrand para **Q53** en presencia de **Fe⁺²**.



Graf. 33. Gráfico de Benesi-Hildebrand para **Q53** en presencia de **Fe⁺³**.

compuesto con Hg^{+2} se observó un apagamiento gradual a medida que transcurría el tiempo, el cual se estabilizó al cabo de 20 min.

Tabla 5. Propiedades fotoquímicas de absorción (Abs), fluorescencia (Fluor), coeficiente de extinción molar (ϵ_{max}), rendimiento cuántico (Φ), tiempo de vida media ($\tau/2$) y desplazamiento de Stokes de **Q51**, **Q52** y **Q53**.

Compuesto	Abs λ_{max} (nm)	Fluor λ_{max} (nm)	ϵ_{max} (cm^{-1} M^{-1})	Φ	τ (ns)	Stokes (cm^{-1})
Q51	330	460	17460	0,34±0,03	5,95±0,6	8564
Q52	336	460	4870	0,32±0,03	5,86±5,9	8022
Q53	400	448	28010	0,56±0,06	3,72±3,7	2679

Tabla 6. Valores de Constantes de apagamiento de Stem-Volmer (K_{SV}), tiempo de vida de fluorescencia (τ) y constante de velocidad (k_q) para **Q51** – **Q53**

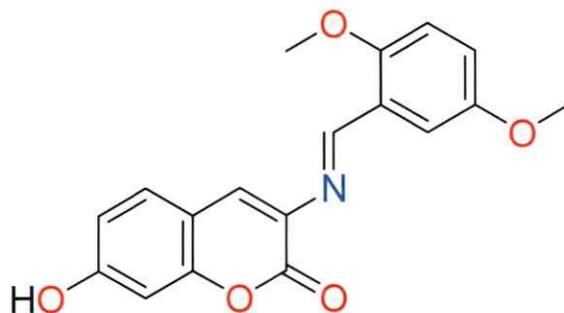
Compuesto	ión	K_{SV} (L mol^{-1})	τ (ns)	$k_q 10^{11}$ ($\text{L mol}^{-1} \text{S}^{-1}$)
Q51	Fe^{+2}	3481 ± 64	5,98 x 10 ⁻⁹	5,82 ± 4 x 10 ¹²
	Fe^{+3}	2400 ± 90	5,98 x 10 ⁻⁹	4,01 ± 3 x 10 ¹²
Q52	Fe^{+2}	3450 ± 85	5,92 x 10 ⁻⁹	5,82 ± 4 x 10 ¹²
	Fe^{+3}	N.C.	5,92 x 10 ⁻⁹	N.C.
Q53	Fe^{+2}	2795 ± 136	3,87 x 10 ⁻⁹	7,2 x 10 ¹¹ ± 5 x 10 ¹²
	Fe^{+3}	1557 ± 64	3,87 x 10 ⁻⁹	3,1 x 10 ¹¹ ± 2 x 10 ¹²

Tabla 7. Valores de la constante de asociación (K_a) con Fe^{+2} y Fe^{+3}

, Q51 – Q53.

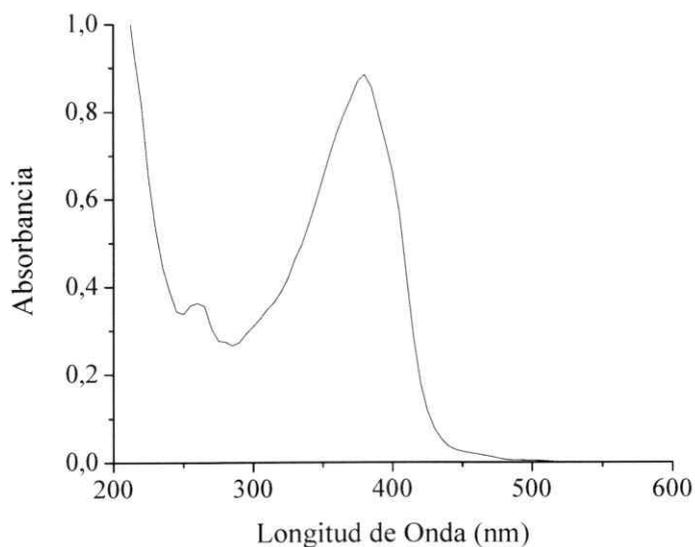
Compuesto	Ión	K_a (M^{-1})
Q51	Fe^{+2}	$1,48 \times 10^3 \pm 100$
	Fe^{+3}	$1,02 \times 10^3 \pm 90$
Q52	Fe^{+2}	$1,01 \times 10^3 \pm 85$
	Fe^{+3}	N.C.
Q53	Fe^{+2}	$1,05 \times 10^3 \pm 96$
	Fe^{+3}	$9,5 \times 10^2 \pm 54$

5.2.4. Estudio fotofísico de (3E)-3-(2,5-dimetoxibencilidenimino)-7-hidroxi-2H-cromen-2-ona (BS-7).

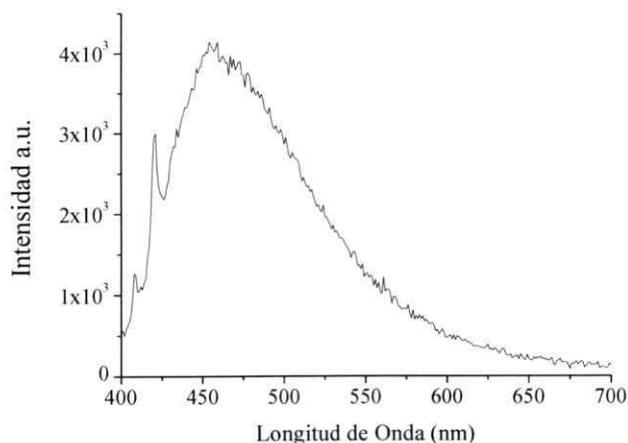


BS-7

El compuesto **BS-7** muestra un espectro de absorción con una λ_{\max} de 380 nm atribuible a transiciones $\pi-\pi^*$ (Gráfico 34). Su espectro de emisión presenta un λ_{\max} a 460 nm (Gráfico 35), con un corrimiento de Stokes de 4576 cm^{-1} .

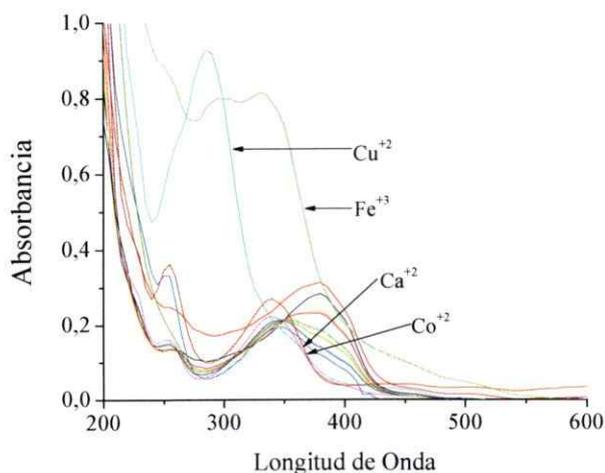


Graf. 34. Espectro de absorción de **BS-7** 10 μM en acetonitrilo.

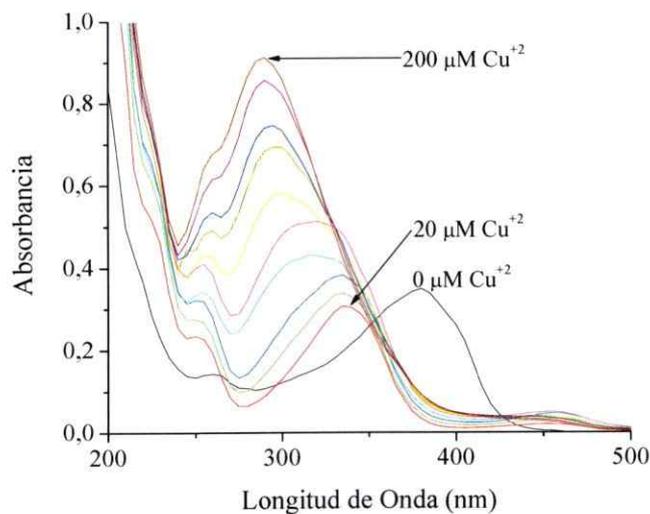


Graf. 35. Espectro de fluorescencia de **BS-7** 20 μM en acetonitrilo.

Los espectros de UV-Vis registrados con diferentes iones a una concentración 200 mM (Gráfico 36) muestran diferencias marcadas respecto del espectro original con Ca^{+2} , Co^{+2} , Cu^{+2} y Fe^{+3} . La banda de absorción a 380 nm mostró desplazamiento del máximo de absorción al azul (hasta 340 nm) al adicionarle los iones Fe^{+3} , Ca^{+2} , Co^{+2} y Cu^{+2} . El gráfico 36 muestra estos efectos. El gráfico 37 muestra la dependencia del efecto del Cu^{2+} de la concentración del ion.

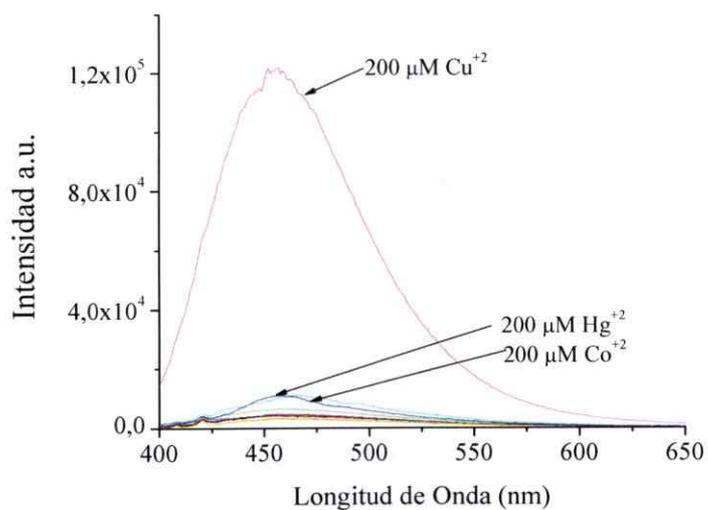


Graf. 36. Espectros de absorción de **BS-7** 10 μM con diferentes iones 200 μM en acetonitrilo.

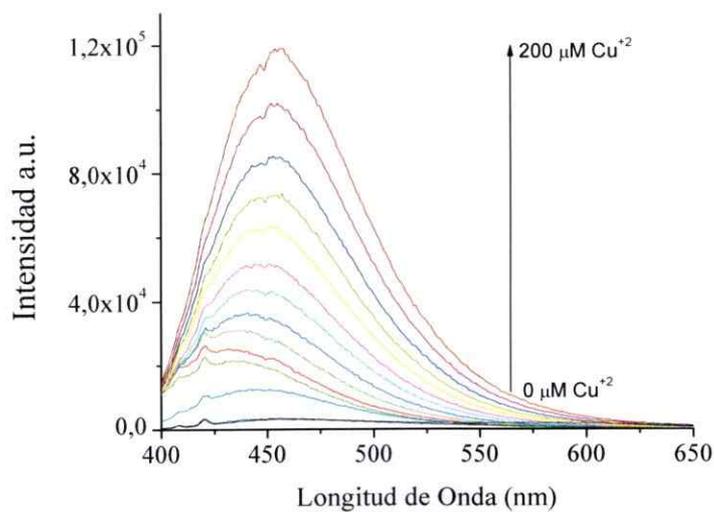


Graf. 37. Espectros de absorción de **BS-7** 10 μM con Cu⁺² 0- 200 μM en acetnitrilo.

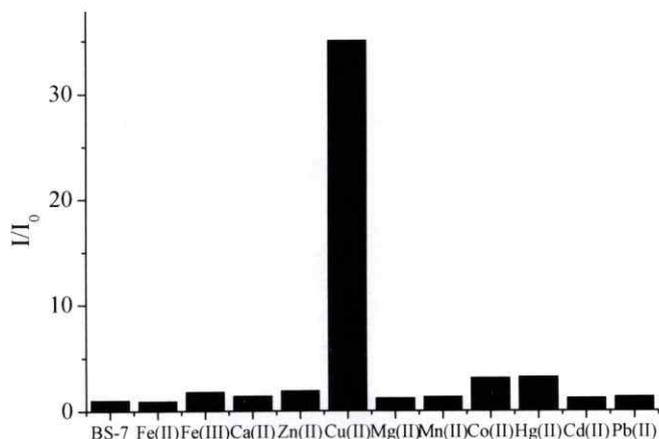
Hay que anotar que el sulfato férrico amoniacal dodecahidratado (Fe⁺³) en solución absorbe en la región de los 350 nm y puede estar influenciando el aumento de la absorbancia a medida que la banda se desplaza al azul. Excitando a 380 nm, donde solamente Cu⁺² tiene una débil absorción, el espectro de fluorescencia mostró un aumento de la intensidad cercano al 95 %, mostrando una notoria selectividad para Cu⁺² (Gráficos 38, 39 y 40). También se comprobó que la adición de Cu⁺² permite determinar colorimétricamente la presencia del metal incluyendo muy bajas concentraciones. Además, el aumento de la intensidad de fluorescente por agregado de Cu²⁺ es claramente perceptible a simple vista bajo una lámpara de UV (Figura 12).



Graf. 38. Espectro de fluorescencia de **BS-7** $20 \mu\text{M}$ con diferentes iones $200 \mu\text{M}$ excitando a 380 nm en acetonitrilo.



Graf. 39. Espectro de fluorescencia de **BS-7** $20 \mu\text{M}$ con $0\text{-}200 \mu\text{M Cu}^{+2}$ excitando a 380 nm en acetonitrilo.



Graf. 40. Análisis de selectividad de iones con **BS-7**. La concentración de todos los iones fue 200 μM .

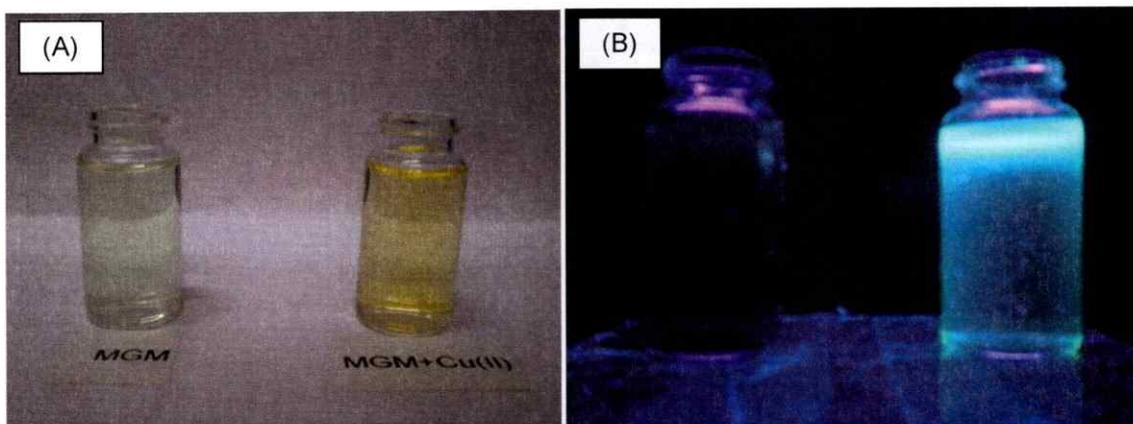
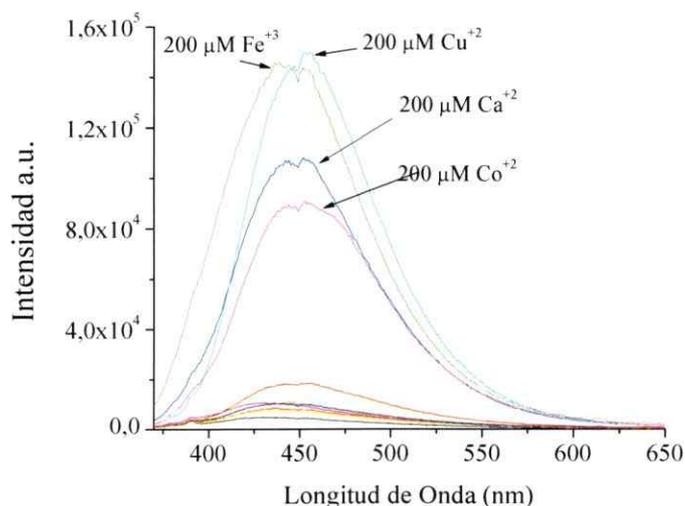


Fig. 12. (A) Fotografía del cambio de color de una solución de **BS-7** en presencia de Cu^{+2} en acetonitrilo. (B) Fotografía de la fluorescencia de **BS-7** en ausencia y presencia de Cu^{+2} en acetonitrilo.

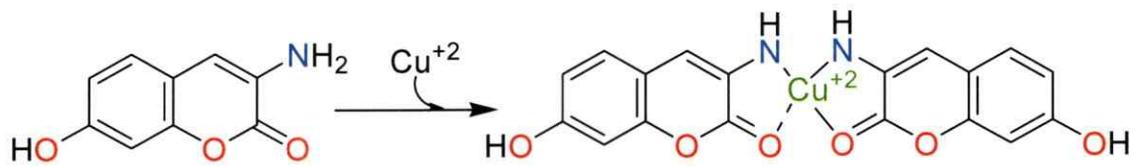
Se realizó un segundo experimento, excitando a 350 nm, longitud de onda donde se da el cruce de bandas, observándose que la adición de los diferentes iones origina un aumento en la intensidad de fluorescencia especialmente con Fe^{+3} , Ca^{+2} , Co^{+2} y Cu^{+2} . Asimismo diferentes concentraciones de Cu^{+2} el espectro mostró un corrimiento de banda y un comportamiento inusual. Al adicionar Cu^{+2} 20 μM se observó un aumento en la intensidad de la fluorescencia a 407 nm. Sin embargo, con Cu^{+2} a 40, 60 y 80 μM se observó una disminución de la intensidad de la emisión con corrimiento de la banda al rojo y al

seguir aumentando la concentración del metal a 100, 120, 140, 160, 180 y 200 μM , se observó un aumento de la intensidad de la fluorescencia a 450 nm.

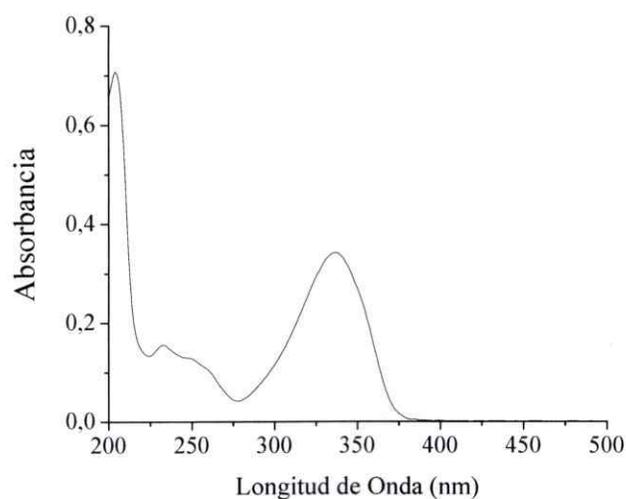


Graf. 41. Espectro de fluorescencia de **BS-7** 20 μM con 0-200 μM Cu^{+2} excitando a 350 nm en acetonitrilo.

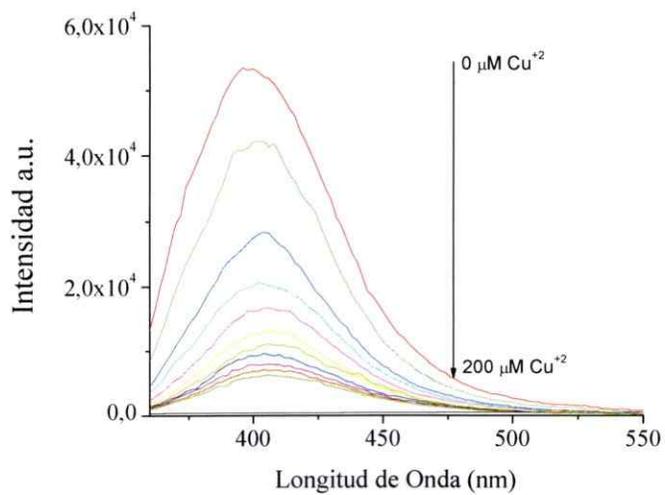
Se pensó que podría existir una reacción de hidrólisis de la imina catalizada por Cu^{+2} . Por tanto se procedió a realizar un tercer experimento utilizando 3-amino-7-hidroxicumarina, precursor de estos compuestos en estudio. Éste mostró que dicho compuesto presenta una banda de absorción a 336 nm (Gráfico 42) y que al ser excitado dio una banda de emisión en 400 nm. Posteriormente se adicionó distintas concentraciones de Cu^{+2} y se determinó que existe algún tipo de reacción molecular del fluoróforo con Cu^{+2} (0-200 μM) (Esquema 6), mostrando un apagamiento de la fluorescencia (Gráfico 43). El apagamiento mostrado por **63** en presencia de Cu^{+2} (0-200 μM) indica que el comportamiento mostrado por **BS-7** es propio de la molécula y no se debe a algún artefacto generado.



Esquema 6. Modelo de quelación de **63** con Cu^{2+} .



Graf. 42. Espectro de absorción de **63** 10 μM en acetonitrilo.



Graf. 43. Espectro de fluorescencia de **63** 10 μM con 0-200 μM Cu^{2+} en acetonitrilo.

Seguidamente se hizo un estudio de ^1H RMN en ausencia y presencia del metal (Figura 13) para intentar determinar qué heteroátomos participan en el sitio de quelación. Con los resultados obtenidos se dedujo que el sitio de unión está dado por el carbonilo de la α -pirona y nitrógeno del grupo imino, por los desplazamientos de las señales correspondientes a protones cercanos al sitio de quelación: el protón del carbono imínico se desplaza a campo bajo y el H-4 de la cumarina se desplaza a campo alto. El metoxilo en la posición *orto* del anillo aromático con respecto al enlace imino no sufre modificación importante en su desplazamiento, lo que nos permite concluir que dicho sustituyente no se encuentra involucrado en la quelación. En el esquema 7 se muestra el posible sitio de quelación y los heteroátomos involucrados.

