

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL PERÚ
ESCUELA DE POSGRADO



**SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE UN COMPLEJO QUELATO
DE COBRE(II) BASADO EN UN LIGANDO DEL TIPO BASE DE
SCHIFF Y DERIVATIZADO CON GRUPOS AFINES A LAS PLACAS
A β -AMILOIDES PARA ESTABLECER UN RADIOMARCADOR “PET”
ALTERNATIVO EN EL DIAGNÓSTICO DEL ALZHEIMER**

TESIS PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE MAGÍSTER EN
QUÍMICA

AUTOR

Augusto Guillermo Huiza Rojas

ASESOR

Paloma Friedda Salas Fernández

Agosto, 2019

RESUMEN

En el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer con tomografía por emisión de positrones (PET), la principal problemática radica en el uso de radioisótopos tradicionales (^{18}F , ^{11}C) los cuales limitan el correcto desempeño de los agentes de imagen PET sobre las placas A β -amiloides. El [^{11}C]-PIB, el [^{18}F]-florbetapir y el [^{18}F]-florbetaben representan algunos ejemplos de lo mencionado. Actualmente, los complejos quelatos de radioisótopos de metales de transición prometen ser una tentadora y potencial solución para tal problemática. De este grupo destacan los quelatos radiomarcados con ^{64}Cu y compatibles con las placas A β . Sin embargo, la gran mayoría de estos casos todavía no son del todo exitosos. Por esta razón, y en base a las nuevas necesidades, se propone un nuevo complejo de cobre(II) basado en un ligando con grupos afines a las placas A β -amiloides cuya formación involucra cuatro etapas sintéticas. La formación del nuevo complejo se basa en la aplicación del efecto *template* o “plantilla” por parte del cobre(II); de esta manera, se logra producir un producto de alta pureza y con un rendimiento de 92 %. En base a los resultados de la caracterización por espectroscopías FT-IR, UV-VIS y de fluorescencia, y espectrometría ESI-MS, se concluye que el nuevo complejo de cobre(II) presenta una estructura del tipo quelato, cuyo centro metálico es probablemente tetracoordinado, con geometría cuadrada plana dada por los átomos dadores (N,N,O,O) de un ligando tipo base de Schiff simétrico y derivatizado con restos de benzotiazol con potencial capacidad de afinidad sobre las placas A β -amiloides. De esta manera y en base a la nueva propuesta química, se podría establecer un futuro radiomarcador “PET” de interés para el diagnóstico del Alzheimer.

Palabras claves: Enfermedad de Alzheimer, PET, placas A β -amiloides, quelato, cobre, efecto *template*, base de Schiff.

ABSTRACT

In the diagnosis of Alzheimer's disease with positron emission tomography (PET), the main problem lies in the use of traditional radioisotopes (^{18}F , ^{11}C) which limit the correct performance of imaging agents PET on A β -amyloid plaques. [^{11}C]-PIB, [^{18}F]-florbetapir and [^{18}F]-florbetaben represent some examples of the above. Currently, complex chelates of transition metal radioisotopes show promise as a potential solution to this problem. In this group, the chelates radiolabelled with ^{64}Cu and compatible with the A β plaques stand out. However, the majority of them are still not entirely successful. For this reason, and based on the current demands, a novel copper(II) complex with a ligand based on the same groups that have showed affinity for the A β -amyloid plaques have been synthesized in four synthetic steps. The formation of this complex is based on the application of the *template* effect by copper(II) to produce a compound of high purity and with a yield of 92 %. Based on the results of the characterization by FT-IR, UV-VIS and fluorescence spectroscopy and ESI-MS spectrometry, we can conclude that the new copper(II) complex has a chelate type structure, whose metal center is likely tetracoordinated showing a flat square geometry imposed by the donor atoms (*N,N,O,O*) of a symmetric Schiff base ligand derivatized with benzothiazole residues, with potential affinity for A β -amyloid plaques. Therefore, we propose this compound could be a future possible "PET" radioagent for the diagnosis of Alzheimer's disease.

Keywords: Alzheimer's disease, PET, A β -amyloid plaques, chelate, copper, *template* effect, Schiff base.

“Hoy no pierdo esta batalla porque sé que lo que he luchado no es en vano, sino que ayudará a vencer una batalla mayor, la de la detección temprana y prevención de este terrible mal.”

— Soraya —

“Yo aprendí de esos diez días a no mirar la montaña en la vida, sino mirar el paso siguiente....que a veces cuando el cuerpo dice no, el alma tiene que decir un paso más.”

— Roberto Canessa —

“El gran mérito de nuestra historia fue haberle dicho que sí al no, siempre con humildad, actitud y sentido del humor.”

— Carlos Paez —

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a los seres que me dieron la vida con amor, a los que sin nada a cambio me dieron casi todo con tan poco, a los que forjaron mi educación con esmero y dedicación, a los que vieron de mí cuando yo era un pequeño y a los que veré cuando sea grande, agradezco porque ustedes sean mis padres, Augusto y Yaqueline. Asimismo, quiero agradecer inmensamente a mi compañera de sangre, de juegos y del alma, te agradezco porque me has enseñado a ser no cualquier hermano, sino el hermano mayor, el “estudiosito” como me sueles llamar, y por todo tu aliento incondicional para culminar con éxito esta tesis, gracias hermana Vivian.

Aprendí química a los doce años de edad o quizás antes, no lo sé, fue tal vez en la clase del profesor Marcos Monzón en el colegio Fe y Alegría N° 2, o cuando leí por primera vez el inspirador libro de aquel tío que nunca conocí. Descubrir y explorar un mundo más allá del que podemos ver, hizo que comenzara un viaje sin retorno, un viaje acompañado de átomos y moléculas, un viaje al subconsciente de la naturaleza, un viaje que no conoce aún final. Ha sido tal vez en esta etapa de mi posgrado cuando descubrí realmente que aquel viaje no sería en vano y que ha valido la pena sentir en vez de creer. Sería injusto de mi parte, que durante los peores momentos de esta escala viajera que representó mi maestría, no reconociera la calidad humana, el ejemplo, y las enseñanzas de sus maestros, mis maestros. Yo tuve la fortuna de toparme con gentes así cuando fue oscuro mi claro, cuando fue dolor mi placer y cuando fue decepción mi pasión. En ese sentido, agradezco infinitamente a quien a ha sido en todo momento mi profesora y asesora, Paloma Salas, gracias por su apoyo constante, por sus conocimientos y por su comprensión en este camino que sabemos no ha sido fácil. Del mismo modo, agradezco al resto de profesores y personal técnico por estar siempre dispuestos con gratos conocimientos y sabios consejos.

Mención aparte, quiero agradecer profundamente a quienes han reconfortado y alegrado el presente camino con nuevas experiencias, incondicionales colaboraciones y buenas anécdotas; por tal, agradezco a mis compañeros de carrera, a Deborah, Diego, Enzo, Gustavo, Sandy y Nona. Gracias a todos.