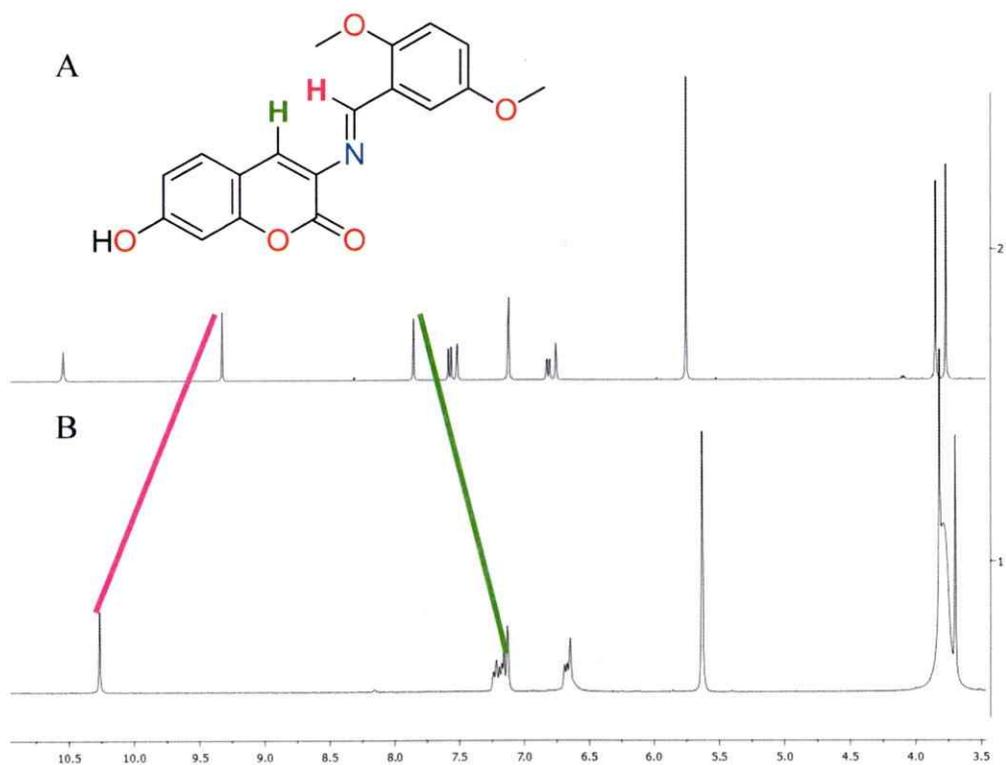
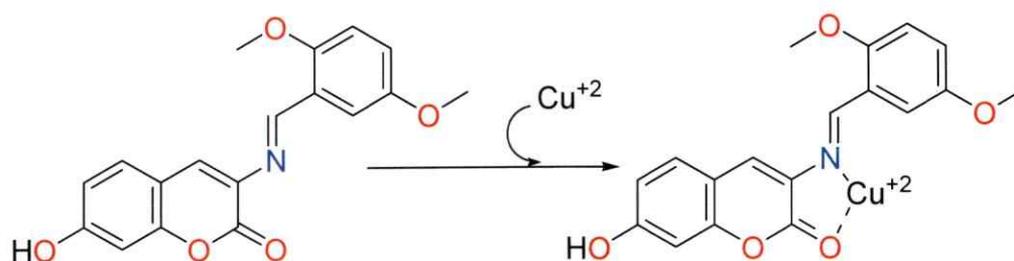


Fig. 13. (A) Espectro de ^1H RMN de BS-7 en ausencia de Cu^{+2} , (B) espectro de BS-7 en presencia de Cu^{+2} .

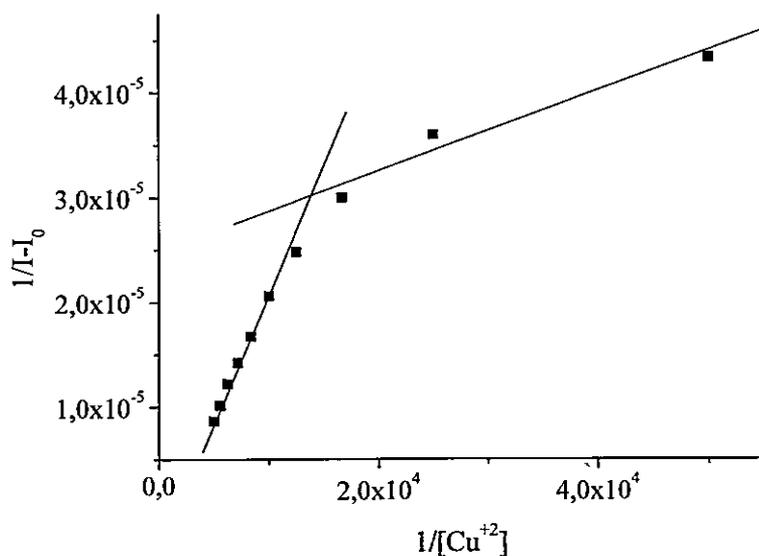


Esquema 7. Sitio de quelación de Cu^{2+} en el compuesto **BS-7**.

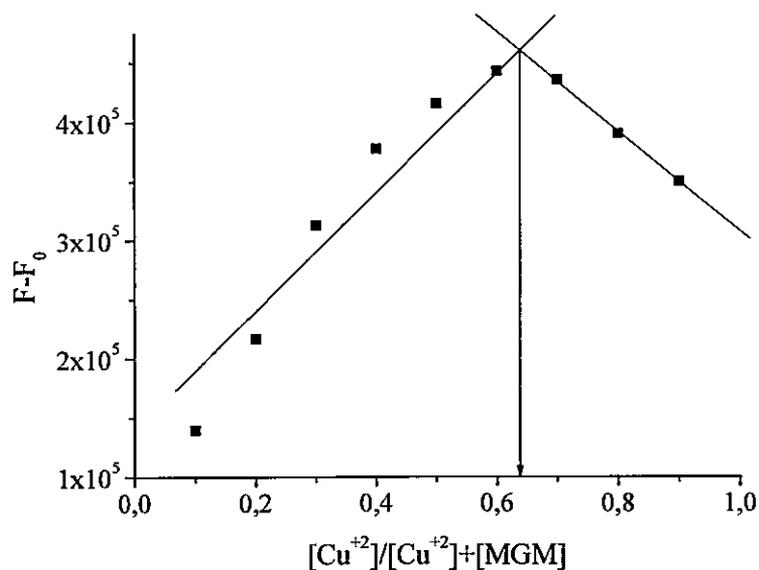
Tabla 8. Propiedades fotofísicas del compuesto **BS-7**

Compuesto	Abs λ_{max} (nm)	Fluor λ_{max} (nm)	ϵ_{max} ($\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$)	Φ	τ (ns)
BS-7	380	460	30220	0.0003 ± 0.00003	1,82

La constante de asociación no se determinó considerando que el gráfico (Gráfico 44) presenta más de una pendiente, lo que presume que podría tratarse de una estequiometría de asociación 2:1. Al hacer el estudio de la estequiometría utilizando el método gráfico de Job (Gráfico 45) se obtuvo un valor de $X=0,63$, propio de una relación 2:1 (Esquema 8.) [116].

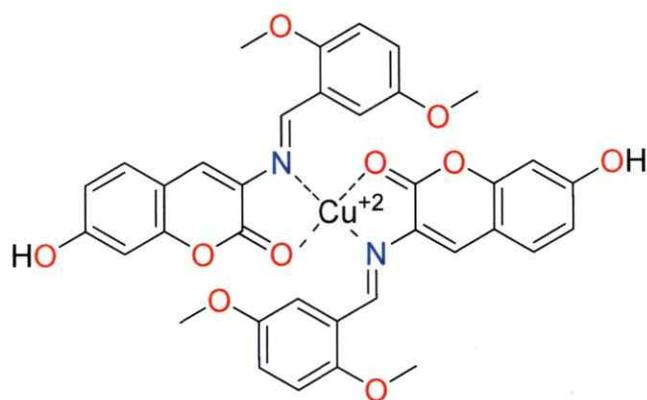


Graf. 44. Diagrama Benesi-Hildebrand de BS-7 con Cu^{+2} .



Graf. 45. Diagrama de Job de cambios en la intensidad de fluorescencia variando la relación molar de BS-7 y Cu^{+2} . ($[BS-7 + Cu^{+2}] = 100,0 \mu M$ en acetonitrilo/ H_2O).

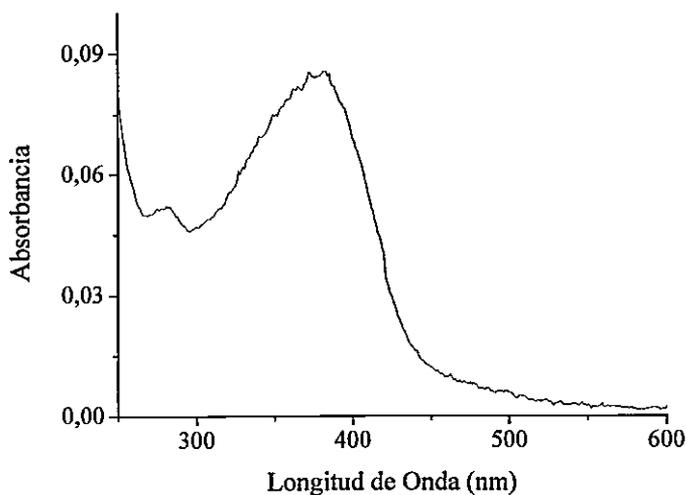
Los resultados de las moléculas BS-1 – BS-6 se encuentran en los apéndices.



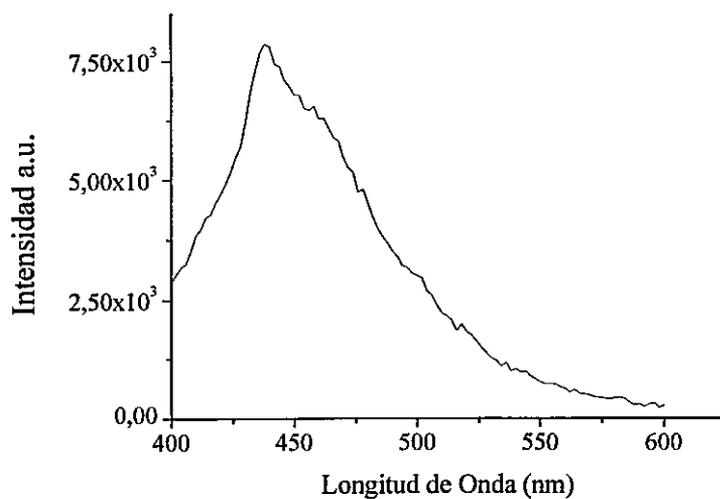
Esquema 8. Estequiometría de quelación de Cu^{+2} con BS-7.

5.2.5. Estudio fotofísico de 3-cinamoil-7-metoxi-2H-cromen-2-ona (Ch-C1).

El compuesto Ch-C1 presenta una banda de absorción a 3588 cm^{-1} (Gráfico 46), y un espectro de emisión con λ_{max} 430 nm (Gráfico 47), con un desplazamiento de Stokes de 90 nm.



Graf. 46. Espectro de absorción de Ch-C1 $5\text{ }\mu\text{M}$ en solución acuosa Buffer HEPES pH 7,2.



Graf. 47. Espectro de emisión de Ch-C1 $5\text{ }\mu\text{M}$ en solución acuosa Buffer HEPES pH 7,2.

El rendimiento cuántico de fluorescencia (Φ) mostrado es muy bajo (0.00083 ± 0.0001). Pero al adicionar 10 equivalentes de Cys o GSH el rendimiento cuántico se incrementó a 0.0013 ± 0.00013 y 0.0010 ± 0.0002 respectivamente. La adición de Michael aducida para explicar este efecto fue corroborada por espectroscopia de ^1H RMN, en ausencia y presencia del 2-mercaptoetanol (ME). Como se muestra en la Figura 14, tras la adición del ME las resonancias de los protones vinílicos (Hb y Ha en δ 7,80 y 7,74 ppm, respectivamente) desaparecen, y al mismo tiempo dos nuevas señales (tripletes), asignadas a los protones metilénicos del tioéter, surgen a δ 4,74 y 4,46 ppm, respectivamente, un resultado que es consecuente con la formación del aducto de **Ch-C1**-ME.

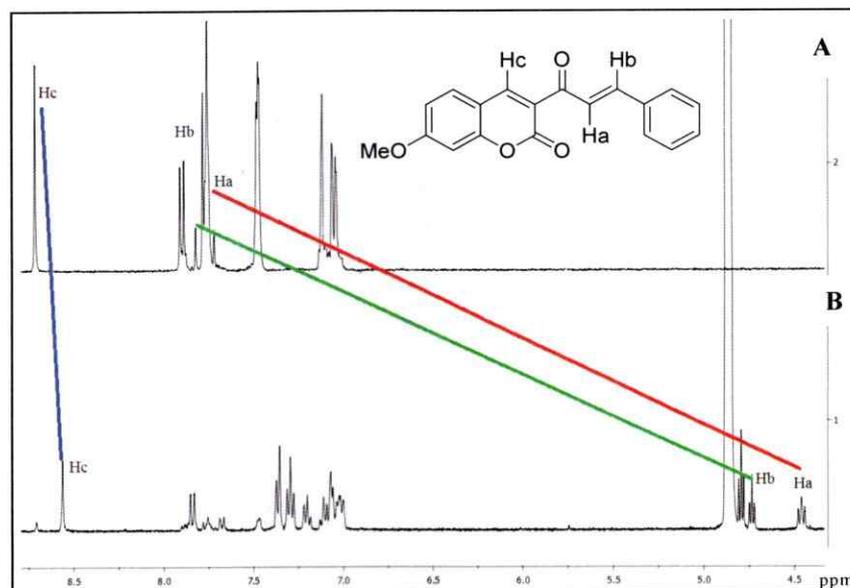


Fig. 14. Cambio en el espectro parcial de ^1H RMN **Ch-C1** (20 mM) con adición de ME (10 equiv.) en $\text{DMSO}-d_6$ at 25 °C. (A) Solamente **Ch-C1**; (B) **Ch-C1** + ME, 10 min.

5.3. APLICACIONES BIOLÓGICAS

5.3.1. *N*-(1,3-Dihidroxi-2-(hidroximetil)propan-2-il)-2-(7-hidroxi-2-oxo-2*H*-cromen-4-il)acetamida (Q51).

En un lector de fluorescencia en microplacas, células SH-SY5Y tratadas con 20 μM ácido nitrilotriacético- Fe^{+3} (Fe-NTA) por 24 hr fueron incubadas, seguidamente por 20 min con **Q51** (5 μM). En este punto se hizo una medición de la fluorescencia basal de la sonda **Q51** (Figura 15(a)). Al constatar las lecturas se adicionó a la placa un quelante de mayor afinidad, en este caso bipyridilo (15 μM) (Figura 15(b)), con lo cual regresó la intensidad de la fluorescencia a su valor anterior, al realizar una adición posterior de sulfato ferroso amoniacal hexahidratado (FAS)(20 μM) se observó un nuevo apagamiento (Figura 15(c)).

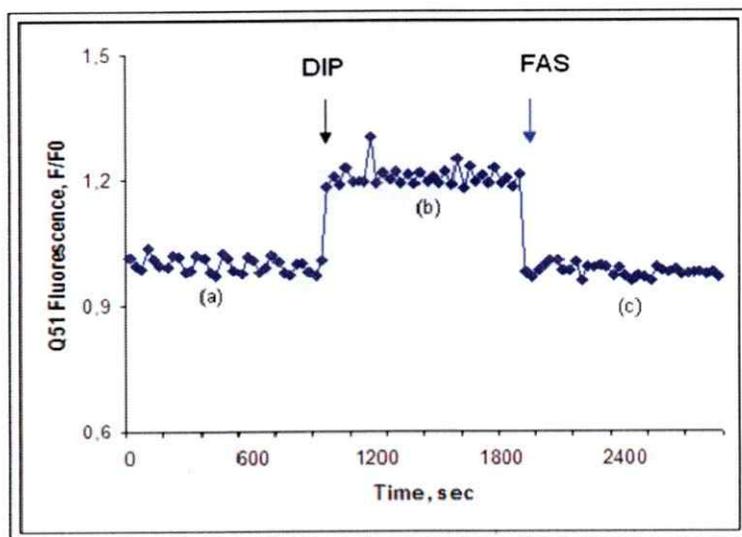


Fig. 15. Cambio de fluorescencia del quelante **Q51** en células SH-SY5Y.

De igual manera se procedió a ensayar el efecto que podría tener la presencia de Zn^{+2} y Cu^{+2} . Estos dos cationes se tomaron como modelos por tener una gran importancia biológica y ser los dos metales que, después del hierro, se encuentran en mayor abundancia en las células. Primero se determinó la fluorescencia basal de la sonda **Q51**

(Figura 16(a)) que se tomó como control. Seguidamente se adicionó Zn^{+2} (200 μM) (Figura 16(b)) no observándose cambio alguno. El ensayo se repitió de igual manera con Cu^{+2} , determinando la ausencia de efecto (Figuras 17(a) y 17(b)).

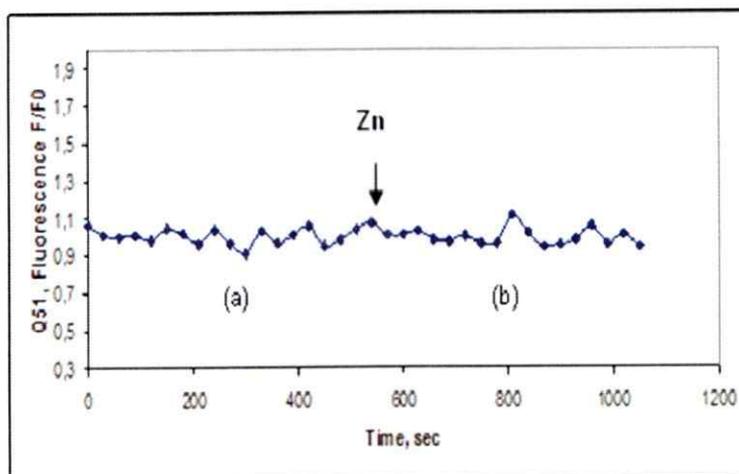


Fig. 16. Efecto de Zn^{+2} sobre la fluorescencia del quelante **Q51** en células SH-SY5Y.

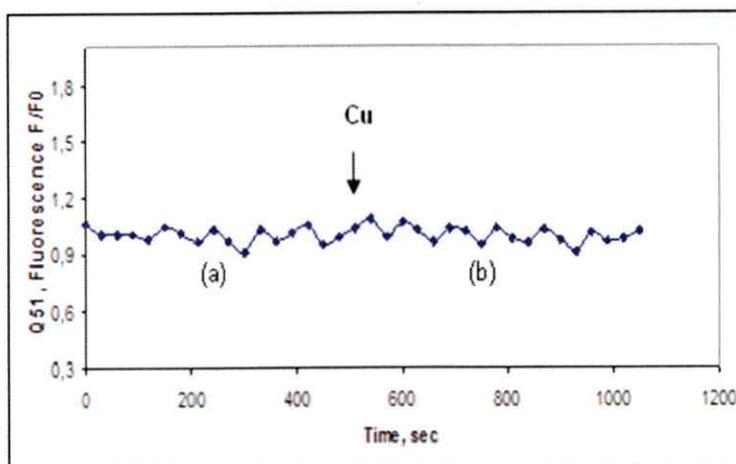


Fig. 17. Efecto de Cu^{+2} sobre la fluorescencia del quelante **Q51** en células SH-SY5Y.

Los resultados obtenidos permitieron diseñar un ensayo con líneas de células SH-SY5Y. Éstas primero fueron tratadas con 20 μM Fe-NTA por 24 h. Seguidamente fueron incubadas por 20 min con **Q51** (5 μM). Se observó la fluorescencia basal de la sonda (Figura 18(A)), confirmando que dicho compuesto puede permear la membrana celular y

depositarse en el interior de las células. Después de agregar bipyridilo aumentó la fluorescencia (Figura 18(B)) y para contrastar con el experimento anterior finalmente se adicionó FAS (Figura 18(C)), observándose que al interior de las células la intensidad fluorescente se apagaba nuevamente. Es importante anotar que los resultados obtenidos con el microscopio de epifluorescencia se correlacionan con los obtenidos en el estudio fotofísico, debido a que el apagamiento en presencia de Fe^{+2} en ambos casos es mayor que en presencia de Fe^{+3} (gráfico 3).

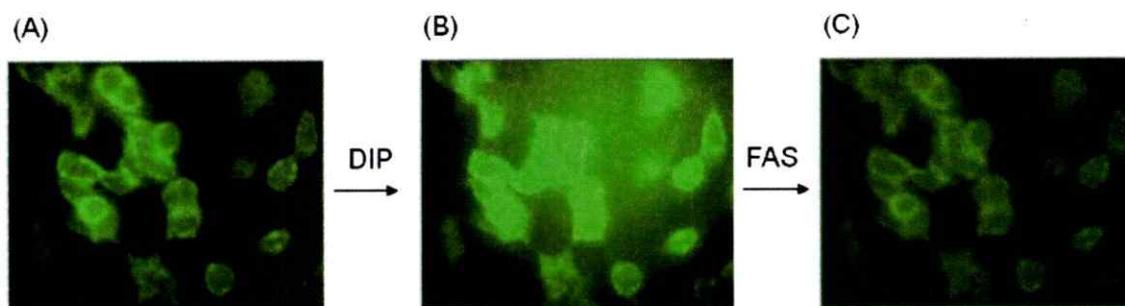


Fig. 18. Cambio de fluorescencia de células SH-SY5Y tratadas con **Q51**, diferentes fuentes de hierro y bipyridilo. Objetivo 63x.

Al observar detalladamente las células marcadas se puede determinar que la sonda se acumula en sitios específicos, lo que se puede relacionar con organelos como la mitocondria (Figura 19). Para confirmar esta hipótesis se realizó un ensayo donde se tiñeron las células con Mito-tracker, compuesto específico para marcaje fluorescente de mitocondrias (Figura 20A). Seguidamente se adicionó el compuesto **Q51** (Figura 20B) y posteriormente se superpusieron las imágenes observándose que las estructuras donde se deposita el Mito-tracker son las mismas que concentran la sonda, lo que fue comprobado por el color obtenido al co-localizar las dos imágenes (Figura 20C).

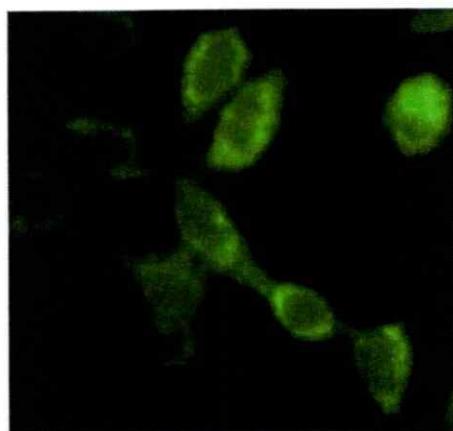


Fig. 19. Células SH-SY5Y con **Q51** (5 μ M), objetivo 63X.

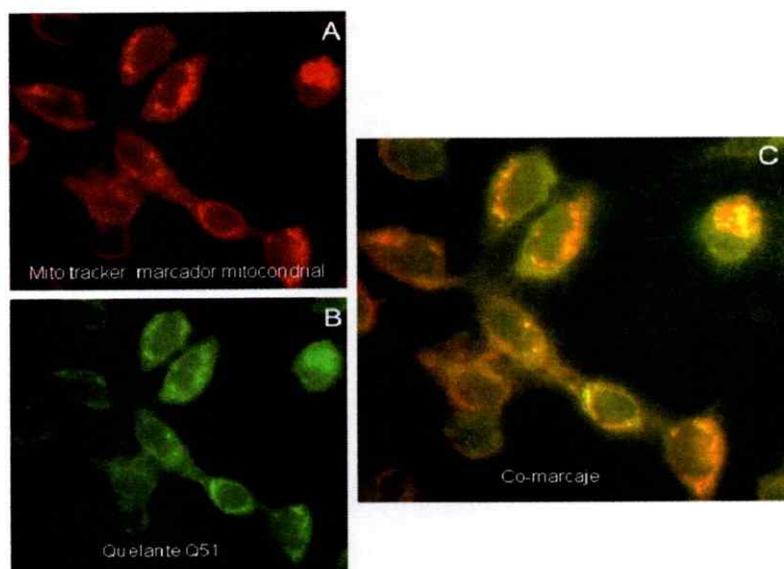


Fig. 20. (A) Células SH-SY5Y tratadas con Mito-tracker, (B) Células SHSY-5Y tratadas con **Q51** (5 μ M), (C) Co-marcaje. Objetivo 63X.

Estos ensayos permitieron confirmar que el compuesto **Q51** puede permear la membrana celular y, lo más importante, se acumula en la mitocondria. Otros ensayos hechos a diferentes concentraciones muestran que el compuesto 0,5 μ M permea la membrana celular y se aloja en el citoplasma, pero su acumulación en la mitocondria es baja (Figura 21A). Al aumentar la concentración a 1,0 μ M (Figura 21B) se observa un leve aumento en la intensidad de la fluorescencia, pero al adicionar 5 μ M de **Q51** la

intensidad en las mitocondrias se hace muy notable (Figura 21C). Esto demuestra que esta concentración es la más adecuada para desarrollar este tipo de ensayos con la molécula en mención.

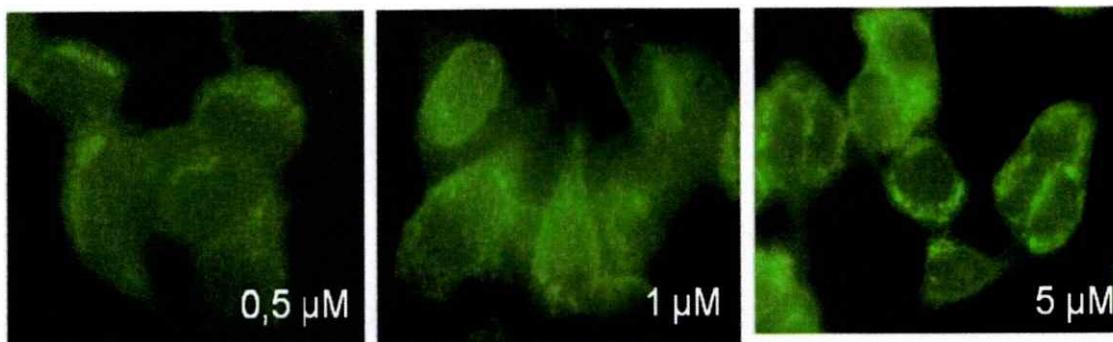


Fig. 21. (A) Células SH-SY5Y tratadas con diferentes concentraciones de Q51. Objetivo 63x.

5.3.2. 2-Amino-3-hidroxi-2-(hidroximetil)propil-2-(7-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-4-il)acetato (Q52).

Al igual que el compuesto Q51, su isómero Q52 fue probado mostrando una actividad muy parecida. Al tratar las células SH-SY5Y con 20 μM Fe-NTA por 24 h y posteriormente incubarlas por 20 min con Q52 (5 μM), se determinó su fluorescencia basal (Figura 22(a)), seguidamente al agregar bipyridilo (15 μM) se notó un aumento en la intensidad de su fluorescencia (Figura 22(b)), y al suministrarle una fuente de Fe^{+2} como FAS (20 μM), nuevamente se observó un apagamiento (Figura 22(c)).

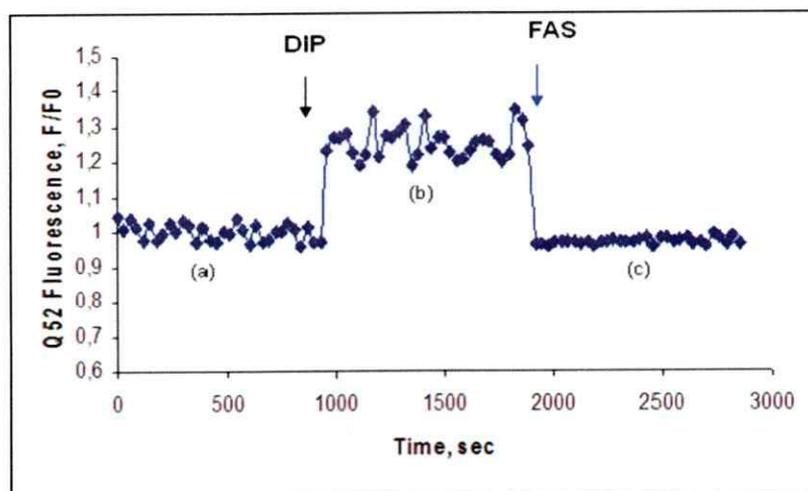


Fig. 22. Cambios de fluorescencia del quelante **Q52** en células SH-SY5Y.

El ensayo *in vivo* muestra que las células SH-SY5Y responden de manera similar a lo que se observa con el compuesto **Q51**. Siguiendo el mismo protocolo, se obtuvieron las Figuras 23(A), 23(B) y 23(C). También con **Q52** los resultados obtenidos con el microscopio de epifluorescencia se correlacionan con los obtenidos en el estudio fotofísico, debido a que el apagamiento en presencia de Fe^{+2} en ambos casos es mayor que en presencia de Fe^{+3} (gráfico 3).

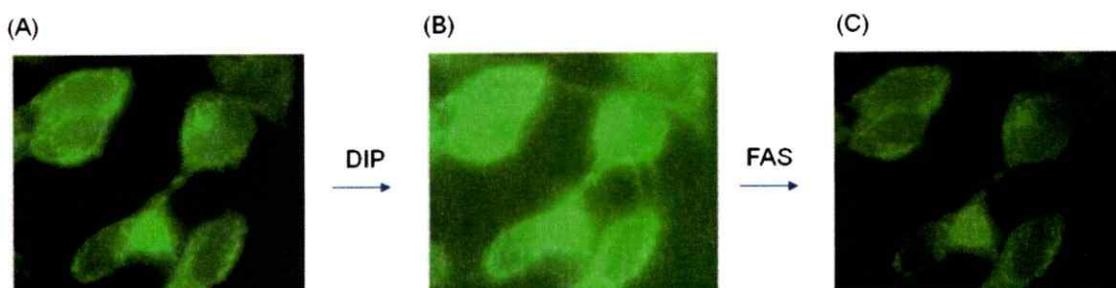


Fig. 23. Cambio de fluorescencia de células SH-SY5Y tratadas con **Q51**, diferentes fuentes de hierro y bipyridilo. Objetivo 63X.

Las Figuras 24, 25A, B y C muestran que este compuesto también puede acumularse en la mitocondria.

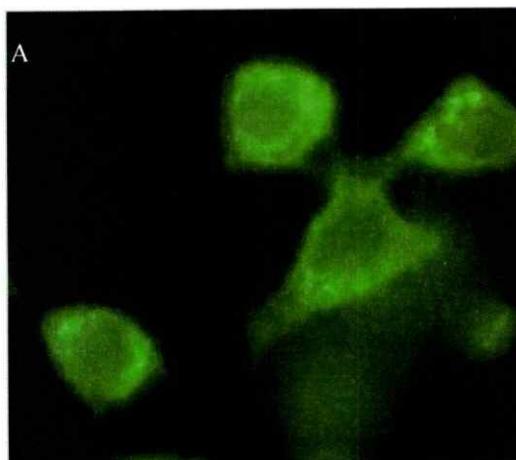


Fig. 24. Células SH-SY5Y con **Q52** (5 μ M), objetivo 63X.

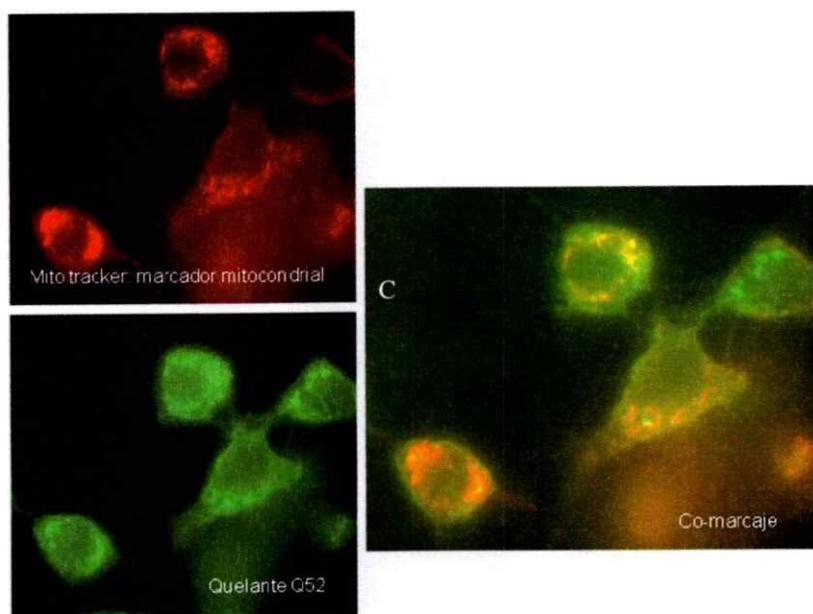


Fig. 25. (A) Células SH-SY5Y tratadas con Mito-tracker, (B) Células SH-SY5Y tratadas con **Q52** (5 μ M), (C) Co-marcaje. Objetivo 63X.

5.3.3. *N*-(1,3-Dihidroxi-2-(hidroximetil)propan-2-il)-7-hidroxi-2-oxo-2*H*-cromen-3-carboxamida (Q53).

El compuesto **Q53** mostró resultados muy similares a los compuestos **Q51** y **Q52** (Figuras 26(a), 26(b) y 26(c)). El mismo ensayo se realizó con Zn^{+2} y Cu^{+2} , (Figuras 27(a) y (b), 28(a) y (b)).

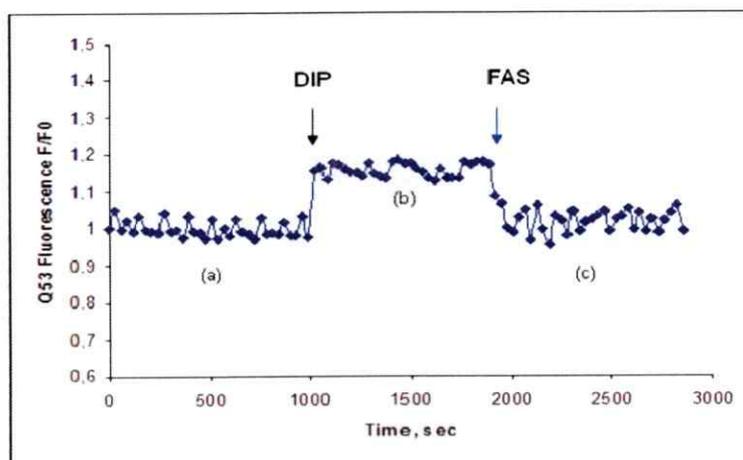


Fig. 26. Cambio de fluorescencia del quelante **Q53** en células SH-SY5Y.

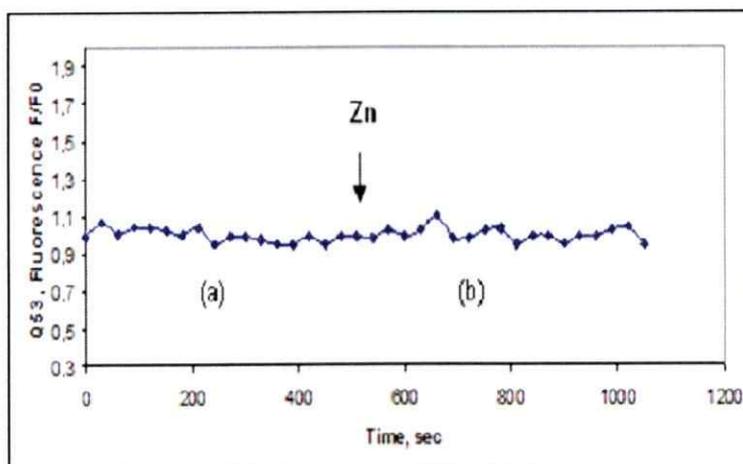


Fig. 27. Efecto de Zn^{+2} sobre la fluorescencia del quelante **Q53** en células SH-SY5Y.

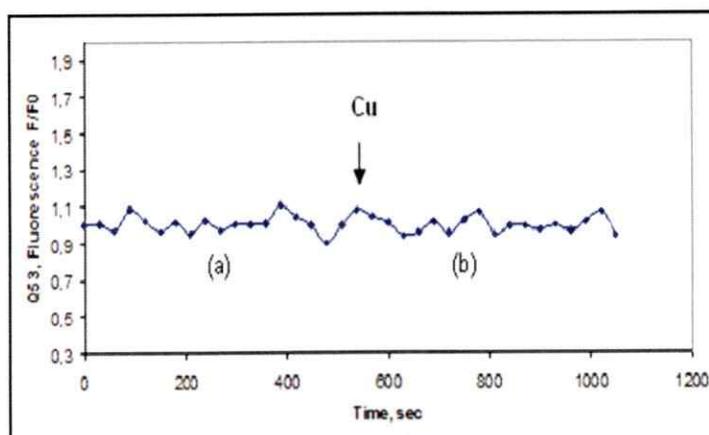


Fig. 28. Efecto de Zn^{+2} sobre la fluorescencia del quelante **Q53** en células SH-SY5Y.

Siguiendo el mismo protocolo que para **Q51** y **Q52** se obtuvieron las Figuras 29(A) (B) y (C). También con **Q53** los resultados obtenidos con el microscopio de epifluorescencia se correlacionan con los obtenidos en el estudio (gráfico 3).

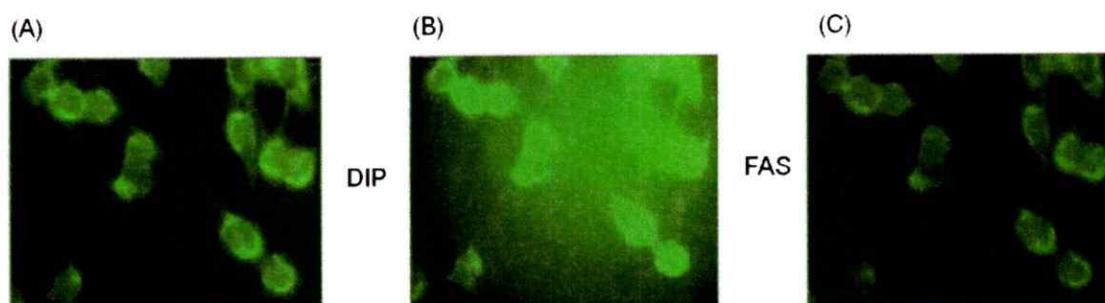


Fig. 29. Cambio de fluorescencia de células SH-SY5Y tratadas con **Q53**, diferentes fuentes de hierro y bipyridilo. Objetivo 63X.

En las células teñidas con **Q53** al igual que las sondas anteriores se determinó que hay acumulación en el citoplasma, pero ésta se da en mayor proporción en la mitocondria (Figura 30, Figuras 31A, B y C).

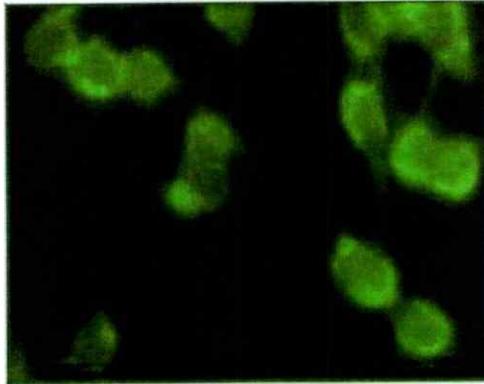


Fig. 30. Células SH-SY5Y con **Q53** (5 μ M), objetivo 63X.

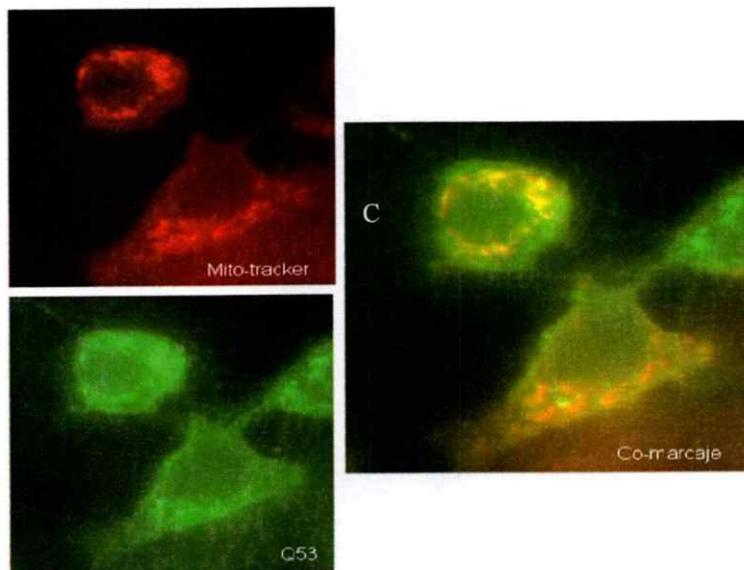


Fig. 31. (A) Células SH-SY5Y tratadas con Mito-tracker, (B) Células SH-SY5Y tratadas con **Q52** (5 μ M), (C) Co-marcaje. Objetivo 63X.

5.3.4. (3E)-3-(2,5-Dimetoxibencilidenamino)-7-hidroxi-2H-cromen-2-ona (BS-7).

La sonda **BS-7** se probó como sensor de Cu^{+2} . Para el desarrollo de un ensayo utilizando como modelo biológico células SH-SY5Y, éstas fueron incubadas con la sonda (10 μM , 20 min), posteriormente se lavaron y su fluorescencia basal fue medida (Figura 32(A)). Después, las células se incubaron con Cu^{+2} -His (200 μM , 15 min) notándose un incremento en la fluorescencia (Figura 32(B)), la que fue medida en lector fluorescente de microplacas y por microscopía epifluorescente. En este último ensayo se observó como aumenta la fluorescencia con el transcurso del tiempo (15 min) debido a la acumulación citoplasmática del compuesto **BS7** (Figuras 33A y B).

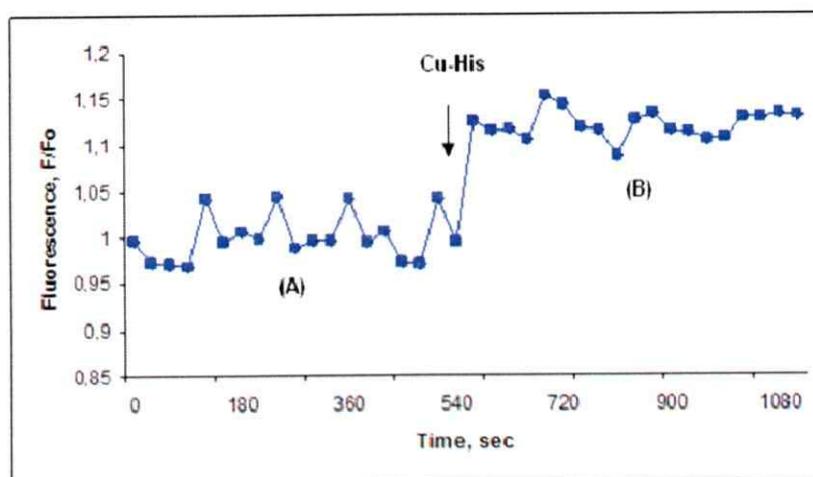


Fig. 32. Cambio de fluorescencia del quelante **BS-7** en células SH-SY5Y.

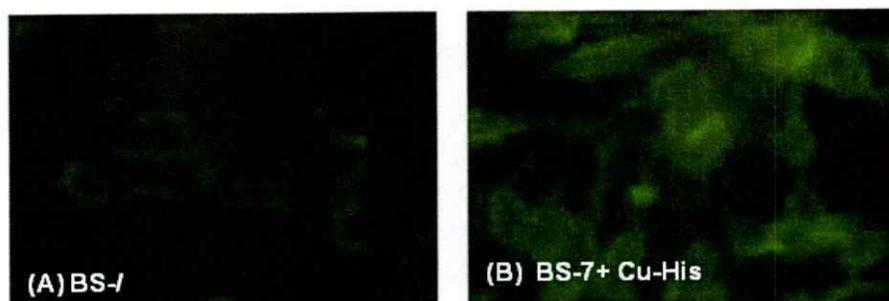


Fig. 33. (A) Células SH-SY5Y con sonda BS-7 (10 μ M, 20 min). (B) Células SH-SY5Y incubadas con Cu-His (200 μ M, 15 min).

En este ensayo el metal es suplementado con histidina, cuya importancia es transportar iones, entre ellos el Cu^{+2} . **BS-7** aumenta su fluorescencia debido a la conformación semiplanar que adopta por la formación del complejo metal-ligando (L-M) y a la transferencia de carga metal-ligando.

5.3.5. 3-Cinamoil-7-metoxi-2H-cromeno-2-ona (Ch-C1).

Células de neuroblastoma humano SH-SY5Y fueron tratadas por 12 h con *N*-acetilcisteína (NAC) (30 mM), un agente que induce la síntesis de glutatión. Seguidamente las células fueron lavadas e incubadas con la sonda **Ch-C1**. La fluorescencia fue medida usando un lector fluorescente de microplacas y por microscopía epifluorescente. Los resultados muestran que la fluorescencia es incrementada significativamente después de tratar las células con **Ch-C1** (Figura 34A). Resultados similares se obtuvieron al tratar las células primero con la sonda y posteriormente con cisteína (Cys) (5 mM), incubada por 5 min (Figura 34B). Los datos representan la media \pm SEM; $n = 6$, $P < 0.01$.

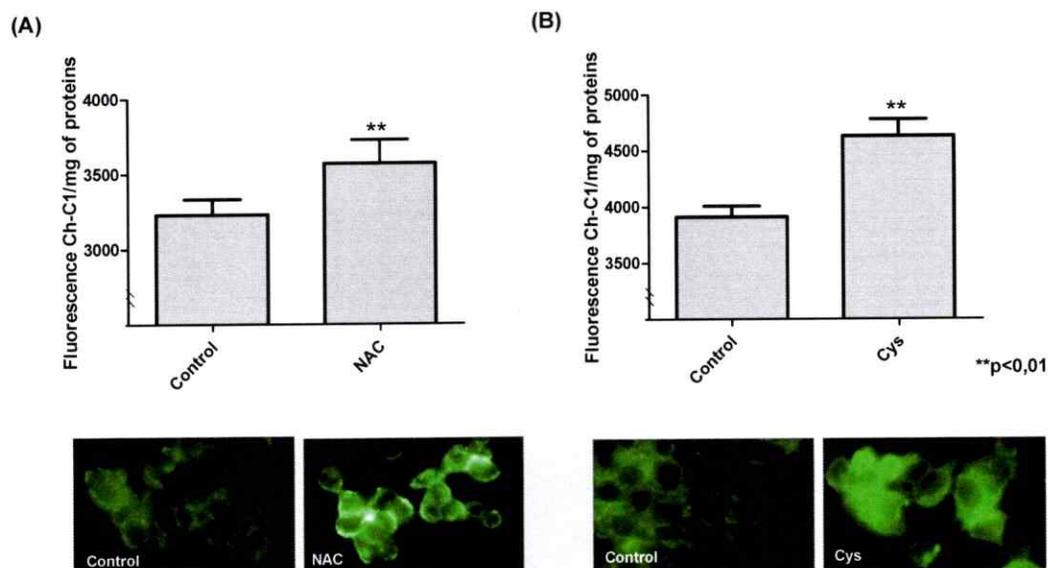


Fig. 34. La fluorescencia de **Ch-C1** en células SHSY-5Y incrementada por tratamiento con NAC (A) o Cys (B).

El incremento de la fluorescencia causado por **Ch-C1** se debe a que la adición del tiol (ME) que ataca nucleofílicamente al carbono- β de la insaturación, eliminando la conjugación que presenta el compuesto (Figura 35). Al hacerse la adición nucleofílica a la insaturación se libera el fluoróforo aumentando así la intensidad de su fluorescencia [117].

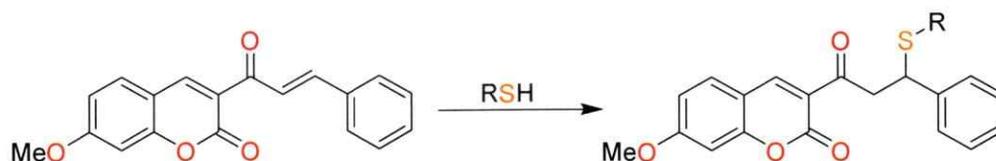


Fig. 35. Reacción de **ChC1** con btiotioles (RSH).