Por último y no menos importante, agradezco al Fondo Nacional de Desarrollo Científico, Tecnológico y de Innovación Tecnológica (FONDECYT) como unidad ejecutora del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONCYTEC), en virtud del convenio de gestión N° 231-2015-FONDECYT, por subvencionarme una beca integral en el programa de Maestría en Química de la Pontificia Universidad Católica del Perú.

ÍNDICE GENERAL

1.	INTRODUCCIÓN	1
2.	PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	3
3.	OBJETIVOS	4
	3.1. General.....	4
	3.2. Específicos	4
4.	MARCO TEÓRICO	5
	4.1. Enfermedad de Alzheimer (EA)	5
	4.2. Desarrollo farmacológico en el diagnóstico del Alzheimer sobre las placas A β -amiloides con moléculas simples y radioactivadas	6
	4.3. Complejos quelatos de radioisótopos metálicos usados como agentes de imagen PET en el diagnóstico de enfermedades	10
	4.4. Radiocomplejos de cobre(II) como potenciales agentes de imagen PET en el diagnóstico del Alzheimer	15
5.	PROPUESTA DE INVESTIGACIÓN	18
6.	METODOLOGÍA	19
	6.1. Primera etapa: síntesis, purificación y caracterización del precursor 2-(1,3-benzotiazol-2-il)fenol (A)	19
	6.2. Segunda etapa: síntesis, purificación y caracterización del precursor 3-(1,3-benzotiazol-2-il)-2-hidroxibenzaldehído (B).....	19
	6.3. Tercera etapa: síntesis, purificación y caracterización del ligando tipo base de Schiff (C).....	19
	6.4. Cuarta etapa: síntesis, purificación y caracterización del complejo quelato de cobre(II)	20
7.	PARTE EXPERIMENTAL	22
	7.1. Equipos, reactivos y solventes	22
	7.2. Procedimientos.....	24
	7.2.1. Ligando tipo base de Schiff.....	24
	7.2.1.1. Primera etapa: síntesis y purificación del precursor 2-(1,3-benzotiazol-2-il)fenol (A).....	24
	7.2.1.2. Segunda etapa: síntesis y purificación del precursor 3-(1,3-benzotiazol-2-il)-2-hidroxibenzaldehído (B)	25
	7.2.1.3. Tercera etapa: síntesis y purificación del ligando 2,2'-{propano-1,3-diilbis[nitrilo(<i>E</i>)metililideno]}bis[6-(1,3-benzotiazol-2-il)fenol] (C)	26
	7.2.2. Complejo quelato de cobre(II).....	27

7.2.2.1. Cuarta etapa: síntesis <i>template</i> del complejo quelato [2,2'-{propano-1,3-diilbis[nitrilo(E)metililideno]}bis[6-(1,3-benzotiazol-2-il)fenolato]- κ^4 -N,N',O,O']cobre(II) (D)	27
7.3. Ensayos de cristalización del complejo quelato de cobre(II)	28
7.3.1. Método 1: evaporación/enfriamiento gradual	28
7.3.2. Método 2: difusión de vapor	28
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
8.1. Síntesis y purificación	29
8.1.1. Ligando tipo base de Schiff	29
8.1.1.1. Primera etapa: síntesis y purificación del precursor 2-(1,3-benzotiazol-2-il)fenol (A)	29
8.1.1.2. Segunda etapa: síntesis y purificación del precursor 3-(1,3-benzotiazol-2-il)-2-hidroxibenzaldehído (B)	32
8.1.1.3. Tercera etapa: síntesis y purificación del ligando 2,2'-{propano-1,3-diilbis[nitrilo(E)metililideno]}bis[6-(1,3-benzotiazol-2-il)fenol] (C)	36
8.1.2. Complejo quelato de cobre(II)	39
8.1.2.1. Cuarta etapa: síntesis <i>template</i> del complejo quelato [2,2'-{propano-1,3-diilbis[nitrilo(E)metililideno]}bis[6-(1,3-benzotiazol-2-il)fenolato]- κ^4 -N,N',O,O']cobre(II) (D)	39
8.1.2.2. Ensayos de cristalización	42
8.2. Caracterización	43
8.2.1. Primer precursor sintético 2-(1,3-benzotiazol-2-il)fenol (A)	43
8.2.1.1. Espectroscopía infrarroja (FT-IR)	43
8.2.1.2. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) ..	46
8.2.1.3. Espectrometría de masas	49
8.2.2. Segundo precursor sintético 3-(1,3-benzotiazol-2-il)-2-hidroxibenzaldehído (B)	50
8.2.2.1. Espectroscopía infrarroja (FT-IR)	50
8.2.2.2. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) ..	53
8.2.2.3. Espectrometría de masas	57
8.2.3. Ligando tipo base de Schiff 2,2'-{propano-1,3-diilbis[nitrilo(E)metililideno]}bis[6-(1,3-benzotiazol-2-il)fenol] (C)	58
8.2.3.1. Espectroscopía infrarroja (FT-IR)	58
8.2.3.2. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) ..	61
8.2.3.3. Espectrometría de masas	65
8.2.3.4. Espectroscopía Ultravioleta-Visible	66

8.2.3.5. Espectroscopía de fluorescencia	68
8.2.4. Complejo quelato [2,2'-(propano-1,3- diilbis[nitrilo(<i>E</i>)metilideno]]bis[6-(1,3-benzotiazol-2-il)fenolato]- κ^4 - <i>N,N',O,O'</i>]cobre(II) (D)	70
8.2.4.1. Espectroscopía infrarroja (FT-IR).....	70
8.2.4.2. Espectrometría de masas	74
8.2.4.3. Espectroscopía Ultravioleta-Visible.....	75
8.2.4.4. Espectroscopía de fluorescencia	77
9. CONCLUSIONES	79
10. RECOMENDACIONES	80
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
12. ANEXOS	86



ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1:** Evolución de los biomarcadores (placas A β y NFTs) durante las etapas preclínica y clínica con respecto a la integridad neuronal. **MCI:** defecto cognitivo leve. **CDR:** clasificación clínica de demencia. 5
- Figura 2:** Diagrama esquemático de la producción de péptidos A β_{40-42} de la proteína APP a través de escisiones secuenciales de la β -secretasa y γ -secretasa, y finalmente la consecuente formación de las placas insolubles A β 6
- Figura 3:** Estructuras químicas de la Tioflavina-S, Tioflavina-T y Congo rojo. 7
- Figura 4:** Mecanismo específico de la actividad positrónica en el objetivo biológico (*target*). 8
- Figura 5:** Resumen de las etapas involucradas en una exploración PET. 9
- Figura 6:** Radiomarcadores PET derivados del benzotiazol y estilbeno. 10
- Figura 7:** Radioisótopos de metales de transición y sus tiempos de vida media ($t_{1/2}$) más usados en fármacos por ser emisores de positrones (β^+), electrones (β^-) y captura de electrones (EC). 11
- Figura 8:** Representación gráfica del modo de acción de un radioisótopo metálico usando tomografía por emisión de positrones (PET). 12
- Figura 9:** Agentes quelantes acíclicos de uso común para la coordinación de radioisótopos metálicos. 13
- Figura 10:** Agentes quelantes macrocíclicos de uso común para la coordinación de radioisótopos metálicos. 14
- Figura 11:** Ejemplos de complejos de cobre(II) con ligandos del tipo base de Schiff derivatizados con diferentes sistemas químicos. 15
- Figura 12:** Nuevos radiocomplejos de cobre(II)-64 como potenciales agentes de imagen PET en el diagnóstico del Alzheimer. 17
- Figura 13:** Propuesta de investigación constituida por la hipotética estructura del nuevo complejo quelato de cobre(II). 18
- Figura 14:** Metodología sintética para la obtención del nuevo compuesto quelato de cobre(II). 21
- Figura 15:** Propuesta del mecanismo de reacción en la síntesis del precursor 2-(1,3-benzotiazol-2-il)fenol (**A**). 31

Figura 16: Isómeros de posición orto (B) y para obtenidos de la reacción de Duff	33
Figura 17: Propuesta del mecanismo de reacción en la síntesis del precursor 3-(1,3-benzotiazol-2-il)-2-hidroxibenzaldehído (B).	35
Figura 18: Propuesta del mecanismo de reacción en la síntesis del ligando 2,2'-{propano-1,3-diilbis[nitrilo(<i>E</i>)metililideno]}bis[6-(1,3-benzotiazol-2-il)fenol] (C).	38
Figura 19: Propuesta del mecanismo de reacción en la síntesis del complejo quelato [2,2'-{propano-1,3-diilbis[nitrilo(<i>E</i>)metililideno]}bis[6-(1,3-benzotiazol-2-il)fenolato]- κ^4 - <i>N,N',O,O'</i>]cobre(II) (D).	41
Figura 20: Espectro FT-IR (KBr) del precursor 2-(1,3-benzotiazol-2-il)fenol (A). .	45
Figura 21: Espectros monodimensionales de resonancia magnética nuclear (^1H -RMN y ^{13}C -RMN) del precursor 2-(1,3-benzotiazol-2-il)fenol (A).	47
Figura 22: Espectros bidimensionales de resonancia magnética nuclear (^1H - ^{13}C HSQC-RMN y ^1H - ^1H COSY-RMN) del precursor 2-(1,3-benzotiazol-2-il)fenol (A). 48	
Figura 23: Espectro ESI-MS del precursor 2-(1,3-benzotiazol-2-il)fenol (A).	49
Figura 24: Espectro FT-IR (KBr) del precursor 3-(1,3-benzotiazol-2-il)-2-hidroxibenzaldehído (B).	52
Figura 25: Espectros monodimensionales de resonancia magnética nuclear (^1H -RMN y ^{13}C -RMN) del precursor 3-(1,3-benzotiazol-2-il)-2-hidroxibenzaldehído (B).	55
Figura 26: Espectros bidimensionales de resonancia magnética nuclear (^1H - ^{13}C HSQC-RMN y ^1H - ^1H COSY-RMN) del precursor 3-(1,3-benzotiazol-2-il)-2-hidroxibenzaldehído (B).	56
Figura 27: Espectro ESI-MS del precursor 3-(1,3-benzotiazol-2-il)-2-hidroxibenzaldehído (B).	57
Figura 28: Espectro FT-IR (KBr) del ligando base de Schiff 2,2'-{propano-1,3-diilbis[nitrilo(<i>E</i>)metililideno]}bis[6-(1,3-benzotiazol-2-il)fenol] (C).	60
Figura 29: Espectros monodimensionales de resonancia magnética nuclear (^1H -RMN y ^{13}C -RMN) del ligando base de Schiff 2,2'-{propano-1,3-diilbis[nitrilo(<i>E</i>)metililideno]}bis[6-(1,3-benzotiazol-2-il)fenol] (C).	63
Figura 30: Espectros bidimensionales de resonancia magnética nuclear (^1H - ^{13}C HSQC-RMN y ^1H - ^1H COSY-RMN) del ligando base de Schiff 2,2'-{propano-1,3-diilbis[nitrilo(<i>E</i>)metililideno]}bis[6-(1,3-benzotiazol-2-il)fenol] (C).	64

Figura 31: Asignación propuesta para el ligando base de Schiff 2,2'-{propano-1,3-diilbis[nitrilo(<i>E</i>)metililideno]}bis[6-(1,3-benzotiazol-2-il)fenol] (C).....	65
Figura 32: Espectro ESI-MS del ligando base de Schiff 2,2'-{propano-1,3-diilbis[nitrilo(<i>E</i>)metililideno]}bis[6-(1,3-benzotiazol-2-il)fenol] (C).....	66
Figura 33: Espectro UV-VIS del ligando base de Schiff 2,2'-{propano-1,3-diilbis[nitrilo(<i>E</i>)metililideno]}bis[6-(1,3-benzotiazol-2-il)fenol] (C).....	68
Figura 34: Espectro de fluorescencia del ligando base de Schiff 2,2'-{propano-1,3-diilbis[nitrilo(<i>E</i>)metililideno]}bis[6-(1,3-benzotiazol-2-il)fenol] (C) en acetonitrilo....	69
Figura 35: Espectro FT-IR (KBr) del complejo quelato [2,2'-{propano-1,3-diilbis[nitrilo(<i>E</i>)metililideno]}bis[6-(1,3-benzotiazol-2-il)fenolato]- κ^4 - <i>N,N',O,O</i>]cobre(II) (D).....	73
Figura 36: Espectro ESI-MS del complejo quelato [2,2'-{propano-1,3-diilbis[nitrilo(<i>E</i>)metililideno]}bis[6-(1,3-benzotiazol-2-il)fenolato]- κ^4 - <i>N,N',O,O</i>]cobre(II) (D).....	74
Figura 37: Espectro UV-VIS del complejo quelato [2,2'-{propano-1,3-diilbis[nitrilo(<i>E</i>)metililideno]}bis[6-(1,3-benzotiazol-2-il)fenolato]- κ^4 - <i>N,N',O,O</i>]cobre(II) (D).....	76
Figura 38: Contraste entre los espectros UV-VIS del complejo quelato (D) y su respectivo ligando (C).	76
Figura 39: Espectro de fluorescencia del complejo quelato [2,2'-{propano-1,3-diilbis[nitrilo(<i>E</i>)metililideno]}bis[6-(1,3-benzotiazol-2-il)fenolato]- κ^4 - <i>N,N',O,O</i>]cobre(II) (D) en acetonitrilo.	78
Figura 40: Comparación entre los espectros de fluorescencia del complejo quelato (D) y su respectivo ligando (C).....	78