6. CONCLUSIONES

1. Las rutas sintéticas diseñadas y propuestas permitieron la obtención de compuestos derivados de cumarinas modificadas con tris-(hidroximetil)aminometano (TRIS), (3*E*)-3-(bencilidenamino)-2*H*-cromen-2-ona y 3-((*E*)-3-fenilacrilil)-2*H*-cromen-2-ona.
2. Las sondas sintetizadas *N*-(1,3-dihidroxi-2-(hidroximetil)propan-2-il)-2-(7-hidroxi-2-oxo-2*H*-cromen-4-il)acetamida (**Q51**), 2-amino-3-hidroxi-2-(hidroximetil)propil 2-(7-hidroxi-2-oxo-2*H*-cromen-4-il)acetato (**Q52**) y *N*-(1,3-dihidroxi-2-(hidroximetil)propan-2-il)-7-hidroxi-2-oxo-2*H*-cromen-3-carboxamida (**Q53**) muestran una alta selectividad por Fe^{+2} y Fe^{+3} en solución acuosa a pH fisiológico, traducándose esta respuesta con una fuerte disminución de su intensidad fluorescente.
3. La desactivación de la fluorescencia de los compuestos **Q51**, **Q52** y **Q53**, muestra que dichas moléculas presentan un apagamiento de tipo estático y una relación estequiométrica 1:1.
4. Los ensayos fotofísicos y en modelos biológicos de las sondas **Q51**, **Q52** y **Q53**, demuestran que disminuyen la intensidad fluorescente en presencia de Fe^{+2} y Fe^{+3} .
5. Los compuestos **Q51**, **Q52** y **Q53** pueden ser utilizados como sondas fluorescentes para ensayos biológicos, debido a que el apagamiento de su fluorescencia, con Fe^{+2} o Fe^{+3} , puede ser revertido por un quelante de mayor afinidad como el bipyridilo.
6. Los compuestos **Q51**, **Q52** y **Q53**, presentan una alta capacidad de permear las membranas celulares y depositarse en la mitocondria, generando una señal fluorescente que se apaga en presencia del metal.

7. El compuesto (*E*)-3-(2,5-dimetoxibencilidenamino)-7-hidroxi-2*H*-cromen-2-ona (**BS-7**), sonda desarrollada para Fe^{+2} y Fe^{+3} presenta un sistema conjugado aparentemente plano, sin embargo sus propiedades fluorescentes son muy débiles y su selectividad por estos iones fue nula.
8. La sonda **BS-7** se comporta como sonda OFF-ON en presencia de Cu^{+2} mostrando una alta selectividad sobre otros iones de interés biológico.
9. La estequiometría del complejo **BS-7** - Cu^{+2} se determinó mediante los métodos gráficos de Benesi-Hildebrand y Job dando por resultado una relación 2:1.
10. El compuesto **BS-7** puede ser utilizado como sonda fluorescente *in vivo*, ya que presenta capacidad de permear las membranas celulares y depositarse en el citosol, generando un aumento de la intensidad de su fluorescencia en presencia de Cu^{+2} .
11. Los compuestos derivados de chalco-cumarinas (**Ch-C**) presentaron fluorescencia débil. Sin embargo, su afinidad por Fe^{+2} y Fe^{+3} fue nula, como también por otros iones.
12. Los compuestos **Ch-C1** y **Ch-C2** se comportan *in vitro* como sondas OFF-ON en presencia de tioles como cisteína, homocisteína y glutatión en medio acuoso a pH 7,2.
13. Las sondas **Ch-C1** y **Ch-C2** se comportan como sensores moleculares *in vivo* de tioles endógenos en células de neuroblastoma SH-SY5Y.

7. REFERENCIAS

1. Kaim W., Schwederski B. 1995. Bioinorganic chemistry. En Teubner B.G., Stuttgart, Germany.
2. Halliwell B., Gutteridge JM. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.*, 186, 1-85 (1992).
3. Halliwell B., Gutteridge JM. Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. An update. *F.E.B.S. Lett.*, 307, 108-112 (1992).
4. Gaeta A., Hider RC. The crucial role of metal ions in neurodegeneration: the basis for a promising therapeutic strategy. *Br. J. Pharmacol.*, 146, 1041-1059 (2005).
5. Bacon BR., Britton RS. The pathology of hepatic iron overload: a free radical-mediated process. *Hepatology*, 11, 127-137 (1990).
6. Kehrer JP. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology*, 149, 43-50 (2000).
7. de Silva AP., Gunaratne HQ., Gunnlaugsson T., Huxley AJ., McCoy CP., Rademacher TT., Rice TE., Signaling recognition events with fluorescent sensors and switches. *Chem. Rev.*, 97, 1515-1566 (1997).
8. Fabbrizzi L., Poggi A. Sensor and switches from supramolecular chemistry. *Chem. Soc. Rev.*, 24, 197-202 (1995).
9. Yoon J., Ohler NE., Vance DH., Aumiller WD., Czarnik W. A fluorescent chemosensor signalling only Hg(II) and Cu(II) in water. *Tetrahedron Lett.*, 38, 3845-3848 (1997).
10. Henrich G., Sonnenschein H., Resch-Genger U. Redox switchable fluorescent probe selective for either Hg(II) or Cd(II) and Zn (II). *J. Am. Chem. Soc.*, 121, 5073-5074 (1999).
11. Prodi L., Bargossi C., Montalti M., Zaccheroni N., Su N., Bradshaw JS., Izatt RM., Savage PB., An effective fluorescent chemosensor for mercury ions. *J. Am. Chem. Soc.*, 122, 6769-6770 (2000).
12. Descalzo AB., Martínez-Máñez R., Radeglia R., Rurack K., Soto J. Coupling selectivity with sensitivity in an integrated chemosensor framework: Design of a

- Hg⁺² responsive probe, operating above 500 nm. *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 3418-6770 (2003).
13. Que E., Domaille DW., Chang CJ. Metals in neurobiology: Probing their chemistry and biology with molecular imaging. *Chem. Rev.*, **108**, 1517-1549 (2008).
 14. Zhang XB, Cheng G., Zhang WJ., Shen GL., Yu RQ. A fluorescent chemical sensor for Fe³⁺ based on blocking of intramolecular proton transfer of a quinazolinone derivative. *Talanta*, **71**, 171-177 (2007).
 15. Brugnara C. Iron Deficiency and Erythropoiesis: New Diagnostic Approaches. *Clin. Chem.*, **49**, 1573-1978 (2003).
 16. Beard J. Iron Deficiency Alters Brain Development and Functioning. *J. Nutr.*, **133**, 1468S-1472S (2003).
 17. Zecca L., Youdim MB., Riederer P. Connor JR., Crichton RR. Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders. *Nat. Rev. Neurosci.*, **5**, 863-873 (2005).
 18. Egan TJ., Hunter R, Kaschula CH., Marques HM., Mispion A., Walden J. Structure-Function Relationships in Aminoquinolines: Effect of Amino and Chloro Groups on Quinoline-Hematin Complex Formation, Inhibition of β -Hematin Formation, and Antiplasmodial Activity. *J. Med. Chem.*, **43**, 283-291 (2000).
 19. Napier I., Ponka P., Richardson DR. Iron trafficking in the mitochondrion: novel pathways revealed by disease. *Blood*, **105**, 1867-1874 (2005).
 20. Pandolfo M. Iron Metabolism and Mitochondrial Abnormalities in Friedreich Ataxia. *Blood Cells Mol. Dis.*, **29**, 536-552 (2002)
 21. Petrat F., Groot H., Sustmann R., Rauen U. The Chelatable Iron Pool in Living Cells: a Methodically Defined Quantity. *Biol. Chem.*, **383**, 489-502 (2002).
 22. Ryan, TP., Aust, SD. The Role of Iron in Oxygen-Mediated Toxicities. *Crit. Rev. Toxicol.* **22.**, 119-141 (1992).
 23. Perez G., Vittori D., Pregi N., Garbossa G., Nesse A. *Acta Bioquím Clín Latinoam.* **39**, 301-314 (2005).

24. Starke PE., Farber JL. Endogenous defenses against the cytotoxicity of hydrogen peroxide in cultured rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **260**, 86–92 (1985).
25. De Silva AP., Gunaratne HQN., Gunnlaugsson T., Huxley AJM., McCoy CP., Rademacher JT., Rice TE. Signaling Recognition Events with Fluorescent Sensors and Switches. *Chem. Rev.* **97**, 1515–1566 (1997).
26. Valeur B. 2002. Molecular Fluorescence Principles and Applications. Pag. 35. WILEY-VCH,
27. Weinheim.Kim SK., Lee DH., Hong J-I., Yoon J. Chemosensors for pyrophosphate. *Acc. Chem. Res.* **42**, 23-3 (2009).
28. Moreno D. 2011. Nuevas sondas Cromo-Fluorogénicas a Partir de Derivados Organopaladio y Compuestos Indénicos. Tesis Doctoral. Universidad de Burgos. Pag 11-16.
29. Mancin F., Rampazzo E., Tecilla P., Tonellato U. Self-Assembled Fluorescent Chemosensor. *Chem. Eur. J.*, **12**, 1844-1854 (2006).
30. Lytto SD., Mester B., Libman J., Shanzer A., Cabantchik ZI. I. Monitoring of iron(III) removal from biological sources using a fluorescent siderophore. *Anal. Biochem.*, **205**, 326–333 (1992).
31. Valeur B., Leray I. Design Principles and Fluorescent Molecular Sensors for Cation Recognition. *Cood. Chem. Rev.*, **205**, 3-40 (2000).
32. Petrat F., Weisheit D., Lensen M., Groot H., Sustmann R., Rauen U. Selective determination of mitochondrial chelatable iron in viable cells with a new fluorescent sensor. *Biochem. J.*, **362**, 137-147 (2002).
33. Espósito B., Epsztejn S., Breuer W., Cabantchik ZI. A Review of Fluorescence Methods for Assessing Labile Iron in Cells and Biological Fluids. *Anal. Biochemistry*, **304**, 1-18 (2002).
34. Petrat F., Rauen U., Groot H. Determination of the chelatable iron pool of isolated rat hepatocytes by digital fluorescence microscopy using the fluorescent probe, phen green SK. *Hepatology*, **29**, 1171–1179 (1999).

35. Luo W., Ma YM., Quinn PJ., Hider RC., Liu ZD. Design, synthesis and properties of novel iron (III)-specific fluorescent probes. *J. Pharm. Pharmacol.*, **56**, 529–536 (2004).
36. Ma Y., Luo W., Quinn PJ., Liu Z., Hider RC. Design, synthesis, physicochemical properties, and evaluation of novel iron chelators with fluorescent sensor. *J. Med. Chem.* **47**, 6349-6362 (2004).
37. Ma Y., Liu Z., Hider RC., Petrat F. Determination of the Labile Iron Pool of Human Lymphocytes using the Fluorescent Probe, CP655. *Analytical Chemistry Insights*, **2**, 61-67 (2007).
38. Ma Y., de Groot H., Liu Z., Hider RC., Petrat F. Chelation and determination of labile iron in primary hepatocytes by pyridinone fluorescent probes. *Biochem. J.*, **395**, 49-55 (2006).
39. Fakhri S., Podinovskaia M., Kong X., Collins HL., Schaible U.E., Hider R.C. Targeting the lysosome: Fluorescent iron(III) chelators to selectively monitor endosomal/lysosomal labile iron pools. *J. Med. Chem.*, **51**, 4539-4552 (2008).
40. Ma Y., Luo W., Camplo M., Liu Z., Hider RC. Novel iron-specific fluorescent probes. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **15**, 3450-3452 (2005).
41. Hua J., Wung Y-G. A Highly Selective and Sensitive Fluorescent Chemosensor for Fe³⁺ in Physiological Aqueous Solution. *Chem. Lett.*, **34**, 98-99 (2005).
42. Smanmoo S., Nasomphan W., Tangboriboonrat P. Highly selective fluorescent chemosensor for Fe³⁺ imaging in living cells. *Inorg. Chem. Comm.*, **14**, 351-354 (2011).
43. Grabchev I., Chovelon JM., Bojinov V. New green fluorescent polyvinylcarbazole copolymer with 1,8-naphthalimide side chains as chemosensor for iron cations. *Polymers for Advanced Technologies*, **15**, 382-386 (2004).
44. De Silva AP., Rice TE. A small supramolecular system which emulates the unidirectional, path-selective photoinduced electron transfer (PET) of the bacterial photosynthetic reaction centre (PRC). *Chem. Commun.*, **2**, 163-164 (1999).

45. Bae S., Tae J. Rhodamine-hydroxamate-based fluorescent chemosensor for Fe^{III}. *Tetrahedron Lett.*, **48**, 5389-5392 (2007).
46. Zhang M., Gao Y., Li M., Yu M., Li F., Li L., Zhu M., Zhang J., Yi T., Huang CH. A selective turn-on fluorescent sensor for Fe^{III} and application to bioimaging. *Tetrahedron Lett.*, **48**, 3709-3712 (2007).
47. Xiang Y., Tong A. A New Rhodamine-Based Chemosensor Exhibiting Selective Fe^{III}-Amplified Fluorescence. *Org. Lett.*, **8**, 1549-1552 (2006).
48. Mao J., Wang L., Dou W., Tang X., Yan Y., Liu W. Tuning the Selectivity of Two Chemosensors to Fe(III) and Cr(III). *Org. Lett.*, **9**, 4567-4570 (2007).
49. Weerasinghe A., Abebe F.A., Sinn E. Rhodamine based turn-ON dual sensor for Fe⁺³ and Cu⁺². *Tetrahedron Lett.*, **52**, 5648-5651 (2011).
50. Kikkeri R., Traboulsi H., Humbert N., Gumienna E., Arad R., Melman, M., Elhabiri M., Albrecht A., Shanzer A. Toward Iron Sensors: Bioinspired Tripods Based on Fluorescent Phenol-oxazoline Coordination Sites. *Inorg. Chem.*, **46**, 2485-2497 (2007).
51. Bricks J., Kovalchuk A., Trieflinger Ch., Nofz M., Buschel M., Tolmachev A., Daub J., Rurack K. On the Development of Sensor Molecules that Display Fe^{III}-amplified Fluorescence. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 13522-13529 (2005).
52. Yao J., Dou W., Qin W., Liu W. A new coumarin-based chemosensor for Fe³⁺ in water. *Inorg. Chem. Comm.*, **12**, 116-118 (2009).
53. Lin W., Yuan L., Feng J., Cao X. A Fluorescence-Enhanced Chemodosimeter for Fe³⁺ Based on Hydrolysis of Bis(coumarinyl) Schiff Base. *Eur. J. Org. Chem.* **16**, 2689-2692 (2008).
54. Meldenson W. U.S. Large scale preparation of 2,4-dihydroxybenzaldehyde using a variation of the Vilsmeier-Haack reaction and isolated intermediates. Patent N° 5,599,988 (1997).
55. Meldenson W., Hayden S. Preparation of 2,4-Dihydroxybenzaldehyde by the Vilsmeier-Haack Reaction. *Synth. Comm.*, **26**, 603-610 (1996).

56. Gonzalez I., Femenia M., Macías A., García C. Novel antioxidants which are obtained from a natural and synthetic source and method of obtaining same. WO 2006/120266 (2006).
57. Nagarajan S., Rao L. Determination of 2-hydroxy-4-methoxybenzaldehyde in roots of *Decalepis hamiltonii* (Wight & Arn.) and *Hehmidesmus indicus* R.Br. *J. AOAC Int.*, **86**, 564-567 (2003).
58. Mulvena D., Webb E.C., Zerner B. 3,4-dihydroxybenzaldehyde, a fungistatic substance from green Cavendish bananas. *Phytochemistry*, **8**, 393-305 (1969).
59. Chem Y-Sh., Kuo P-Y., Shie T-L., Yang D-Y Structure, reactivity and application of some triketone derivatives. *Tetrahedron*, **62**, 9410-9416 (2006).
60. Frederick GF., Cagle FW., Jr. The improved synthesis of 5-nitro-1,10-phenanthroline. *J. Org. Chem.*, **12**, 781-784 (1947).
61. Leconte J., Mesmaeker K., Demeunynck M., Lhomme J. Synthesis and characterisation of a new DNA-binding bifunctional ruthenium(II) complex. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, **89**, 3261-3269 (1993).
62. Cuchelkar V., Kopeckova P., Kopecek J. Novel HPMA copolymer-bound constructs for combined tumor and mitochondrial targeting. *Mol. Pharmacol.*, **5**, 776-786 (2008).
63. Creaven B., Egan D., Kavanagh K., McCann M., Noble A., Thati B., Walsh M. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of a series of substituted coumarin-3-carboxylatosilver(I) complexes. *Inorg. Chim. Acta*, **359**, 3976-3984 (2006).
64. Alvim Júnior J., Dias R., Castilho M., Oliva G., Correa A. Preparation and evaluation of a coumarin library towards the inhibitory activity of the enzyme gGAPDH from *Trypanosoma cruzi*. *J. Braz. Chem. Soc.*, **16**, 763-773 (2005).
65. Sun Y-F, Cui Y-P. The synthesis, characterization and properties of coumarin-based chromophores containing a chalcone moiety. *Dyes Pigments*. **78**, 65-76 (2008).
66. Wang MX., Meng M., Zhu MZ., Guo QZ. Novel fluorescent chemosensor for Ag⁺ based on coumarin fluorophore. *Chin. Chem. Lett.*, **19**, 977-980 (2008).

67. Angelescu E., Pavel O., Bîrjega R., Zăvoianu R., Costentin G., Che M. Solid base catalysts obtained from hydrotalcite precursors, for Knoevenagel synthesis of cinnamic acid and coumarin derivatives. *Applied Catalysis A*. **308**, 13-18 (2006).
68. Robert S., Bertolla C., Masereel, Dogné J-M., Pochet L. Novel 3-carboxamide-coumarins as potent and selective FXIIa inhibitors. *J. Med. Chem.*, **51**, 3077-3080 (2008).
69. Sivakumar K., Xie F., Cash B., Long S., Barnhill H., Wang Q. A Fluorogenic 1,3-dipolar cycloaddition reaction of 3-azidocoumarins and acetylenes. *Org. Lett.*, **6**, 4603-4606 (2004).
70. Manvar A., Malde A., Verma J., Virsodia V., Mishra A., Upadhyay K., Acharya H., Coutinho E., Shah A. Synthesis, anti-tubercular activity and 3D-QSAR study of coumarin-4-acetic acid benzylidene hydrazides. *Eur. J. Med. Chem.*, **43**, 2395-2403 (2008).
71. Zagotto G., Gia O., Uriarte E., Palumbo M. Synthesis and structure of 5-methoxy-4-methylbenzopsoralen. *Photochem. Photobiol.*, **58**, 486-491 (1993).
72. Kaufman K., Russey W., Worden L. Synthetic Furocoumarins. V.¹ Preparation and Reactions of 8-Amino- 4,5'-dimethylpsoralene. *J. Org. Chem.*, **27**, 875-879 (1962).
73. Yan M., Li T., Yang Z. A novel coumarin Schiff-base as a Zn(II) ion fluorescent sensor. *Inorg. Chem Comm.*, **14**, 463-465 (2011).
74. Huff, J., Merchant, B., Mullen, C., Venkata, S. Fluorescent enzyme substrates. WO 99/46402 (1999).
75. Li HY., Gao Sh., Xi Zh. A colorimetric and "turn-on" fluorescent chemosensor for Zn(II) based on coumarin Schiff-base derivative. *Inorg. Chem. Comm.*, **12**, 300-303 (2009).
76. SMART, SAINTPLUS V6.02, SHELXTL V6.10 and SADABS; Bruker Analytical X-ray Instruments Inc., Madison, Wisconsin, USA. Sheldrick GM. 1997.

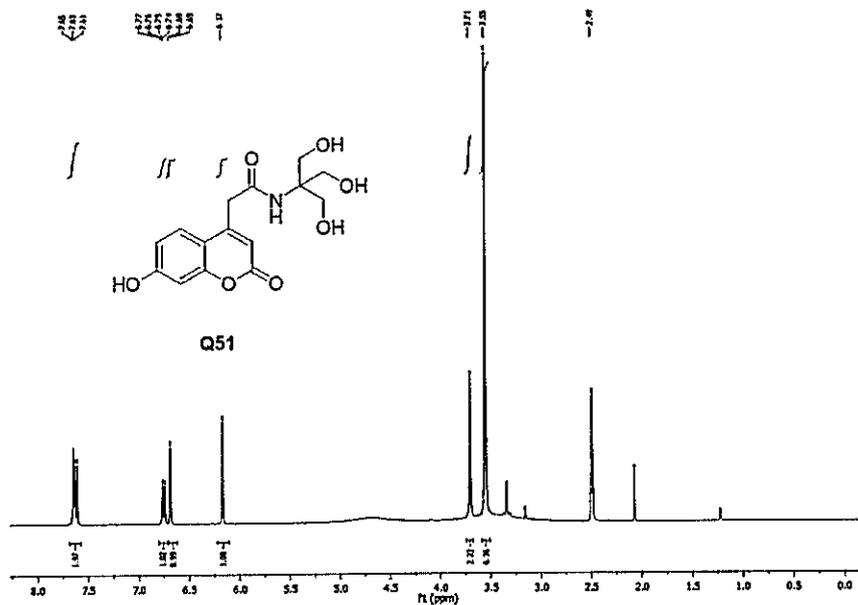
77. SHELXL-97. Program for the Refinement of Crystal Structures. University of Göttingen, Germany. Brandenburg K. 1999.
78. DIAMOND. Visual Crystal Structure Information System. Version 2.1e Crystal Impact GbR, Bonn, Germany.
79. Spek A.L. PLATON Program. *J. Appl. Cryst.* **36**, 7-13 (2003).
80. Magde D. Rojas GE. Seybold P. Solvent Dependence of the fluorescence lifetimes of xanthene dyes. *Photochem. Photobiol.* **70**, 737-744 (1999).
81. Lukeman M., Veal D., Wan P., Ranjit V., Munasinghe N., Corrie JE. Photogeneration of 1,5-naphthoquinone methides via excited-state (formal) intramolecular proton transfer (ESIPT) and photodehydration of 1-naphthol derivatives in aqueous solution. *Can. J. Chem.*, **82**, 240–253 (2004).
82. Maus M, Reittig W, Bonafoux D, Lapouyade R. Photoinduced intramolecular charge transfer in a series of differently twisted donor–acceptor biphenyls as revealed by fluorescence. *J. Phys. Chem. A.*, **103**, 3388–3401 (1999).
83. Gao F., Niu L., Hu N., Wang J., Li H., Zhang S. Synthesis and Spectroscopy of Novel Branched Fluorescent Dyes Containing Benzophenone Parts and the Possibility as Fluorescence Probes. *J. Fluoresc.*, **21**, 149–159 (2011).
84. Velapoldi R., Tønnesen HH. Corrected fluorescence spectra and quantum yields for a series of compounds in the visible spectral region. *J. Fluoresc.*, **14**, 465–472 (2004).
85. Nad S., Pal H. Electron transfer from diphenyl and triphenyl amines to excited coumarin dyes. *J. Photochem. Photobiol. A.*, **134**, 9-15 (2000).
86. Jones II G., Jackson W., Choi ChY., Bergmark WR.. Solvent effects on emission yield and lifetime for coumarin laser dyes. Requirements for a rotatory decay mechanism. *J. Phys. Chem.*, **89**. 294-300 (1985).
87. Banesi HA., Hildebrand JH. A Spectrophotometric investigation of the interaction of iodine with aromatic hydrocarbons. *J. Am. Chem. Soc.*, **71**, 2703-2707 (1949).