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Métodos experimentales relacionados a la síntesis del precursor 2-(1,3-benzotiazol-2-il)fenol (A)	29
Tabla 2: Parámetros experimentales relacionados a la síntesis del precursor 3-(1,3-benzotiazol-2-il)-2-hidroxibenzaldehído (B)	32
Tabla 3: Parámetros experimentales relacionados a la síntesis del ligando 2,2'-{propano-1,3-diilbis[nitrilo(<i>E</i>)metililideno]}bis[6-(1,3-benzotiazol-2-il)fenol] (C)	36
Tabla 4: Parámetros experimentales relacionados a la síntesis del complejo quelato [2,2'-{propano-1,3-diilbis[nitrilo(<i>E</i>)metililideno]}bis[6-(1,3-benzotiazol-2-il)fenolato]- κ^4 - <i>N,N',O,O'</i>]cobre(II) (D)	39
Tabla 5: Asignaciones de las principales bandas de absorción FT-IR (KBr) del precursor 2-(1,3-benzotiazol-2-il)fenol (A)	44
Tabla 6: Compendio de los datos obtenidos de los análisis espectrales RMN del 2-(1,3-benzotiazol-2-il)fenol (A) tomados en CDCl ₃ y a 25°C.....	46
Tabla 7: Datos de la espectrometría de masas (ESI-MS) del precursor 2-(1,3-benzotiazol-2-il)fenol (A)	49
Tabla 8: Asignaciones de las principales bandas de absorción FT-IR (KBr) del precursor 3-(1,3-benzotiazol-2-il)-2-hidroxibenzaldehído (B)	51
Tabla 9: Compendio de los datos obtenidos de los análisis espectrales RMN del 3-(1,3-benzotiazol-2-il)-2-hidroxibenzaldehído (B) tomados en CDCl ₃ y a 25°C.	53
Tabla 10: Datos de la espectrometría de masas (ESI-MS) del precursor 3-(1,3-benzotiazol-2-il)-2-hidroxibenzaldehído (B)	57
Tabla 11: Asignaciones de las principales bandas de absorción FT-IR (KBr) del ligando base de Schiff 2,2'-{propano-1,3-diilbis[nitrilo(<i>E</i>)metililideno]}bis[6-(1,3-benzotiazol-2-il)fenol] (C)	59
Tabla 12: Compendio de los datos obtenidos de los análisis espectrales RMN del ligando base de Schiff 2,2'-{propano-1,3-diilbis[nitrilo(<i>E</i>)metililideno]}bis[6-(1,3-benzotiazol-2-il)fenol] (C) tomados en CDCl ₃ y a 25°C.	61
Tabla 13: Datos de la espectrometría de masas (ESI-MS) del ligando base de Schiff 2,2'-{propano-1,3-diilbis[nitrilo(<i>E</i>)metililideno]}bis[6-(1,3-benzotiazol-2-il)fenol] (C)	66

Tabla 14: Asignaciones de las principales bandas de absorción UV-VIS (nm) con sus respectivas transiciones electrónicas del ligando 2,2'-{propano-1,3-diilbis[nitrilo(*E*)metililideno]}bis[6-(1,3-benzotiazol-2-il)fenol] (**C**) en acetonitrilo.... 67

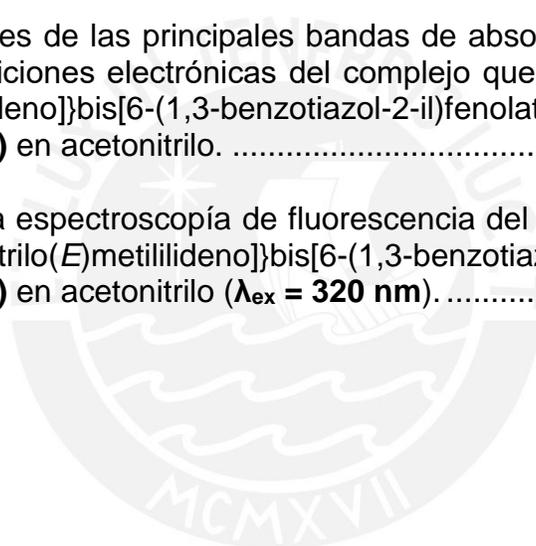
Tabla 15: Datos de la espectroscopía de fluorescencia del ligando 2,2'-{propano-1,3-diilbis[nitrilo(*E*)metililideno]}bis[6-(1,3-benzotiazol-2-il)fenol] (**C**) en acetonitrilo ($\lambda_{ex} = 350 \text{ nm}$)..... 68

Tabla 16: Asignaciones de las principales bandas de absorción FT-IR (KBr) del complejo quelato [2,2'-{propano-1,3-diilbis[nitrilo(*E*)metililideno]}bis[6-(1,3-benzotiazol-2-il)fenolato]- κ^4 -*N,N',O,O*]cobre(II) (**D**). 72

Tabla 17: Datos de la espectrometría de masas (ESI-MS) del complejo quelato [2,2'-{propano-1,3-diilbis[nitrilo(*E*)metililideno]}bis[6-(1,3-benzotiazol-2-il)fenolato]- κ^4 -*N,N',O,O*]cobre(II) (**D**)..... 74

Tabla 18: Asignaciones de las principales bandas de absorción UV-VIS (nm) con sus respectivas transiciones electrónicas del complejo quelato [2,2'-{propano-1,3-diilbis[nitrilo(*E*)metililideno]}bis[6-(1,3-benzotiazol-2-il)fenolato]- κ^4 -*N,N',O,O*]cobre(II) (**D**) en acetonitrilo. 75

Tabla 19: Datos de la espectroscopía de fluorescencia del complejo quelato [2,2'-{propano-1,3-diilbis[nitrilo(*E*)metililideno]}bis[6-(1,3-benzotiazol-2-il)fenolato]- κ^4 -*N,N',O,O*]cobre(II) (**D**) en acetonitrilo ($\lambda_{ex} = 320 \text{ nm}$)..... 77



ABREVIATURAS

EA	Enfermedad de Alzheimer
Aβ	Placas amiloides
NFTs	Ovillos neurofibrilares
MCI	Defecto cognitivo leve
CDR	Clasificación clínica de demencia
APP	Proteína precursora de amiloides
Aβ₄₀₋₄₂	Cadenas peptídicas amiloides de 40 a 42 aminoácidos
PET	Tomografía por emisión de positrones
PIB	Compuesto de Pittsburgh B
FDA	Administración de alimentos y medicamentos de EEUU
β^+	Positrones
β^-	Electrones
t_{1/2}	Tiempo de vida media
H₄DOTA	Ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético
H₄TETA	Ácido 1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano-1,4,8,11-tetraacético
CYCLEN	1,4,7,10-tetraazaciclododecano
CCF	Cromatografía en capa fina
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
HMTA	Hexametilentetramina
TFA	Ácido trifluoroacético
MeOH	Metanol
EtOH	Etanol
MeCN	Acetonitrilo
FT-IR/NIR	Espectroscopía de infrarrojo cercano con transformada de Fourier
¹H-RMN	Espectroscopía de resonancia magnética nuclear del protón
¹³C-RMN	Espectroscopía de resonancia magnética nuclear del carbono-13
¹H-¹³C HSQC-RMN	Espectroscopía de resonancia magnética de correlación heteronuclear (¹ H- ¹³ C) de cuanto sencillo
¹H-¹H COSY-RMN	Espectroscopía de resonancia magnética de correlación del desplazamiento homonuclear (¹ H- ¹ H)
ESI-MS	Espectrometría de masas con ionización por electroespray
UV-VIS	Espectroscopía de ultravioleta-visible
DRX	Difracción de rayos X

1. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Alzheimer (EA), descrita clínicamente por primera vez en 1906 por el psiquiatra alemán Alois Alzheimer, es considerada como el desorden neurodegenerativo más común en el mundo (1). Actualmente, más de 5 millones de personas han sido diagnosticadas con Alzheimer en los Estados Unidos, y se espera que la cifra llegue a 15 millones para el año 2050 (2). La “hipótesis de la cascada amiloide” es hoy en día la teoría causal más preponderante de este mal. En ella se sostiene que la formación de los péptidos A β por enzimas especializadas y la consecuente sobreacumulación en placas insolubles A β -amiloides dentro del cerebro son los principales factores que conducen a la patogénesis de esta enfermedad (3).

En el área de diagnóstico, es primordial la investigación enfocada en la detección preclínica del Alzheimer, etapa en donde la concentración de las placas amiloides (A β) predomina sin haber indicios de demencia. Existe ya una industria cuyo éxito se basa en obtener mejores resoluciones de imagen del *target* mediante el uso de una técnica denominada tomografía de emisión de positrones (PET) en donde se usan moléculas orgánicas sencillas radiomarcadas con ^{11}C y ^{18}F de buena afinidad sobre las placas A β -amiloides. De este grupo destacan tres compuestos, el [^{11}C]-*PIB* (derivado de la tioflavina T), el [^{18}F]-*florbetapir* y el [^{18}F]-*florbetaben*, de los cuales sólo los dos últimos ya han sido aceptados por la *Food and Drug Administration* (FDA) de los E.E.U.U. (4).

Actualmente, la novedosa participación de complejos quelatos de radioisótopos de metales de transición (In, Cu, Ga, Y y Zr) prometen ser una tentadora y potencial alternativa. Aunque el uso de estos compuestos está todavía en una etapa exploratoria en el caso del Alzheimer, para el diagnóstico y terapia del cáncer esto es algo ya muy investigado y usado (5,11). Las ventajas que ofrecen estos complejos son: sus prolongados tiempos de vida media, la accesible radioactivación de los metales y la rápida y simple incorporación a ligandos especializados por quelación. En este campo, los variados diseños que ofrecen los complejos de cobre y sus radioisótopos (^{64}Cu $t_{1/2} = 12,7$ h, ^{61}Cu $t_{1/2} = 3,3$ h, ^{60}Cu $t_{1/2} = 23,4$ min) vienen mostrando perspectivas alentadoras y no solo por sus aplicaciones como agentes anticancerígenos (6), sino por sus recientes participaciones como posibles agentes de imagen PET. Paralelamente a este enfoque, ha sido importante también el diseño de nuevos ligandos que puedan actuar como agentes quelantes acíclicos y/o macrocíclicos con grupos afines a las placas A β -amiloides, un ejemplo novedoso sería incorporar estructuras específicas como benzotiazoles y/o estilbenos (2,7–9).

Por esta razón, y en base a las nuevas necesidades, esta tesis propone el desarrollo de un nuevo complejo quelato de cobre(II) basado en un ligando del tipo base de Schiff derivatizado con grupos afines a las placas A β -amiloides para su potencial uso como un agente de imagen PET en pruebas futuras de diagnóstico del Alzheimer. Por tal, solo se espera contribuir con una ruta de

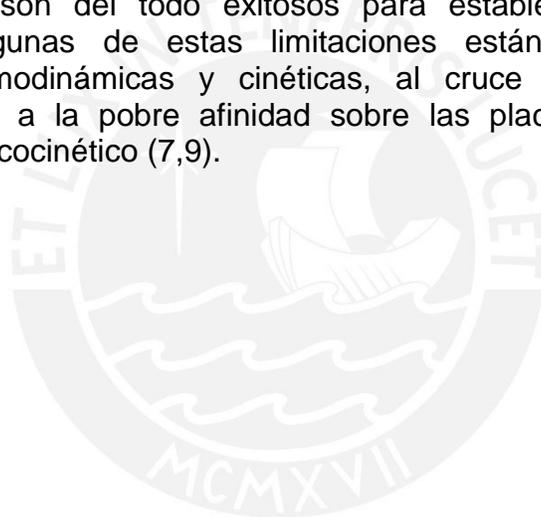
síntesis viable capaz de establecer un posible prototipo PET de interés para futuras evaluaciones del diagnóstico preclínico del Alzheimer.



2. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

En el campo de la tomografía por emisión de positrones (PET) empleada para el diagnóstico preclínico del Alzheimer, la principal problemática radica en el uso de *radioisótopos tradicionales* (^{18}F , ^{15}O , ^{13}N y ^{11}C) los cuales limitan el correcto desempeño de los agentes de imagen o radiomarcadores PET sobre las placas A β -amiloides. En principio, se ha establecido que dichos isótopos solo se han desarrollado para su incorporación en moléculas pequeñas; además, se sabe que presentan complejas radiosíntesis, cortos tiempos de vida media y una rápida bioeliminación, por ende, a menudo solo se dispone de pequeños espacios temporales para la obtención de imágenes; es decir, este hecho representa un obstáculo para las respectivas evaluaciones médicas (5).

En cuanto a los compuestos de coordinación radiomarcados con ^{64}Cu y compatibles con las placas A β -amiloides, un campo que todavía está en etapa de exploración, ha sido importante tomar como principio y referencia los casos que todavía no son del todo exitosos para establecer la propuesta de investigación. Algunas de estas limitaciones están relacionadas a las estabildades termodinámicas y cinéticas, al cruce eficaz de la barrera hematoencefálica, a la pobre afinidad sobre las placas A β -amiloides y al desempeño farmacocinético (7,9).



3. OBJETIVOS

3.1. General

Diseñar, sintetizar y caracterizar un nuevo complejo quelato de cobre(II) que esté constituido por un ligando tetradentado del tipo base de Schiff derivatizado con grupos estructurales afines a las placas A β -amiloides para establecer un posible radiomarcador "PET" aplicado a futuras pruebas de detección del mal de Alzheimer.