88. Singh R.B., Mahanta S., Guchhait N. Spectral modulation of charge transfer fluorescence probe encapsulated inside aqueous and non-aqueous β -cyclodextrine nanocavities. *J. Mol. Struct.*, **963**, 92-97 (2010).
89. Leyva E., Moctezuma E., Leyva R., Oros S. Estudio de los complejos de inclusión de ácido nalidíxico y ácido oxolínico con ciclodextrinas. *Rev. Soc. Quim. Mex.*, **48**, 189-195 (2004).
90. Liu S-R., Wu S-P. An NBD-based Sensitive and Selective Fluorescent Sensor for Copper(II) Ion. *J. Fluoresc.*, **21**, 1599-1605 (2011).
91. Senthilvelan A., Ho I., Chang K., Lee G., Liu Y., Chung W. Cooperative recognition of a copper cation and anion by a calix[4]arene substituted at the lower rim by a β -Amino- α , β -unsaturated ketone. *Chem. Eur. J.*, **15**, 6152-6160 (2009).
92. Connors KA. 1987. Binding Constants the Measurement of Molecular Complex Stability, John Wiley & Sons, New York.
93. Mena N., Bulteau AL., Salazar J., Hirsch EC., Núñez MT. Effect of mitochondrial complex I inhibition on Fe-S cluster protein activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **409**, 241-246 (2011).
94. Schiedel, MS., Briehm, CA., Bauerle, P. Single-compound libraries of organic materials: Parallel synthesis and screening of fluorescent dyes. *Angew. Chem., Int. Ed.* **40**, 4677-4680 (2001).
95. Yee, DJ., Balsanek, V., Sames, D.J. New Tools for Molecular Imaging of Redox Metabolism: Development of a Fluorogenic Probe for 3α -Hydroxysteroid Dehydrogenase. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 2282-2283 (2004).
96. Horning, E.C., Reisner, DB. Furocoumarins. Synthesis of 2,3-dihydropsoralene. *J. Am. Chem. Soc.* **70**, 3619-3620 (1948).
97. Kaufman K., Gaiser F., Leth T., Worden L. Synthetic furocoumarins. II. Synthesis of several alkylated psoralenes and of a dihydroisopsoralene. *J. Org. Chem.*, **26**, 2443-2446 (1961).
98. Wood LL., Johnson D. Coumarins from 2-hydroxyaryl acids and lamic acid. *J. Org. Chem.*, **30**, 4343-4344 (1965).

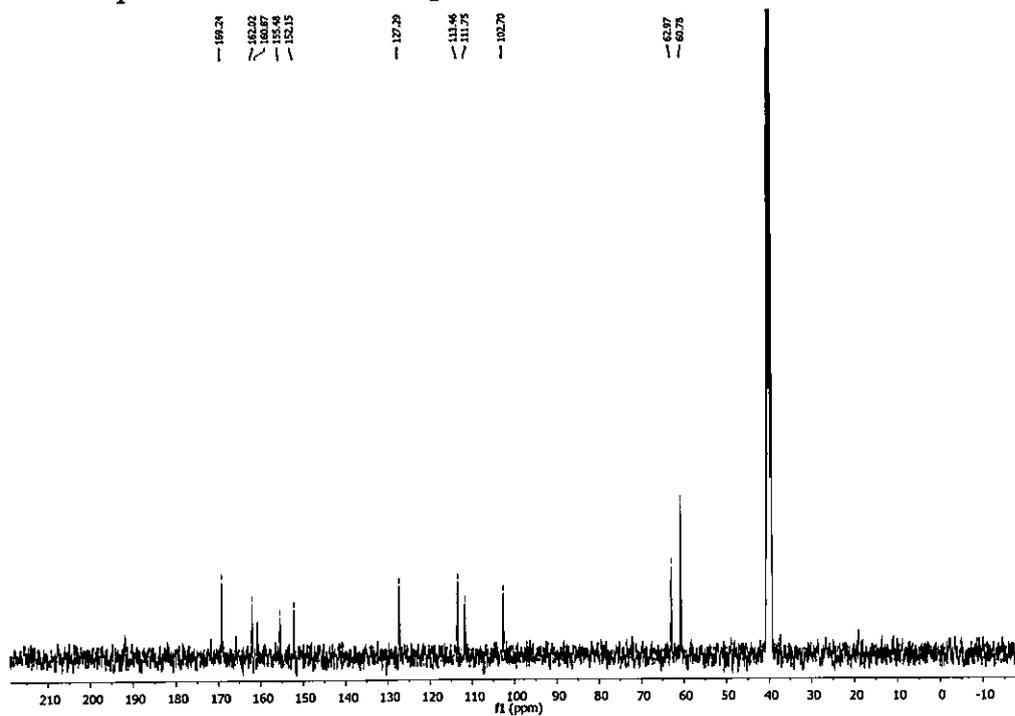
99. Kobertz WR., Essigmann JM. An efficient synthesis of a furan-side furocoumarin thymidine monoadduct. *J. Org. Chem.*, **62**, 2630-2632 (1997).
100. Frédérick R., Charlier C., Robert S., Wouters J., Masereel B., Pochet L. Investigation of mechanism-based thrombin inhibitors: Implications of a highly conserved water molecule for the binding of coumarins within the S pocket. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **16**, 2017-2021 (2006).
101. Chimenti F., Secci D., Bolasco A., Chimenti P., Bizzarri B., Granese A., Carradori S., Yáñez M., Orallo F., Ortuso F., Alcaro S. Synthesis, Molecular Modeling Studies, and Selective Inhibitory Activity against Monoamine Oxidase of 1-Thiocarbamoyl-3,5-diaryl-4,5-dihydro-(1*H*)- pyrazole Derivatives. *J. Med. Chem.*, **48**, 7113-7122 (2005).
102. Frédérick R., Robert S., Charlier C., Ruyck J., Wouters J., Pirotte B., Masereel B., Lionel Pochet. 3,6-Disubstituted Coumarins as Mechanism-Based Inhibitors of Thrombin and Factor Xa. *J. Med. Chem.*, **48**, 7592-7603 (2005).
103. Galdámez A., García O., Cassels BK. Hydrogen-bonded supramolecular array in the crystal structure of ethyl 7-hydroxy-2-oxo-2*H*-chromene-3-carboxylate monohydrate. *J. Chil. Chem. Soc.*, **56**, 546-548 (2011).
104. Sivakumar K., Jesurethinam F., Subramanian K., Natarajan S. 7-Hydroxy-4-coumarinacetic acid monohydrate. *Acta Crystallogr., Sect. C: Cryst. Struct. Commun.*, **46**, 1663-1665 (1990).
105. Subramanian K., Sivakumar K., Natarajan S., Parthasarathy S. Ethyl 7-hydroxy-4-coumarinacetate. *Acta Crystallogr., Sect. C: Cryst. Struct. Commun.*, **46**, 1661-1663 (1990).
106. Fischer E., Speier A. Darstellung der Ester. *Chemische Berichte*. **28**, 3252-3258 (1895).
107. Song PS. Electronic spectroscopy of photobiological receptors. *Can. J. Spectrosc.* **26**, 59-62 (1981).
108. Moore, TA., Harter ML., Song PS. Ultraviolet Spectra of Coumarins and Psoralens. *J. Mol. Spectrosc.* **40**, 144-157 (1971).
109. Abu-Eitah RH., El-Tawl BAH. The electronic absorption spectra of some

110. coumarins. A molecular orbital treatment. *Can. J. Chem.* **63**, 1173-1179 (1985).
111. Robertson DN., Link, KP. Studies on 4-Hydroxycoumarins. XII. 3-Substituted-aminomethyl-4- hydroxycoumarin Derivatives by the Mannich Reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **75**, 1883-1885 (1953).
112. Dewey TG. 1991. Biophysical and Biochemical Aspects of fluorescence Spectroscopy, Plenum Press, New York, pp. 1-41.
113. Key J., Koh S., Timergazin Q., Brown A., Cairo C. Photophysical characterization of triazole-substituted coumarin fluorophores. *Dyes and Pigments*, **82**, 196-203 (2009).
114. Jung H.S., Kwon PS., Lee JW., Kim J., Hong CS., Kim JW., Yan S., Lee JY., Lee JH., Joo T., Kim JS. Coumarin-derived Cu⁺²-Selective fluorescence sensor: Synthesis, mechanisms, and applications in living cells. *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 2008-2012 (2008).
115. Guo D., Chen T., Ye D., Xu J., Jiang H., Chen K., Wang H., Liu H. Cell-permeable iminocoumarine-based fluorescent dyes for mitochondria. *Org. Lett.*, **13**, 2884-2887 (2011).
116. Yan M-H., Li T-R., Yang Z-Y. A novel coumarin Schiff-base as a Zn(II) ion fluorescent sensor. *Inorg. Chem. Comm.*, **14**, 463-465 (2011).
117. García O., Mena N., Pérez E., Cassels BK., Nuñez MT., Werlinger F., Zavala D., Aliaga M., Pavez P. *Tetrahedron Lett.*, **52**, 6606-6609 (2011).

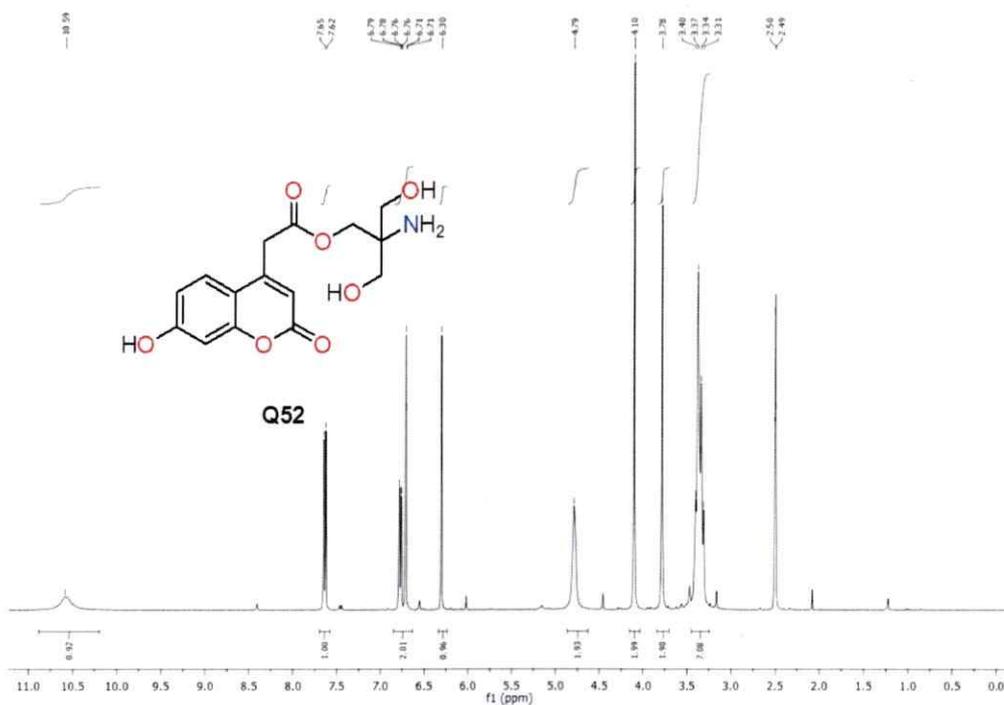
8. ANEXOS



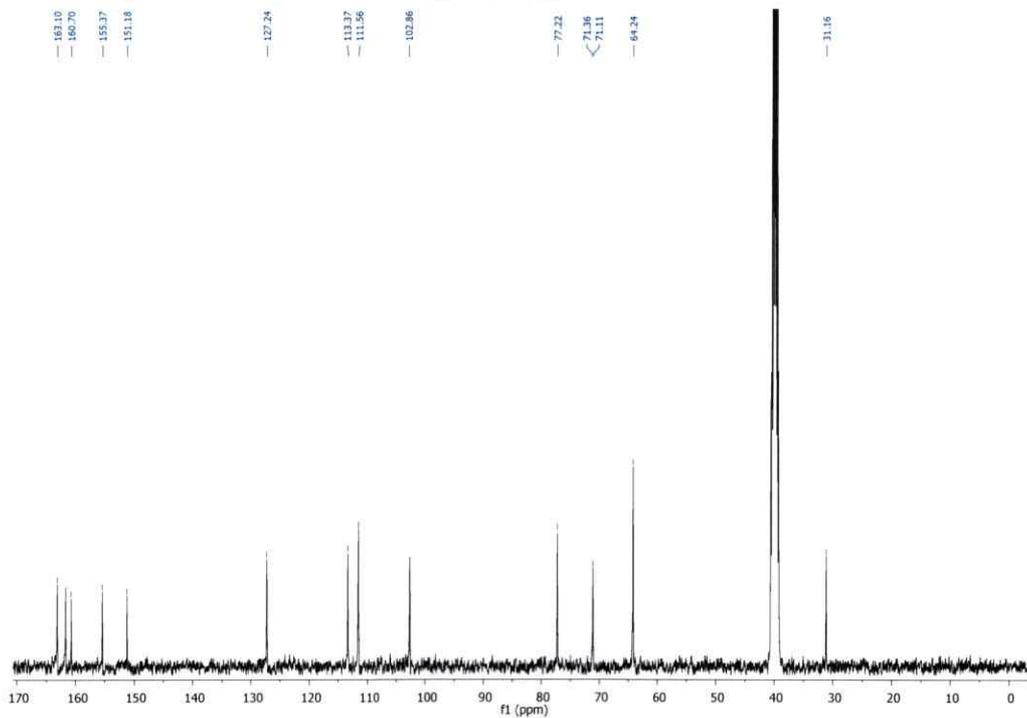
Anexo 1a. Espectro ^1H RMN del compuesto Q51.



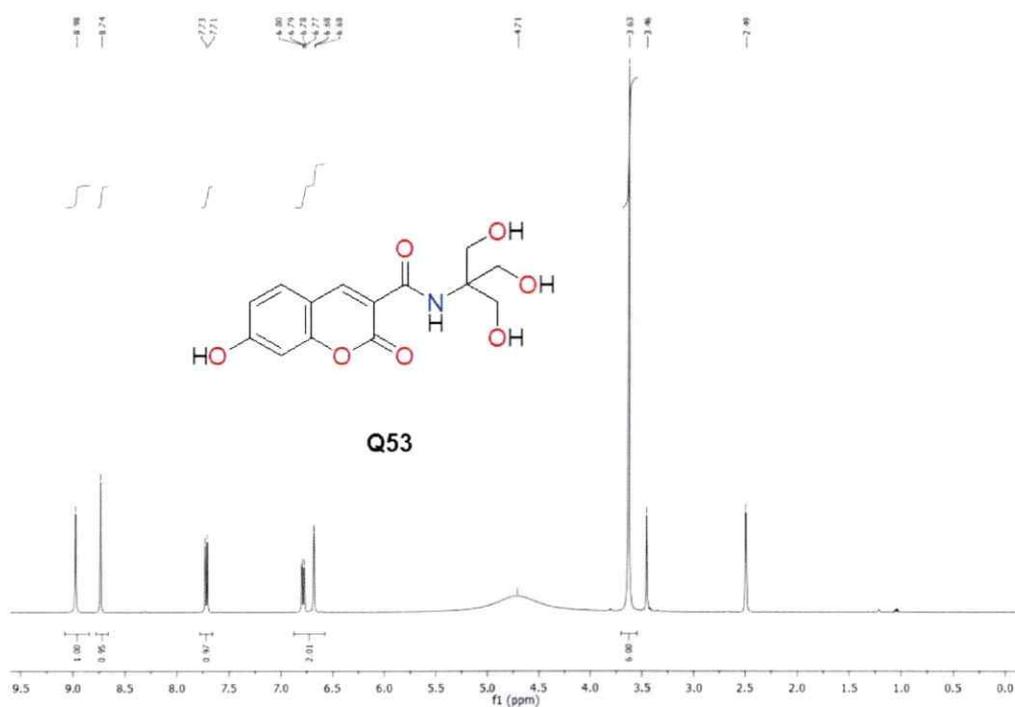
Anexo 1b. Espectro ^{13}C RMN del compuesto Q51.



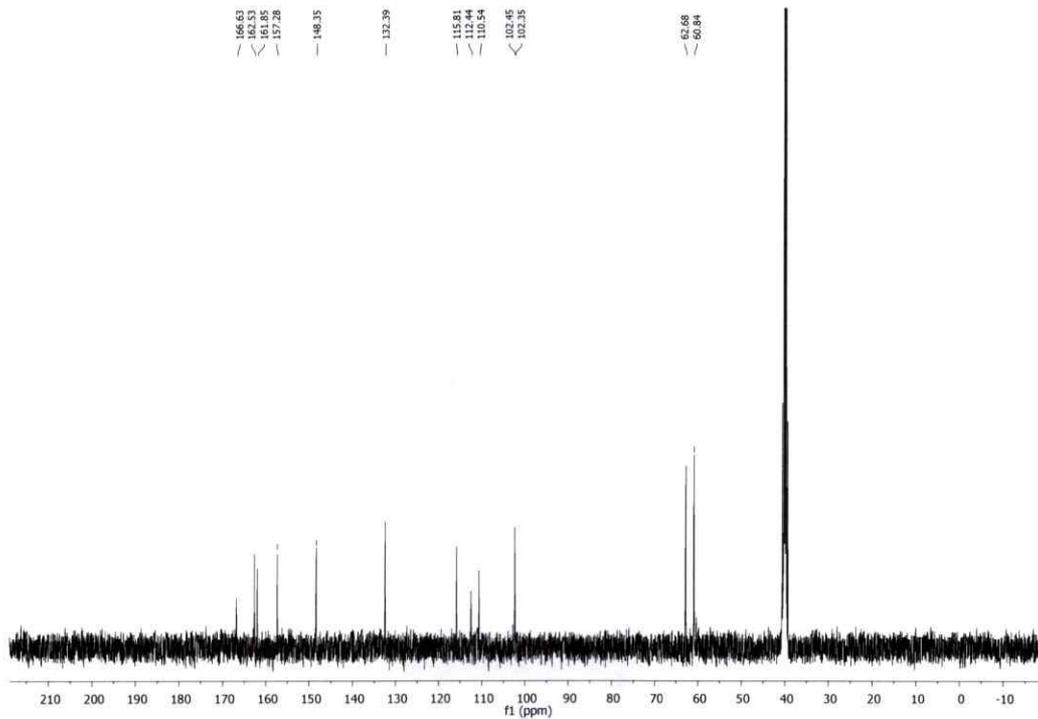
Anexo 2a. Espectro ^1H RMN del compuesto Q52.



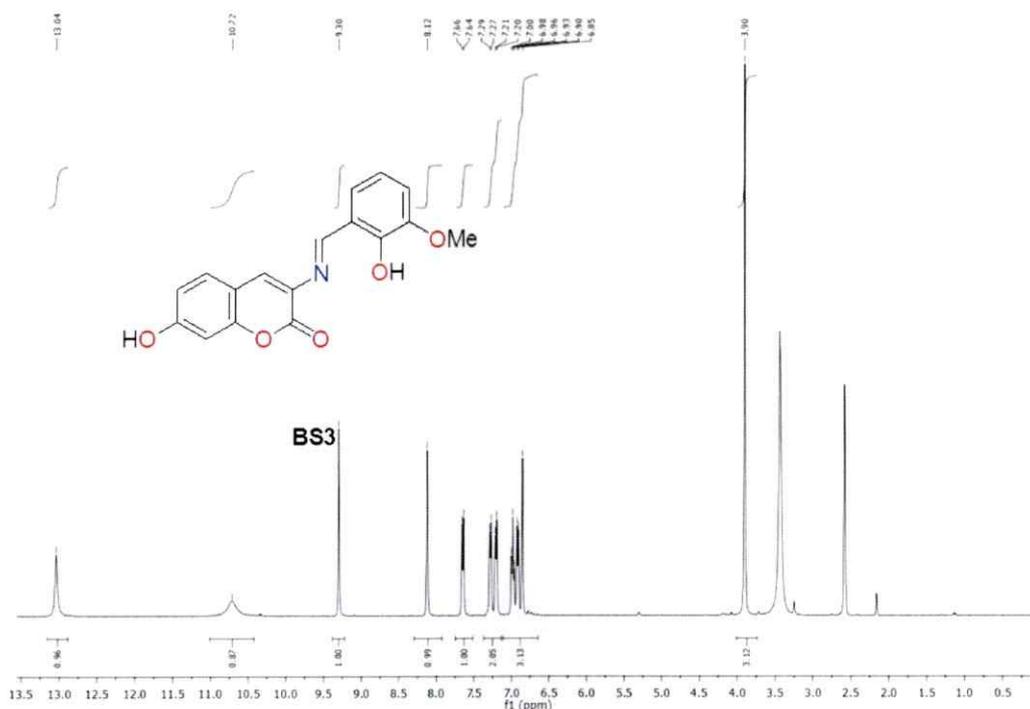
Anexo 2b. Espectro ^{13}C RMN del compuesto Q52.



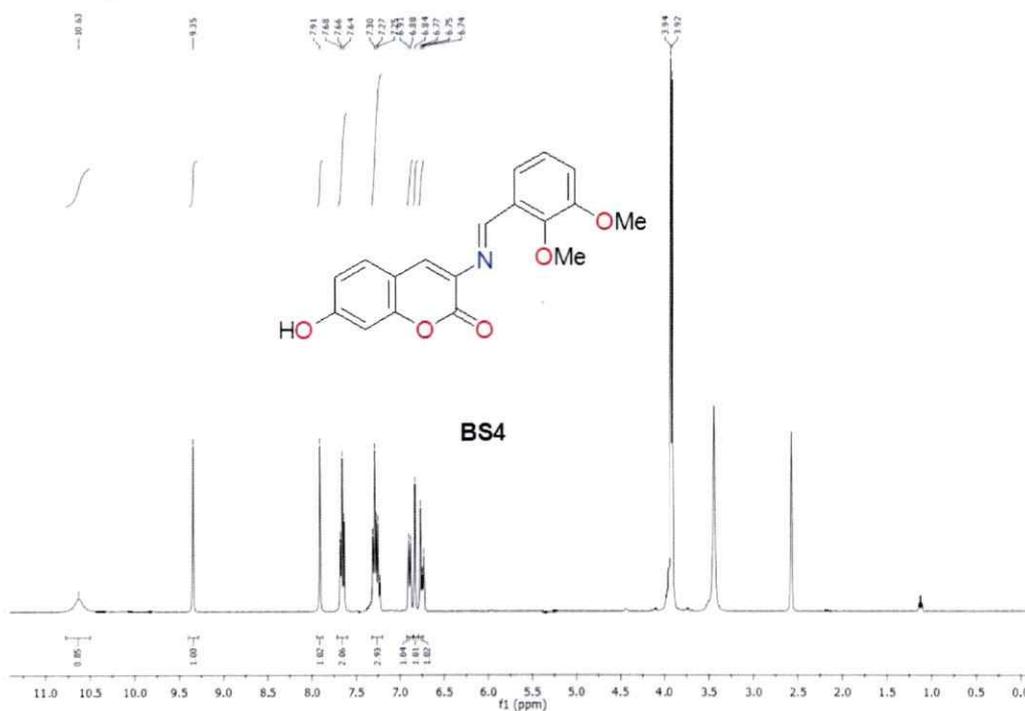
Anexo 3a. Espectro ^1H RMN del compuesto **Q53**.