3.2. Específicos

- Establecer una metodología sintética que conlleve a obtener un ligando tetradentado simétrico del tipo base de Schiff que presente el grupo benzotiazol como estructura afín a las placas A β -amiloides.
- Analizar y caracterizar la estructura química del ligando establecido mediante diferentes métodos instrumentales (espectroscopía infrarroja, espectroscopía de resonancia magnética nuclear, espectrometría de masas, espectroscopía UV-VIS y de fluorescencia).
- Establecer la ruta sintética más favorable para obtener un nuevo complejo quelato de cobre(II) y caracterizar el nuevo compuesto que se obtenga mediante diferentes técnicas instrumentales (espectroscopía infrarroja, espectroscopía de resonancia magnética nuclear, espectrometría de masas, espectroscopía UV-VIS y de fluorescencia).
- Trabajar en diversos métodos de cristalización del nuevo complejo sintetizado (quelato de Cu²⁺) con el fin de obtener y proporcionar monocristales para futuras evaluaciones por difracción de rayos X, y dar así un mayor respaldo a la propuesta estructural.

4. MARCO TEÓRICO

4.1. Enfermedad de Alzheimer (EA)

La enfermedad de Alzheimer (EA) se describió por primera vez en 1906 cuando el psiquiatra alemán Alois Alzheimer informó de las características clínicas y patológicas de una paciente llamada Auguste Deter. En una necropsia especializada, el examen histopatológico (estudio *post-mortem*) de dicho cerebro reveló la presencia anómala de lo que actualmente se conoce como placas A β -amiloides y ovillos neurofibrilares (NFT), considerados hasta ahora como los sellos neuropatológicos y/o biomarcadores de diagnóstico de dicho padecimiento. La etapa preclínica, en donde no existen síntomas de demencia aún, es el periodo en el cual las placas A β se producen y acumulan durante aproximadamente 10 a 15 años antes del deterioro cognitivo irreversible. Los síntomas de la enfermedad, que están asociados a una pérdida considerable de la integridad neuronal, se cree son causados por la acumulación de las placas amiloides y el incremento atípico de los ovillos NFTs (12–14). Clínicamente, este escenario se puede medir utilizando el parámetro CDR (clasificación clínica de demencia) siendo el factor 3 el estado más severo que concluye casi siempre en la muerte del paciente (**Figura 1**) (1).

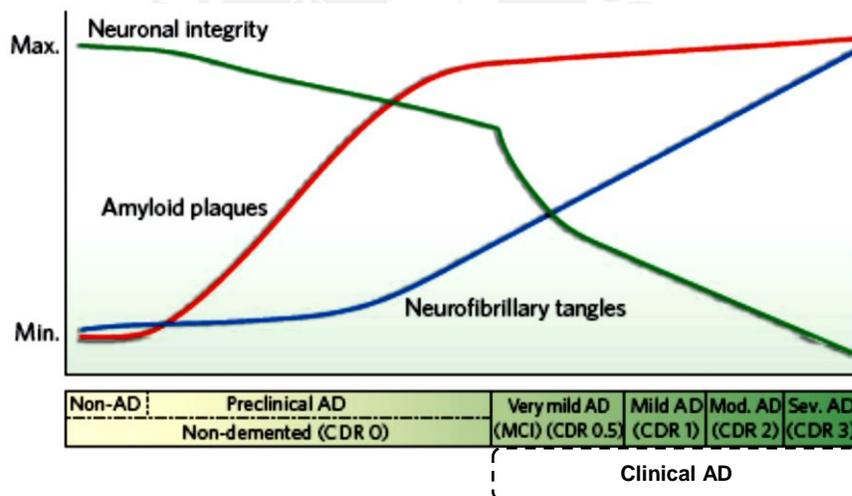


Figura 1: Evolución de los biomarcadores (placas A β y NFTs) durante las etapas preclínica y clínica con respecto a la integridad neuronal (1). **MCI:** defecto cognitivo leve. **CDR:** clasificación clínica de demencia.

La “hipótesis de la cascada amiloide” es hoy en día la teoría causal más preponderante del Alzheimer. En ella se sostiene que la producción y acumulación de placas A β -amiloides en el cerebro es el principal factor que conduce a la patogénesis de ésta enfermedad (13). A nivel bioquímico, la mejor conjetura sostiene que todo se origina cuando la β -secretasa y la γ -secretasa, enzimas específicas del cerebro, seccionan defectuosamente los puntos de una proteína transmembranal de las neuronas denominada APP (proteína precursora de amiloides) (3). La APP está codificada por un solo gen

en el cromosoma 21 y se asemeja a un receptor de superficie celular que tiene un gran dominio extracelular (resto amino "N") y una cola citoplasmática corta (resto ácido "C") (7). Se cree que después de los cortes enzimáticos se forman en particular dos tipos de monómeros: A β ₄₀ y A β ₄₂ (cadenas peptídicas de 40 y 42 aminoácidos respectivamente), los cuales se agregan reversiblemente para formar dímeros, oligómeros, fibrillas y finalmente placas insolubles que junto a diversos procesos de inflamación, hiperfosforilación y estrés oxidativo desencadenan el daño irreversible y la muerte neuronal (**Figura 2**) (3).