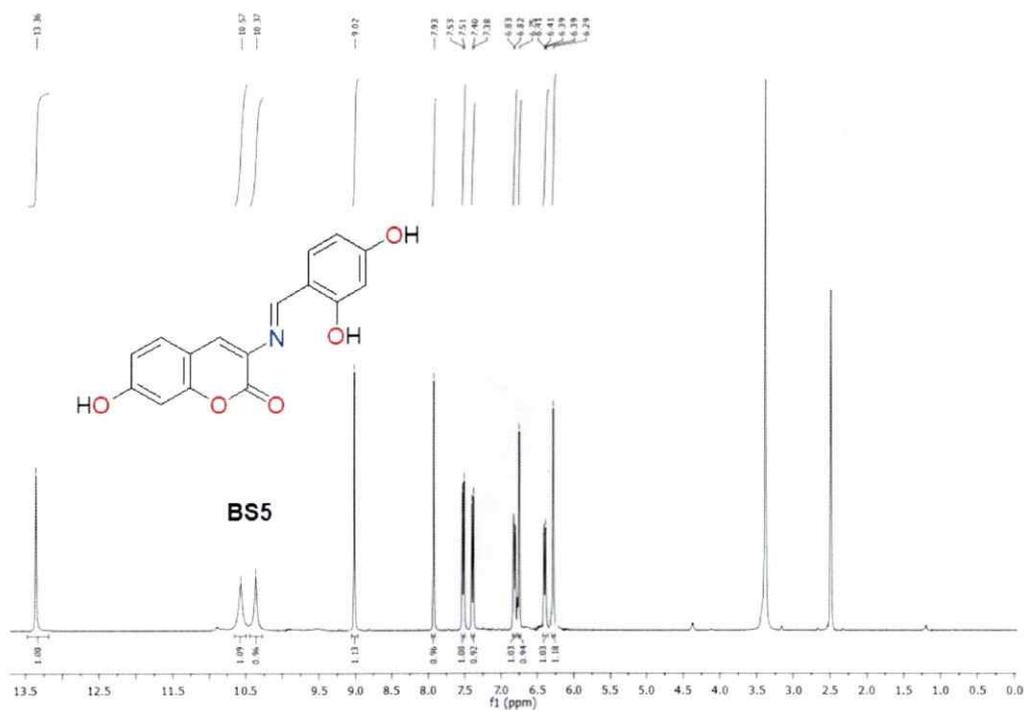
Anexo 3b. Espectro ^{13}C RMN del compuesto **Q53**.



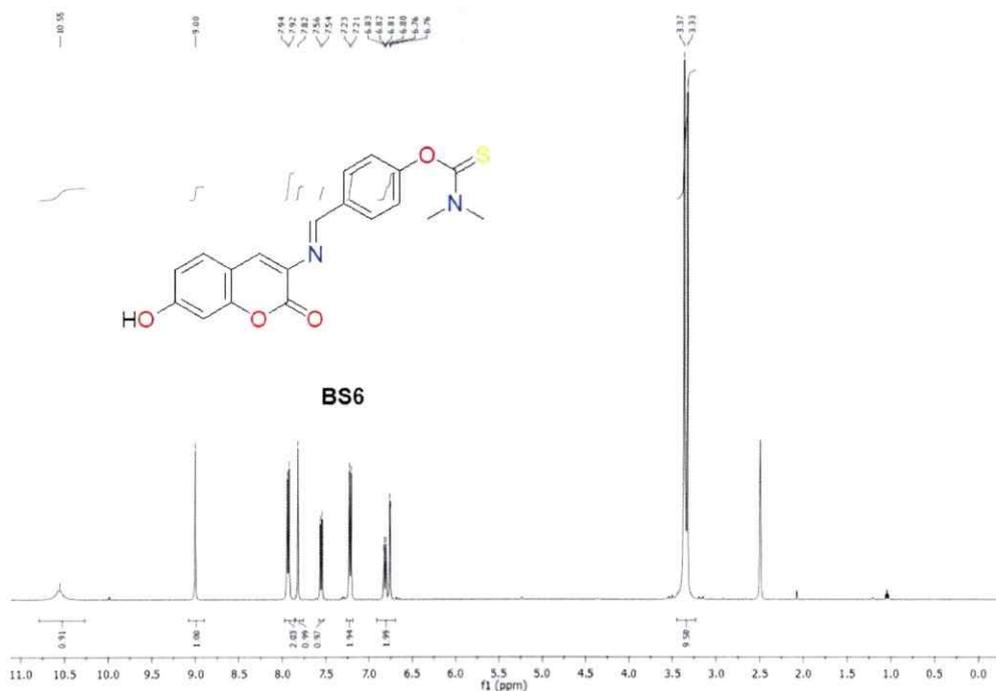
Anexo 6. Espectro ^1H RMN del compuesto **BS3**.



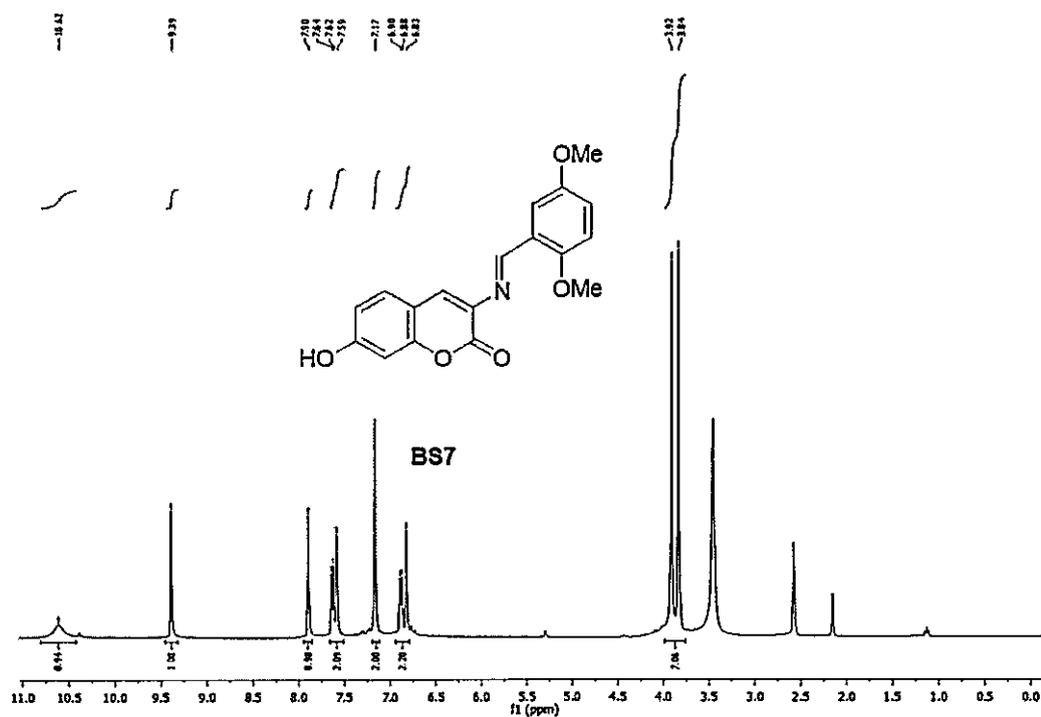
Anexo 7. Espectro ^1H RMN del compuesto **BS4**.



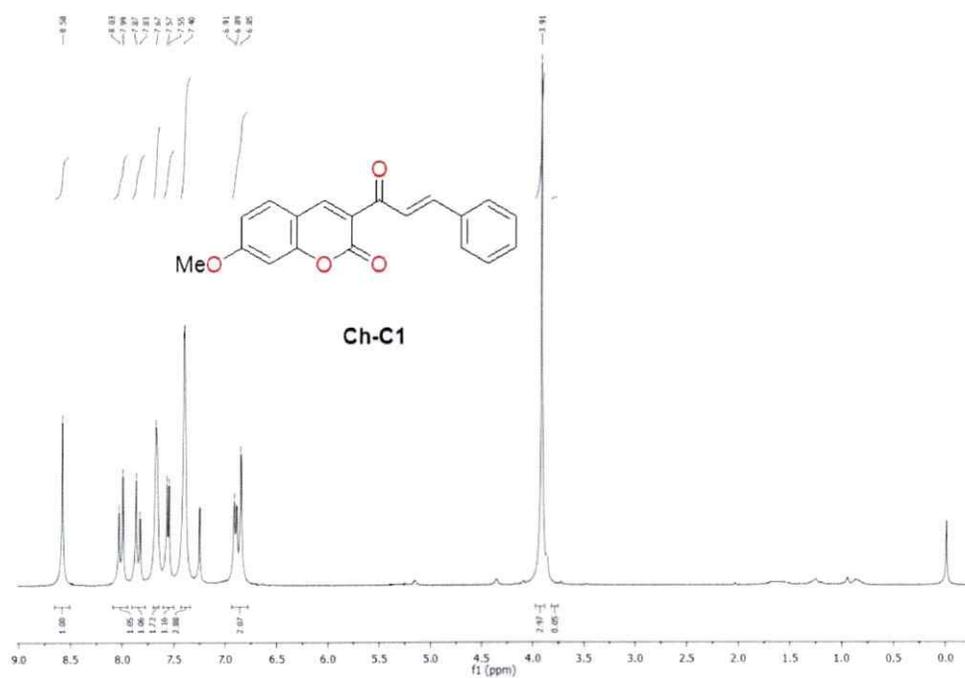
Anexo 8. Espectro ¹H RMN del compuesto **BS5**.



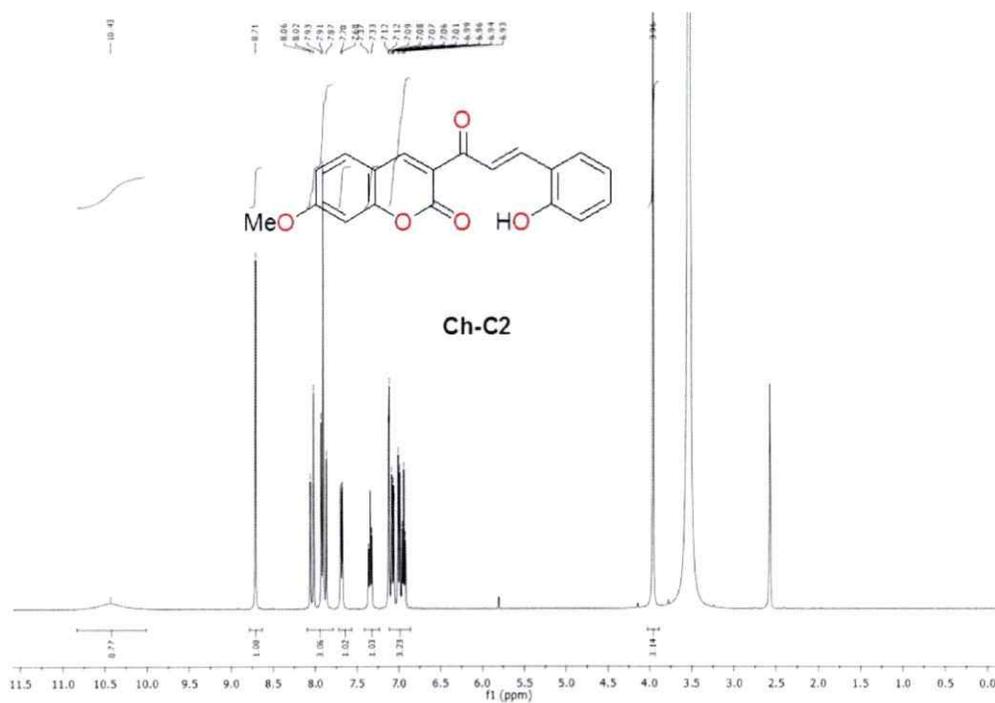
Anexo 9. Espectro ¹H RMN del compuesto **BS6**.



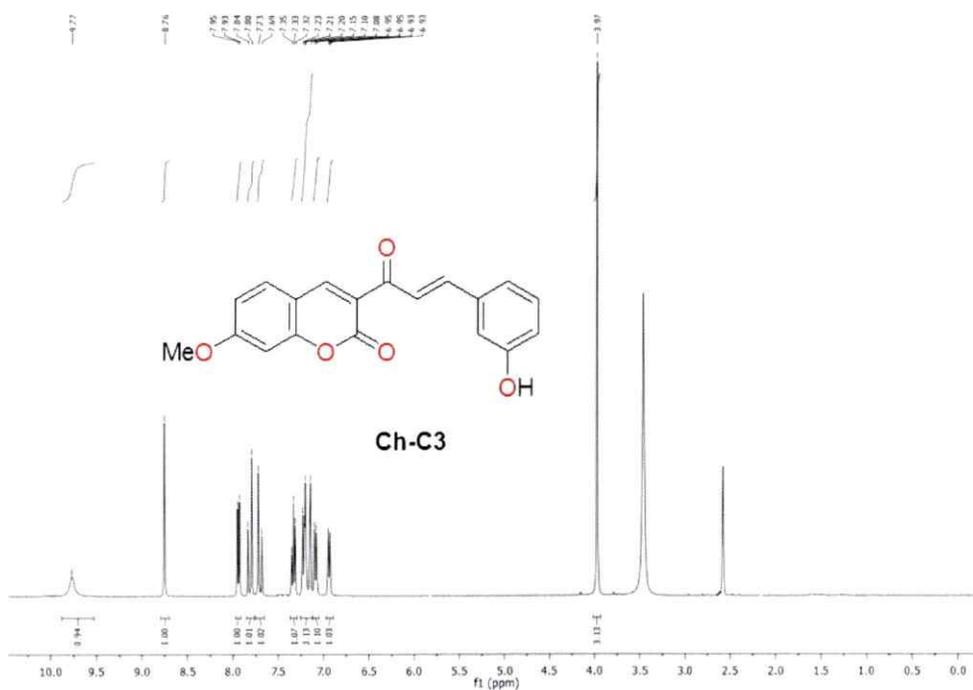
Anexo 10. Espectro ^1H RMN del compuesto BS7.



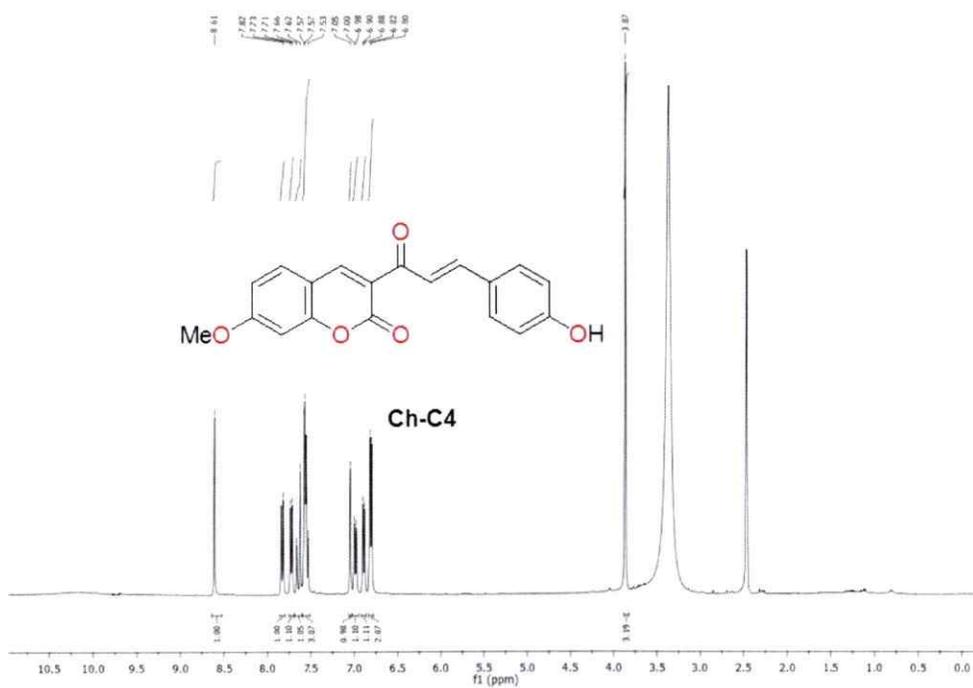
Anexo 11. Espectro ^1H RMN del compuesto **Ch-C1**.



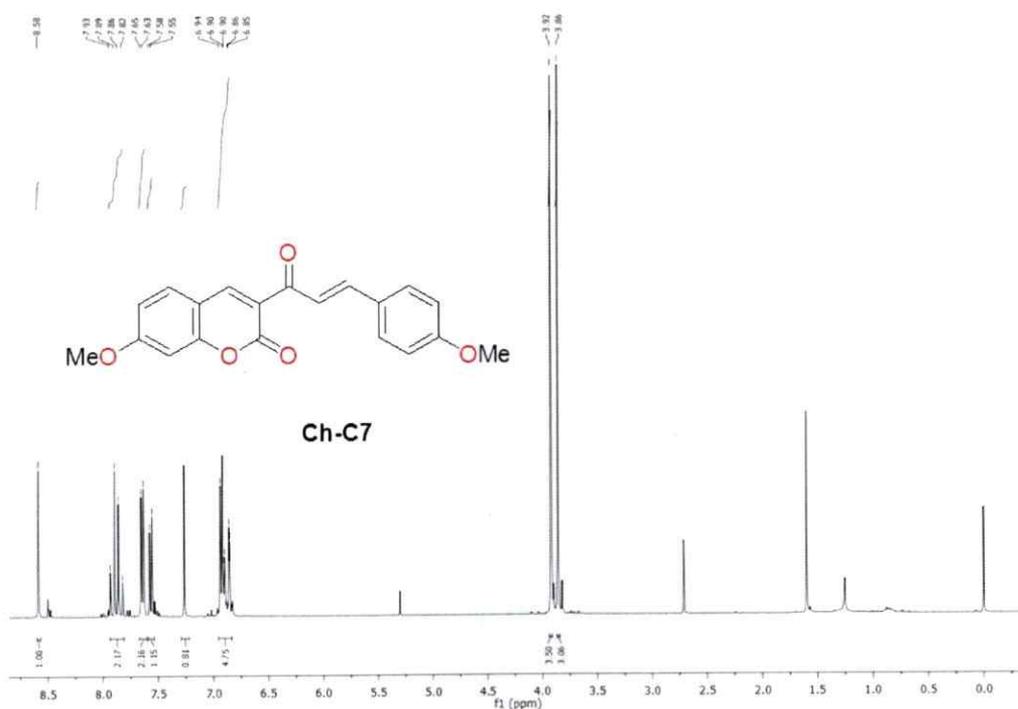
Anexo 12. Espectro ^1H RMN del compuesto **Ch-C2**.



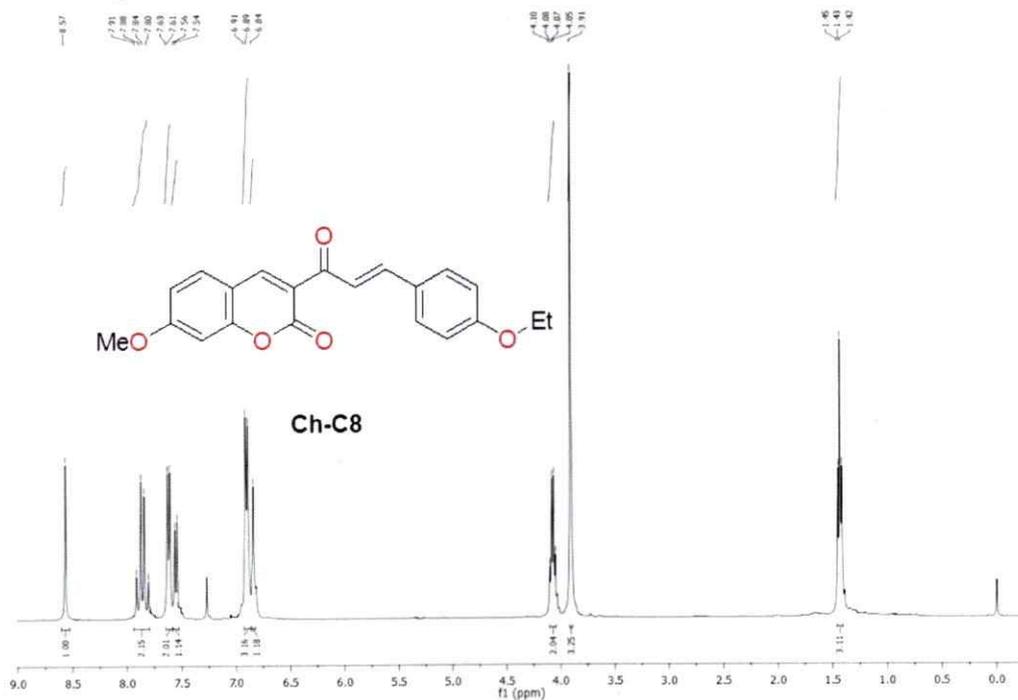
Anexo 13. Espectro ^1H RMN del compuesto **Ch-C3**.



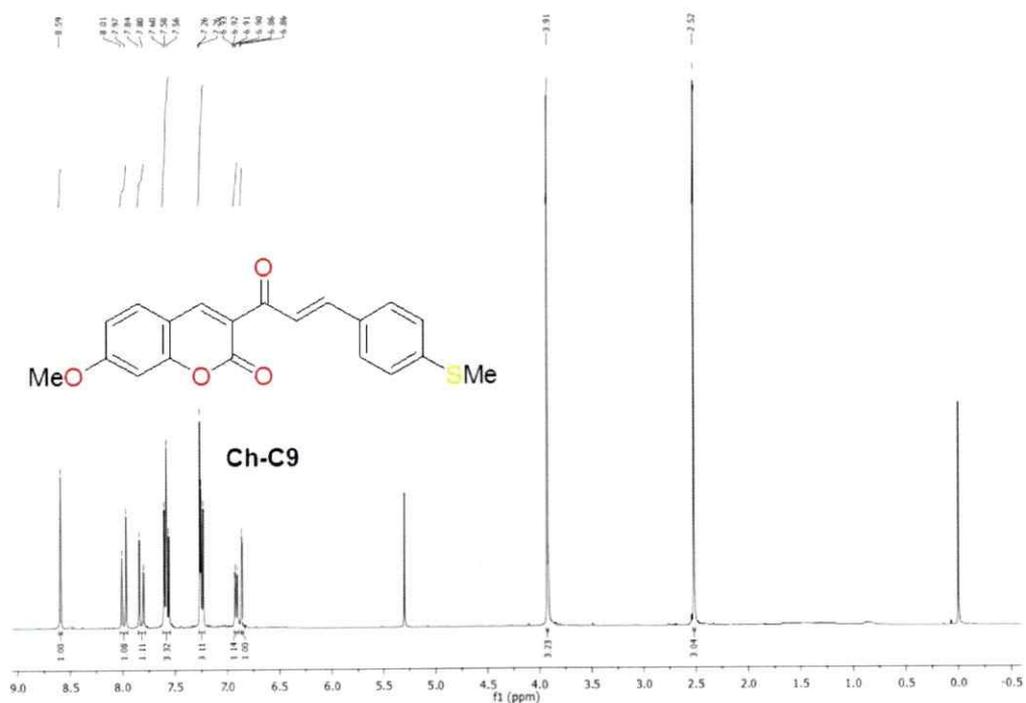
Anexo 14. Espectro ^1H RMN del compuesto **Ch-C4**.



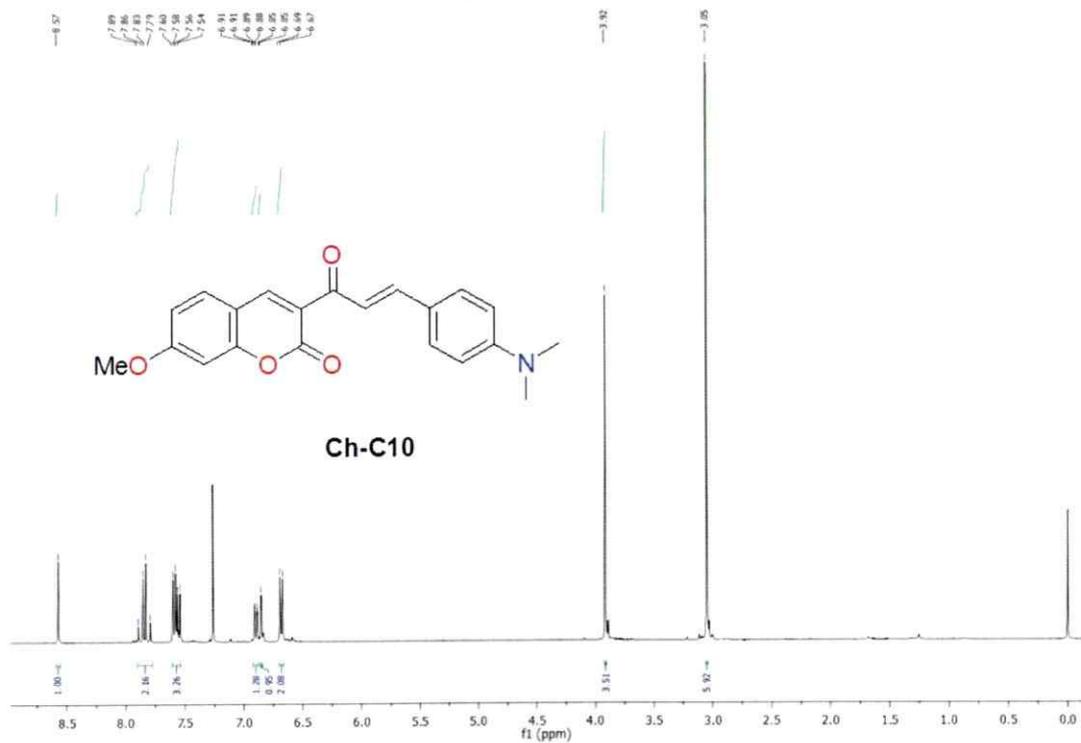
Anexo 17. Espectro ^1H RMN del compuesto **Ch-C7**.



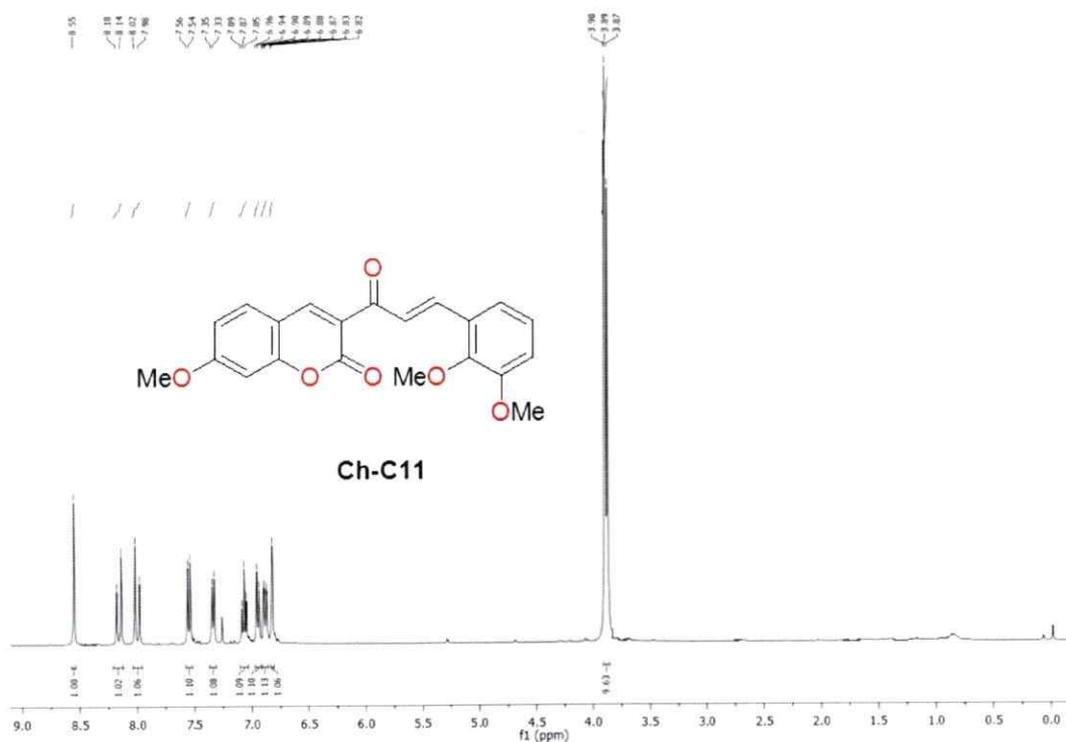
Anexo 18. Espectro ^1H RMN del compuesto **Ch-C8**.



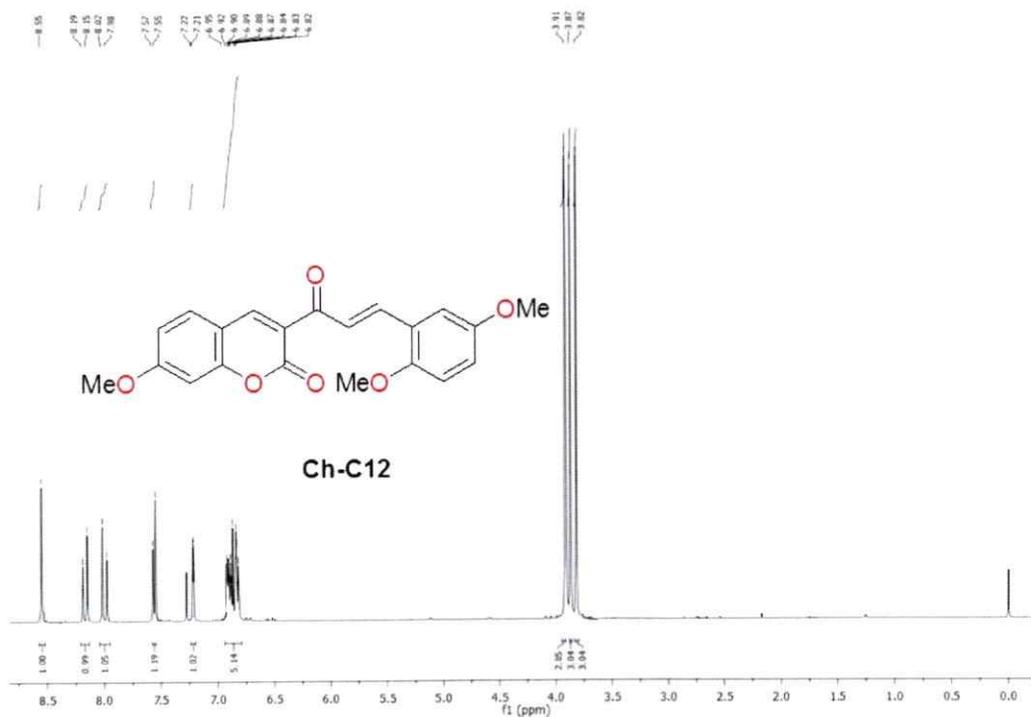
Anexo 19. Espectro ^1H RMN del compuesto **Ch-C9**.



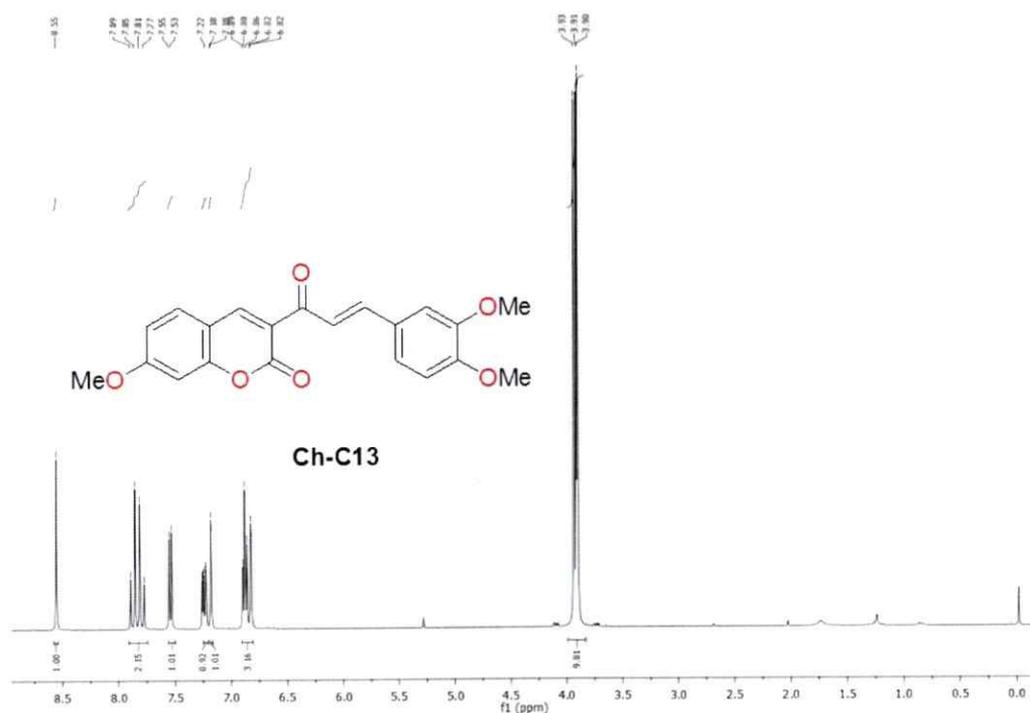
Anexo 20. Espectro ^1H RMN del compuesto **Ch-C10**.



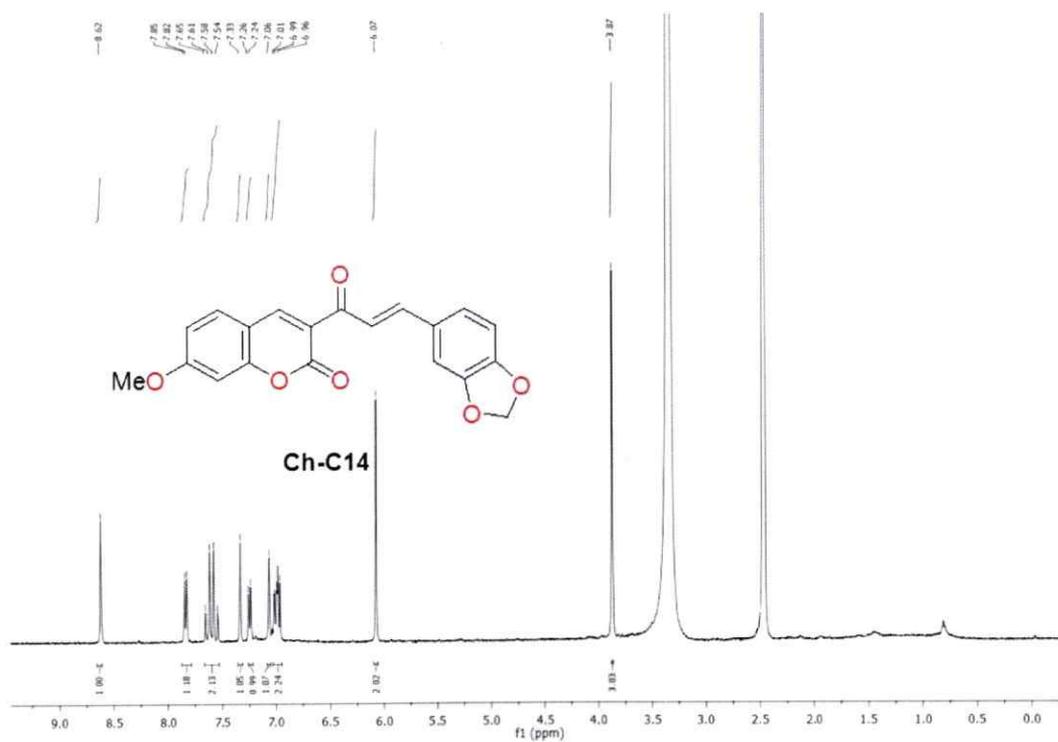
Anexo 21. Espectro ^1H RMN del compuesto **Ch-C11**.



Anexo 22. Espectro ^1H RMN del compuesto **Ch-C12**.



Anexo 23. Espectro ^1H RMN del compuesto **Ch-C13**.

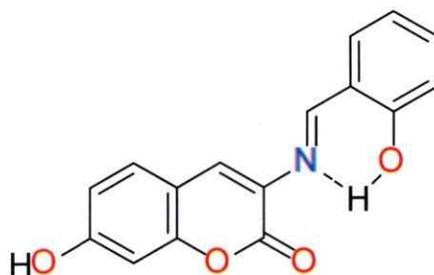


Anexo 24. Espectro ^1H RMN del compuesto **Ch-C14**.

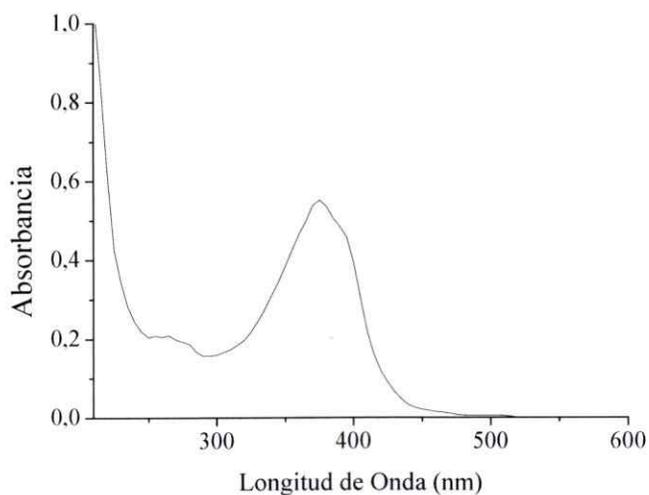
APENDICES

(3E)-3-(2-Hidroxibencilidenamino)-7-hidroxi-2H-cromen-2-ona (BS1).

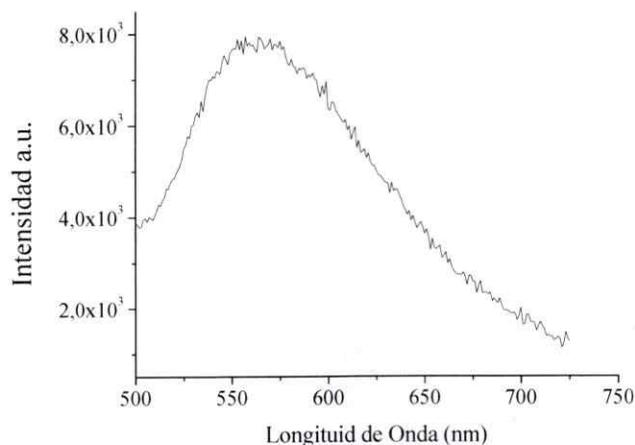
El estudio realizado sobre el compuesto muestra sus principales características espectroscópicas (Gráficos 1 y 2) (Tabla 1), como también el comportamiento que presenta éste ante la presencia de Fe^{+2} , Fe^{+3} y otros iones de interés biológico como Ca^{+2} , Co^{+2} , Cu^{+2} , Zn^{+2} , Mg^{+2} , Mn^{+2} y metales pesados como Cd^{+2} , Pb^{+2} y Hg^{+2} . Un estudio análogo se hizo para los compuestos **BS2**, **BS3**, **BS4**, **BS5** y **BS6**.



BS1

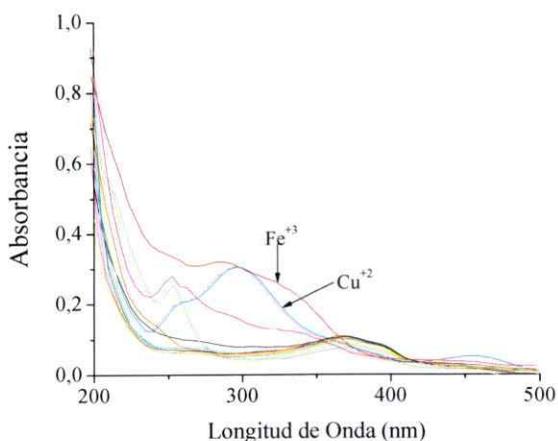


Graf. 1. Espectro de absorción de **BS1** 10 μM en acetonitrilo.



Graf. 2. Espectro de fluorescencia de **BS1** 20 μM en acetonitrilo.

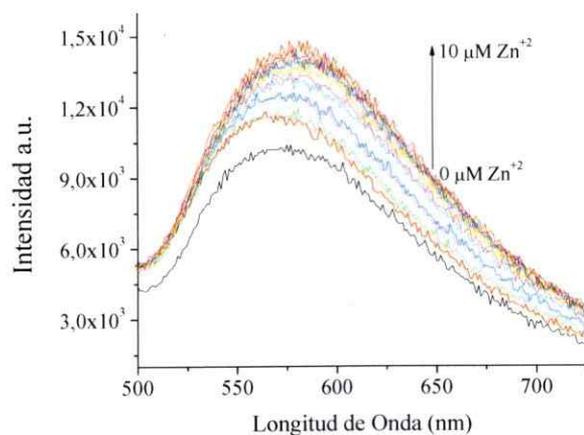
Los compuestos de esta serie se caracterizan por tener la cumarina conjugada a un anillo aromático a través del doble enlace imino (base de Schiff). Los espectros de absorción con diferentes iones a una concentración de 200 μM (Gráfico 3) muestran que el Cu^{+2} y Fe^{+3} presentan un corrimiento de bandas notorio, mientras que el resto muestra espectros más similares al del compuesto sin metal.



Graf. 3. Espectros de absorción de **BS1** 10 μM con diferentes iones 200 μM en acetonitrilo/ H_2O .

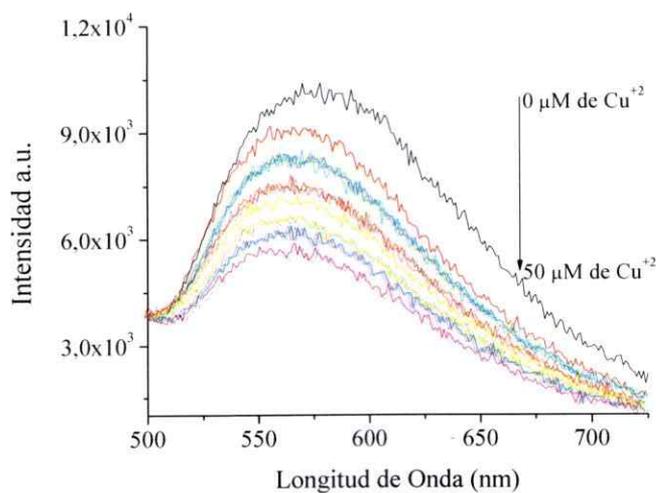
El experimento realizado con diferentes concentraciones de Zn^{+2} (0-10 μM) muestra como a medida que aumenta la concentración de metal aumenta la intensidad de la

fluorescencia originando un leve corrimiento de la banda de emisión hacia el rojo (Gráfico 4)



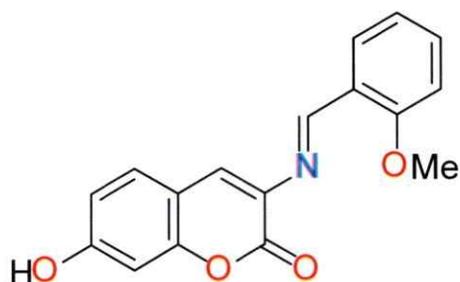
Graf. 4. Espectros de fluorescencia de **BS1** 20 μM con Zn^{+2} 0-10 μM en acetonitrilo/ H_2O .

De igual manera al experimentar con diferentes concentraciones de Cu^{+2} (0-50 μM) se observa como a medida que se aumenta la concentración se presenta una extinción progresiva y la banda de emisión presenta un leve corrimiento hacia el azul (Gráfico 5)



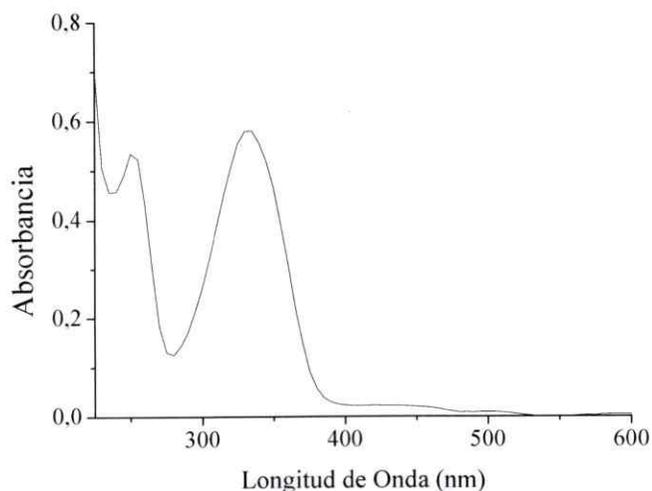
Graf. 5. Espectros de fluorescencia de **BS1** 20 μM con Cu^{+2} 0-50 μM en acetonitrilo/ H_2O .

(3E)-3-(2-Metoxibencilidenamino)-7-hidroxi-2H-cromen-2-ona (BS2).

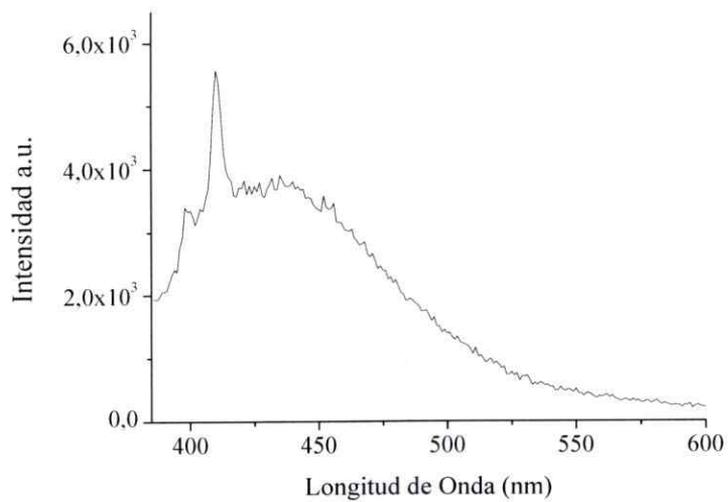


BS2

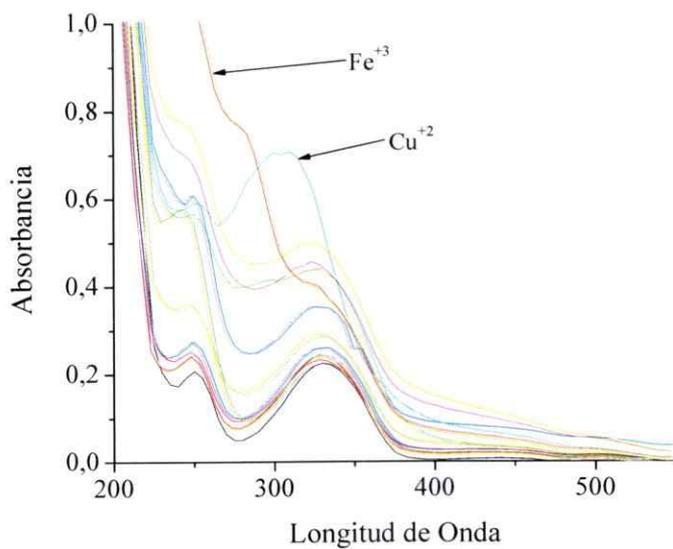
Las características espectroscópicas de **BS2** se encuentran en los Gráficos 6 y 7 (Tabla 1). Los espectros de absorción con diferentes iones a una concentración de 200 μM (Gráfico 8) no muestran cambios importantes debido a que las variaciones que se observan se deben a la absorción que muestran las sales a dicha longitud de onda. Las sales de Cu^{+2} y Fe^{+3} presentan un corrimiento de bandas, mientras que el resto muestra una banda igual que la presentada por el compuesto sin metal.