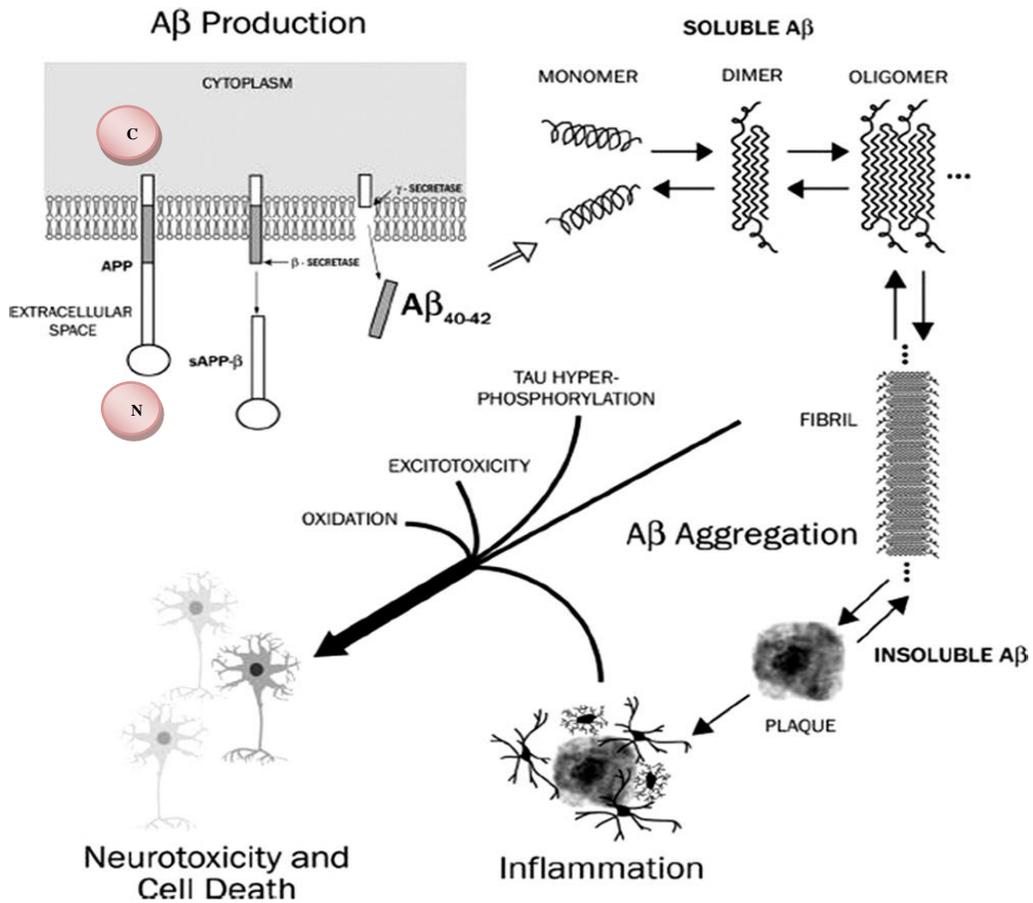


Figura 2: Diagrama esquemático de la producción de péptidos A β ₄₀₋₄₂ de la proteína APP a través de escisiones secuenciales de la β -secretasa y γ -secretasa, y finalmente la consecuente formación de las placas insolubles A β (3).

4.2. Desarrollo farmacológico en el diagnóstico del Alzheimer sobre las placas A β -amiloides con moléculas simples y radioactivadas

Desde los primeros casos hasta la fecha, el diagnóstico "patrón" y por ende el más decisivo de la enfermedad de Alzheimer continúa siendo el estudio por tinción histopatológica durante la etapa *post-mortem*, usando para ello colorantes selectivos sobre las placas amiloides tales como la tioflavina-S, tioflavina-T y el Congo Rojo (**Figura 3**) (4).

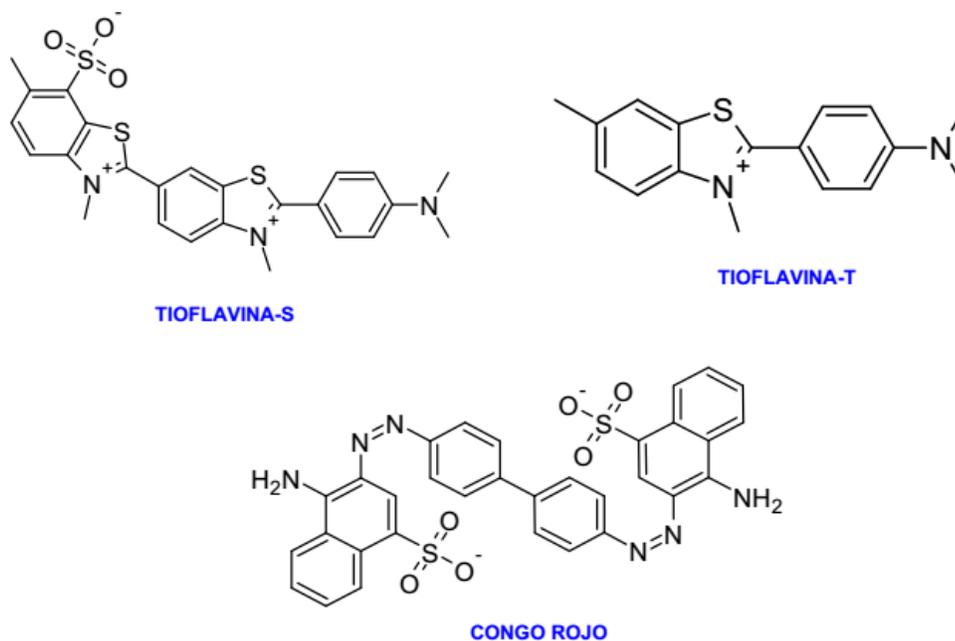


Figura 3: Estructuras químicas de la Tioflavina-S, Tioflavina-T y Congo rojo (4).

Los diversos fármacos de diagnóstico que se han desarrollado hasta la fecha sobre las placas amiloides presentan similares grupos funcionales a los ya mencionados en la **Figura 3**. Además, se han establecido tres características necesarias para sus correctas farmacocinéticas: lipofilicidad moderada, peso molecular relativamente pequeño y alta afinidad o selectividad sobre las placas A β ; de esta manera, destacan los derivados de benzotiazoles, benzofuranos y estilbenos. Todas estas condiciones en conjunto hacen que el fármaco pueda atravesar la barrera hematoencefálica, es decir, cruzar la capa selectiva que recubre al cerebro y que determina la entrada y/o salida de diversas sustancias (4,15).

Adicionalmente, en la actualidad se ha vuelto posible identificar evidencias *in vivo* de las diferentes neuropatologías específicas del Alzheimer mediante el uso de técnicas por imagen molecular. El método de diagnóstico por imagen molecular consiste en la visualización, caracterización y medición de procesos biológicos a nivel molecular y celular en humanos y otros sistemas vivos (5). En este sentido, el uso de agentes de neuroimagen sobre las placas A β -amiloides empleando la tomografía por emisión de positrones (PET) ha demostrado en los últimos años ser un procedimiento muy prometedor para el diagnóstico preclínico del Alzheimer. Por tal motivo el desarrollo de radiomarcadores PET (moléculas asociadas a un radioisótopo) para la formación de imágenes *in vivo* de placas A β ha sido el foco de intensos esfuerzos de investigación durante las últimas décadas. La tomografía por emisión de positrones (PET) es una técnica no invasiva capaz de detectar diversas patologías y/o procesos biológicos con muy buena sensibilidad (10^{-12} mol/L). La metodología está basada en la distribución dinámica por inyección

intravenosa de ciertas moléculas radioactivadas (radiomarcadores PET) durante una sesión de exploración. Una vez reconocido el *target* (el objetivo molecular; en este caso, las placas A β -amiloides), el radiomarcador por su propia naturaleza emite positrones, los cuales colisionan con los electrones del medio generando rayos gamma que son detectados y procesados por el propio equipo PET (ver **Figura 4**) (16). En resumen, la exploración PET inicia en un ciclotrón donde se produce el radioisótopo emisor de positrones, éste es asociado mediante una síntesis radioquímica a una sonda molecular que en conjunto representa al radiofármaco de interés, inmediatamente después y teniendo como referencia el tiempo de vida media del radioisótopo se procede con la inyección vía intravenosa al paciente, luego se adquieren y procesan los datos en un equipo especializado de tomografía para finalmente obtener la imagen del objetivo molecular, todo lo expuesto se aprecia a modo de resumen en la **Figura 5** (17,18).