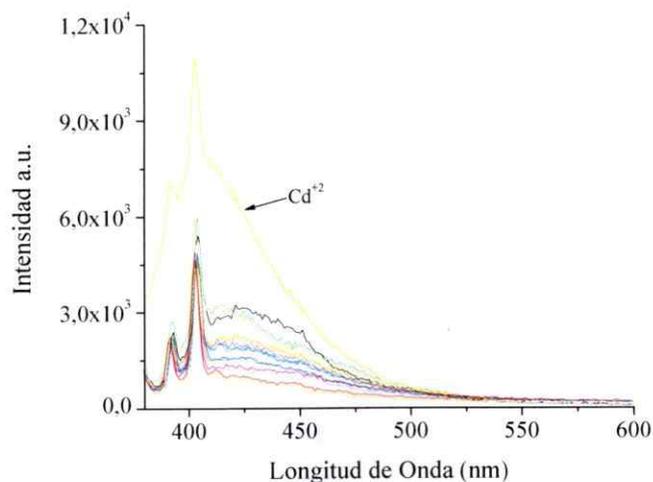
Graf. 6. Espectro de absorción de **BS2** 10 μM en acetonitrilo.



Graf. 7. Espectro de fluorescencia de **BS2** 20 μM en acetonitrilo.



Graf. 8. Espectros de absorción de **BS2** 10 μM con diferentes iones 200 μM en acetonitrilo/ H_2O .

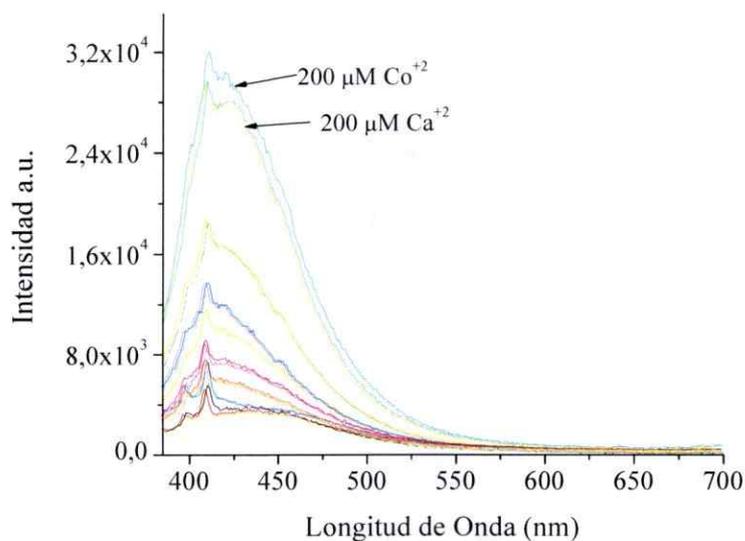


Graf. 23. Espectros de fluorescencia de **BS6** 20 μM con diferentes iones 200 μM en acetonitrilo/ H_2O .

Tabla 1. Propiedades fotofísicas de **BS1-BS6**.

Compuesto	Abs λ_{max} (nm)	Fluor λ_{max} (nm)	ϵ_{max} ($\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$)	Φ	τ (ns)	Stokes (cm^{-1})
BS1	375	579	4500	N.D.	0,49	9425
BS2	330	456	20020	N.D.	0,61	8374
BS3	370	420	30133	N.D.	0,52	3218
BS4	363	420	27990	N.D.	1,66	3968
BS5	330	405	31353	N.D.	0,77	5612
BS6	380	420	16021	N.D.	1,66	2506

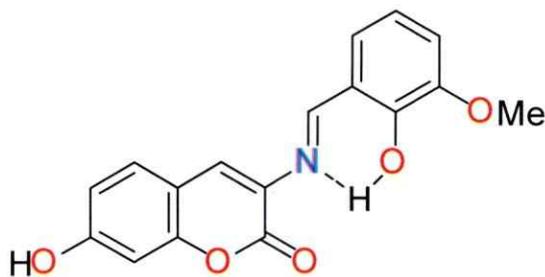
Sin embargo, este compuesto presenta un aumento de fluorescencia con los iones Co^{+2} y Ca^{+2} , aunque este aumento no es muy selectivo dado que otros iones producen también algún grado de aumento de la intensidad (Gráfico 9).



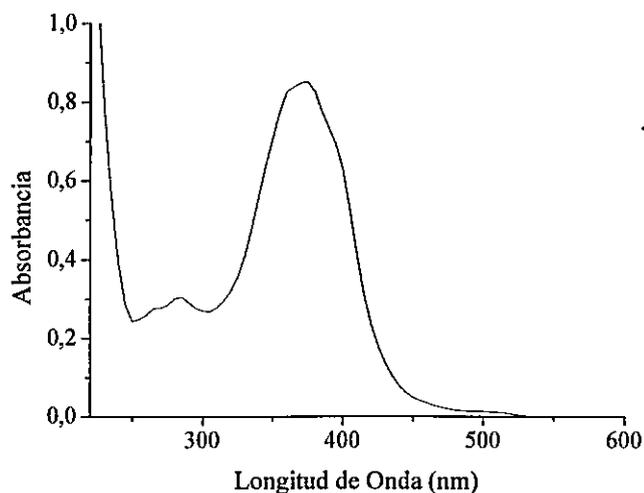
Graf. 9. Espectros de emisión de **BS2** 20 μM con diferentes iones 200 μM en acetonitrilo/ H_2O .

(3E)-3-(2-Hidroxi-3-metoxibencilidenamino)-7-hidroxi-2H-cromen-2-ona (BS3).

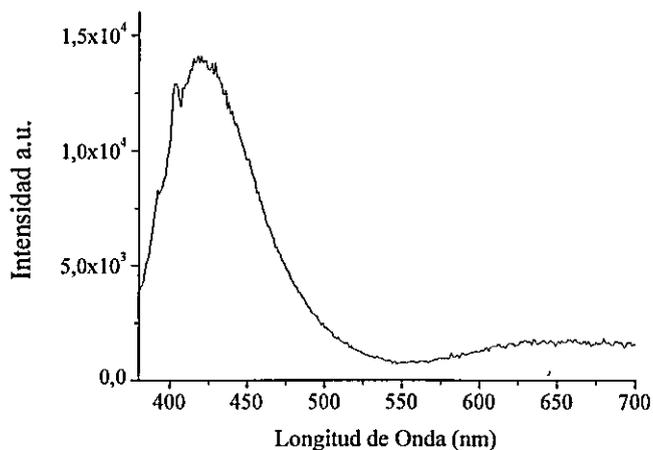
Las características espectroscópicas son apreciadas en los Gráficos 10 y 11 (Tabla 1).



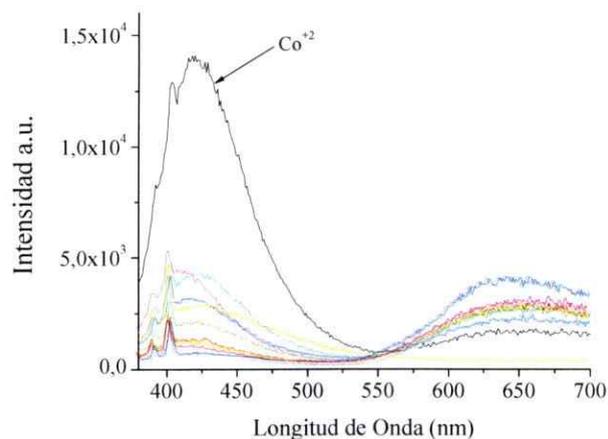
El compuesto presenta un aumento de fluorescencia con el ion Co^{+2} (Gráfico 12), muy significativo al compararlo con los efectos de otros iones. Sin embargo, el estudio no se profundizó debido a que el cobalto no era un metal de interés en este trabajo.



Graf. 10. Espectro de absorción de BS3 20 μM en acetonitrilo.

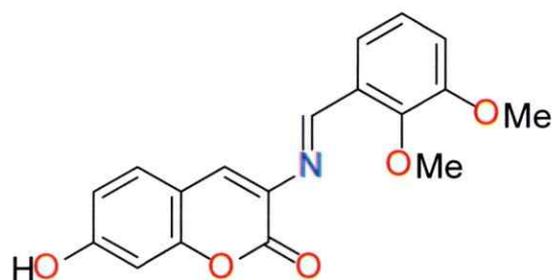


Graf. 11. Espectro de fluorescencia de BS3 20 μM en acetonitrilo.



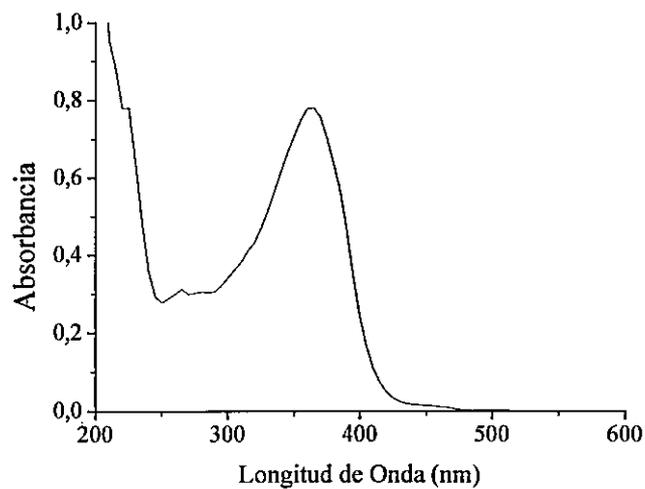
Graf. 12. Espectros de fluorescencia de **BS3** 10 μM con diferentes iones 200 μM en acetonitrilo.

(3E)-3-(2,3-Dimetoxibencilidenamino)-7-hidroxi-2H-cromen-2-ona (BS4).

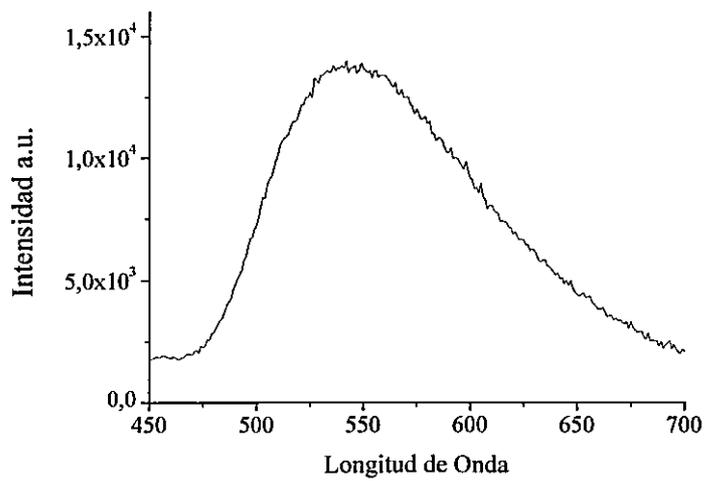


BS4

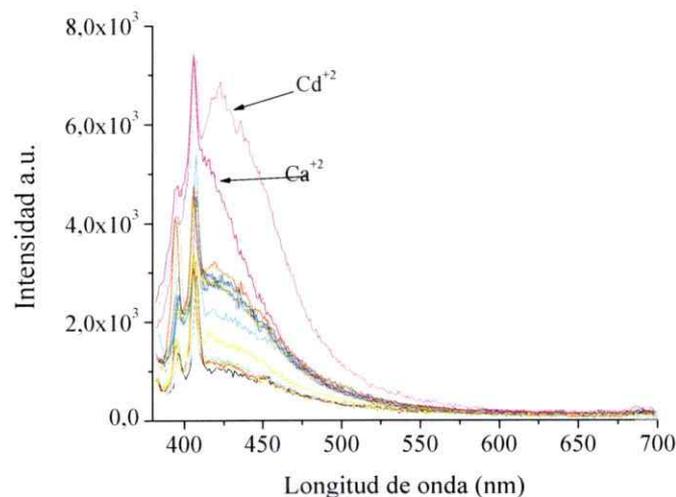
Sus principales características fotofísicas se encuentran en los Gráficos 13-14 (Tabla 1). Al ensayar los efectos de diferentes metales (Gráfico 15), se observa que Ca^{+2} y Cd^{+2} aumentan la intensidad de la fluorescencia. Este aumento se da a diferentes longitudes de onda: para Ca^{+2} la banda de emisión se presenta en la misma longitud de onda de la banda original, mientras que con Cd^{+2} presenta un corrimiento al rojo. El aumento de la fluorescencia no es específico debido a que los otros iones ocasionan también un leve aumento de la fluorescencia.



Graf. 13. Espectro de absorción de BS4 10 μM en acetonitrilo.

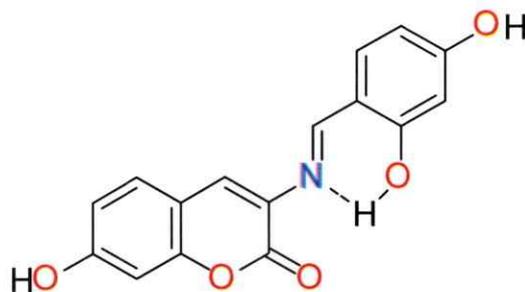


Graf. 14. Espectro de fluorescencia de BS4 20 μM en acetonitrilo.



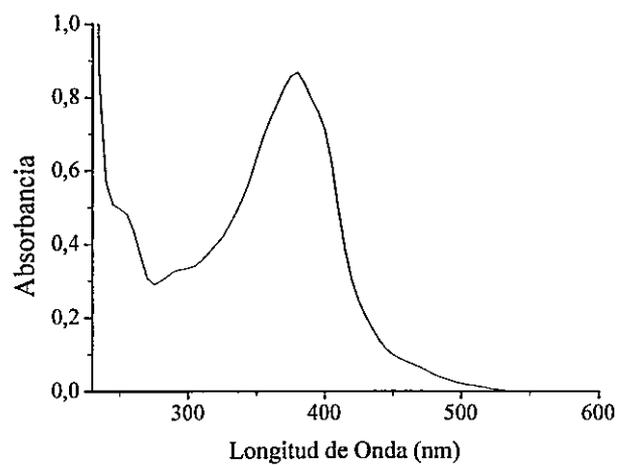
Graf. 15. Espectros de fluorescencia de **BS4** 20 μM con diferentes iones 200 μM en acetonitrilo/ H_2O .

(3E)-3-(2,4-Dihidroxibencilidenamino)-7-hidroxi-2H-cromen-2-ona (BS5).

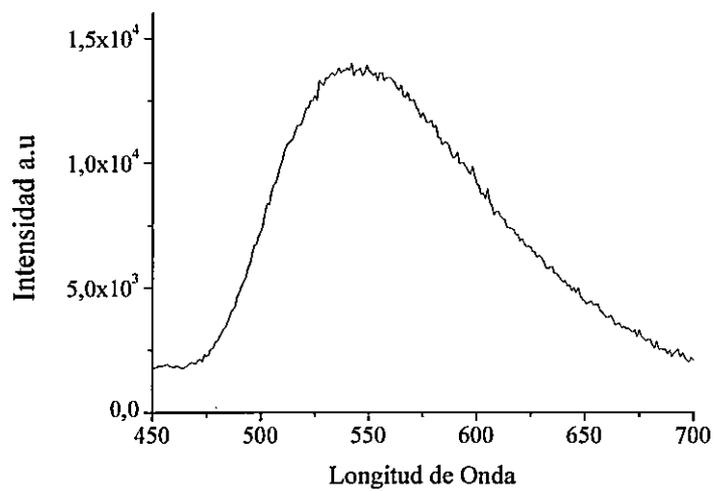


BS5

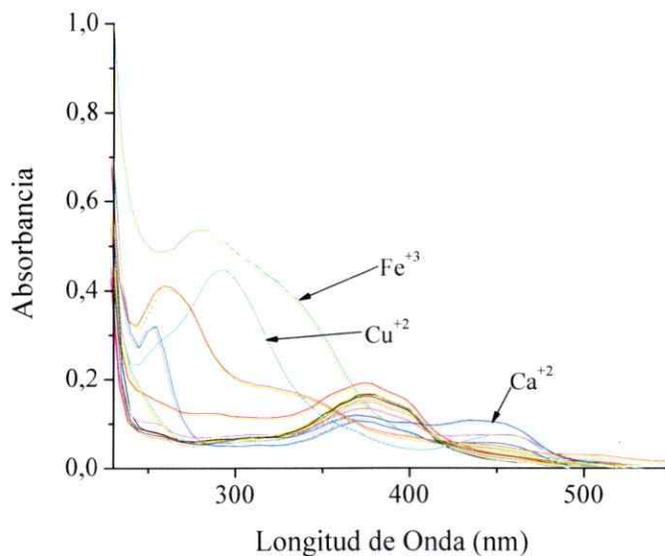
Principales características: Gráficos 16 y 17 (Tabla 1). Los espectros de absorción del compuesto con diferentes iones a una concentración de 200 μM (Gráfico 18) muestran cambios principalmente con Cu^{+2} y Fe^{+3} . Asimismo se observa la aparición de una banda alrededor de los 450 nm al agregar Ca^{+2} .



Graf. 16. Espectro de absorción de **BS5** 10 μM en acetonitrilo.

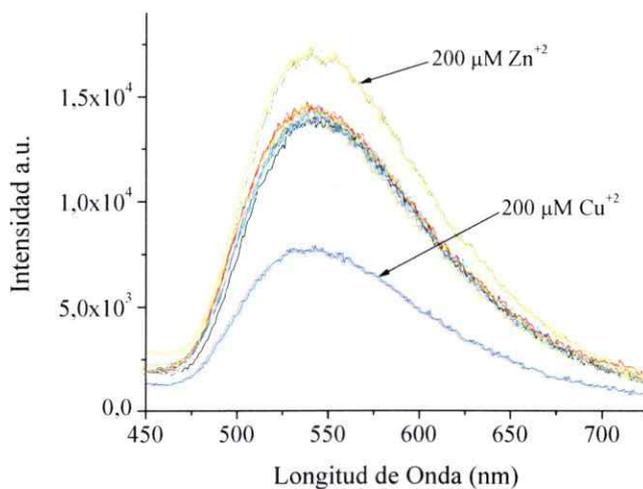


Graf. 17. Espectro de fluorescencia de **BS5** 20 μM en acetonitrilo.



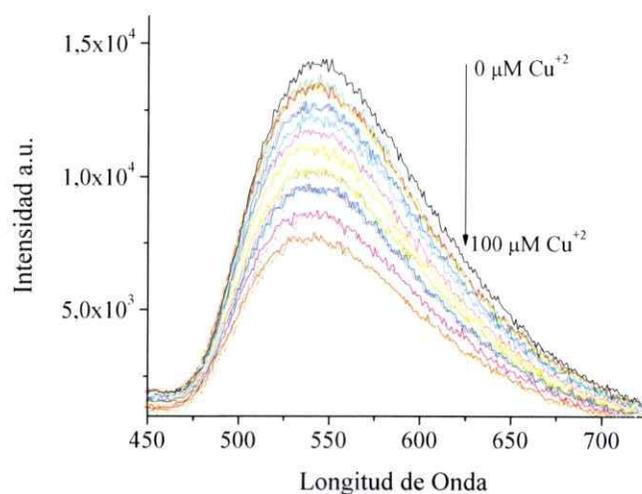
Graf. 18. Espectros de absorción de **BS5** 10 μM con diferentes iones 200 μM en acetonitrilo/ H_2O .

Al hacer el ensayo con diferentes metales (Gráfico 19), se ve que con Zn^{+2} se presenta un aumento de fluorescencia mientras que con Cu^{+2} hay una extinción bastante significativa, manteniendo la longitud de onda de emisión del compuesto sin apagar.



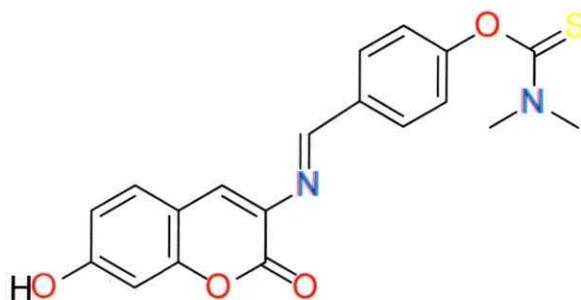
Graf. 19. Espectros de fluorescencia de **BS5** 10 μM con diferentes iones 200 μM en acetonitrilo/ H_2O .

Al ensayar diferentes concentraciones de Cu^{+2} (0-100 μM) se observa como a medida que se aumenta la concentración se presenta una extinción progresiva sin otras alteraciones de la banda de emisión (Gráfico 20)



Graf. 20. Espectros de fluorescencia de **BS5** 20 μM con Cu^{+2} 0-100 μM en acetonitrilo/ H_2O .

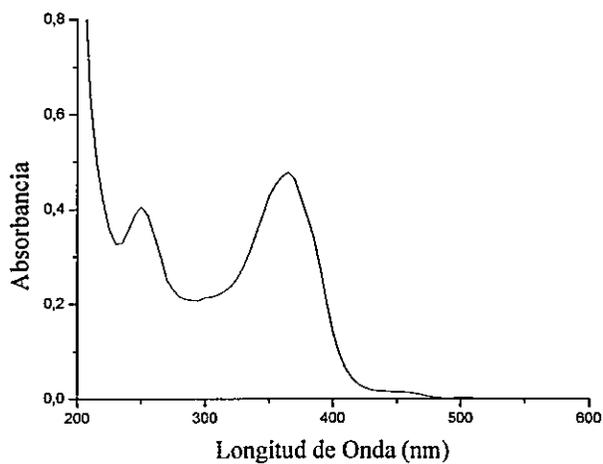
***O*-4-((*1E*)-(7-Hidroxi-2-oxo-2*H*-cromen-3-ilimino)metil)fenil-*N,N*-dimetiltiocarbamato (BS6).**



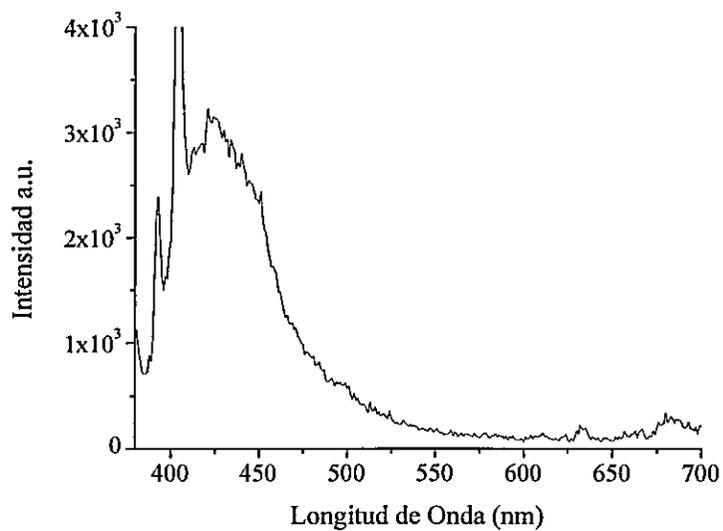
BS6

Sus principales características fotofísicas son mostradas en los Gráficos 21 y 22 (Tabla 1). De los diferentes metales ensayados, sólo el ion Cd^{+2} origina un aumento notable de

la intensidad de la fluorescencia y además un leve desplazamiento hacia el azul (Gráfico 23).



Graf. 21. Espectro de absorción de BS6 10 μ M en acetonitrilo.



Graf. 22. Espectro de fluorescencia de BS6 20 μ M en acetonitrilo.