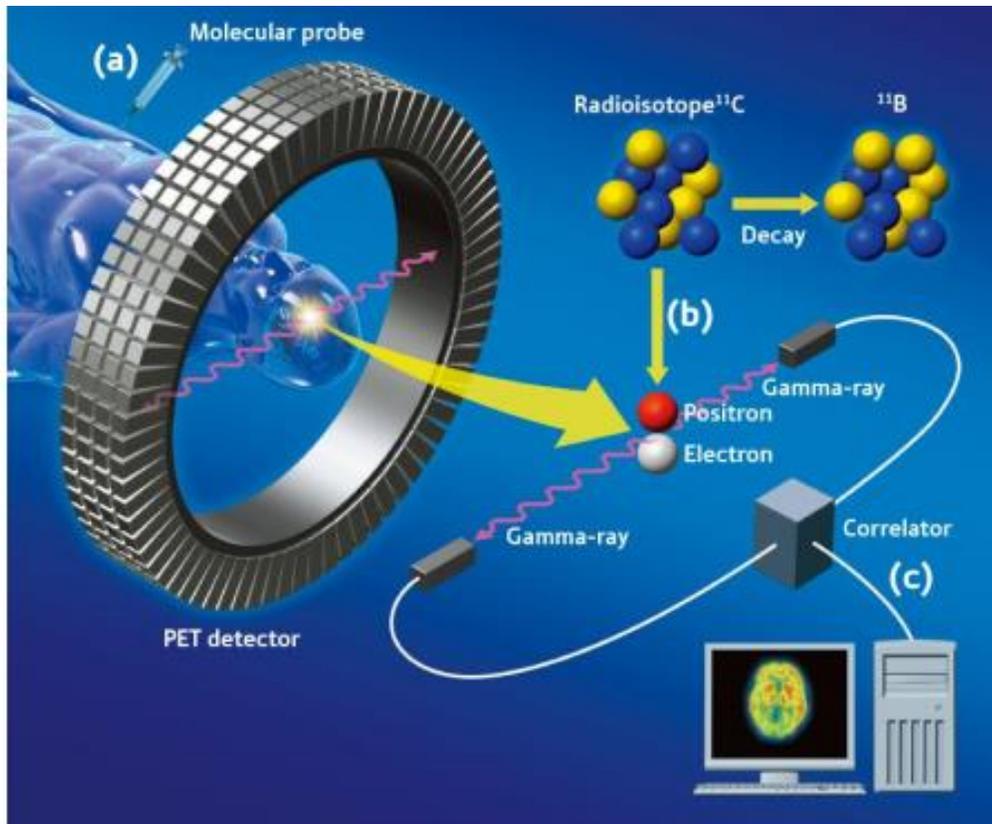


Figura 4: Mecanismo específico de la actividad positrónica en el objetivo biológico (*target*) (16).

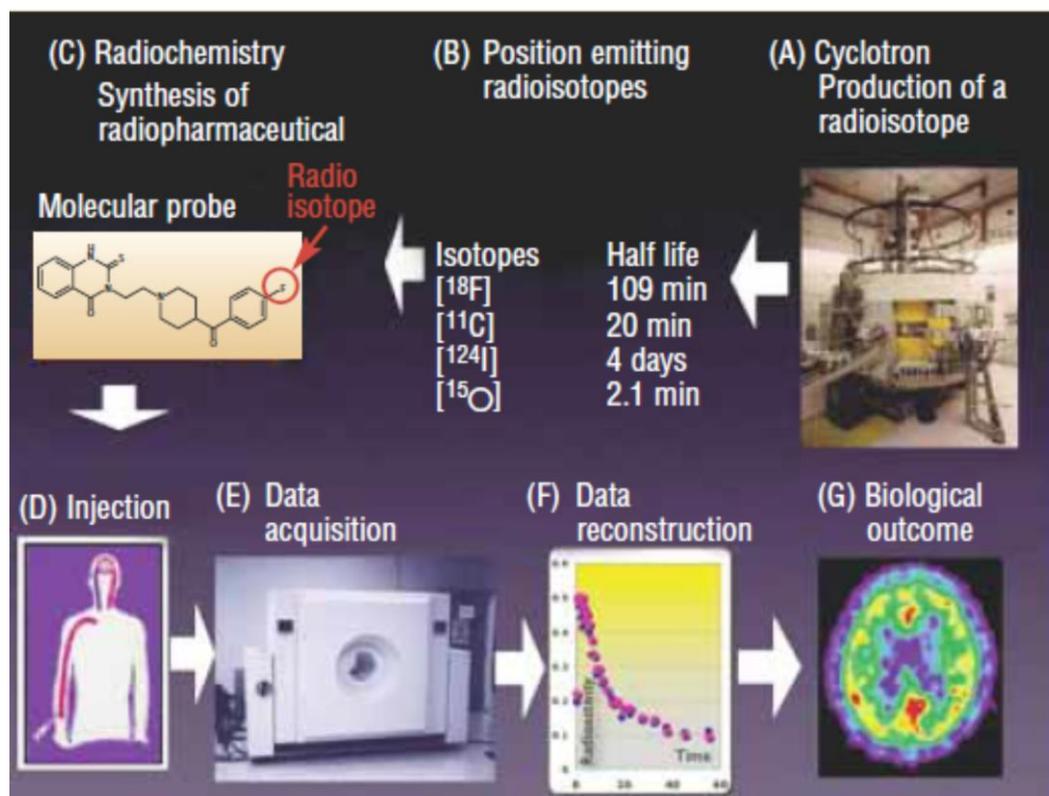


Figura 5: Resumen de las etapas involucradas en una exploración PET (18).

Dentro del marco de los radiofármacos PET, una gama de compuestos derivados de benzotiazoles se unen con cierto grado de selectividad a las fibrillas y placas A β -amiloides. La estructura química de los benzotiazoles contiene sistemas de anillos aromáticos rígidos conjugados y se cree que estas moléculas entran en una bolsa o canal hidrófobo y se unen a las placas amiloides por medio de una combinación de interacciones hidrofóbicas y π - π (9). A finales de la década de 1990 se sintetizaron numerosos derivados de la tioflavina-T (benzotiazol-anilina o BTA) los cuales fueron estudiados *in vitro* en su unión a las placas amiloides. Estos estudios generaron una molécula que se unía selectivamente a dichas placas insolubles. Este compuesto es el conocido [¹¹C]-6-OH-BTA-1 o [¹¹C]-2-(4-metilaminofenil)-6-hidroxi-benzotiazol (compuesto de Pittsburgh B o PIB) (Figura 6, A), considerado como el agente de imagen PET de las placas A β -amiloides más estudiado hasta la fecha (4). Sin embargo, el tiempo de vida media del radioisótopo carbono-11, que es de unos 20 minutos, más su limitada bioabsorción, impidieron su posterior comercialización. Esta limitación ha llevado al desarrollo de otros agentes de imagen A β marcados con flúor-18 (tiempo de vida media de 110 minutos) para una disponibilidad más amplia y para un uso clínico rutinario. Este enfoque ha dado lugar principalmente a tres radiomarcadores más eficientes: el derivado de 3'-flúoro del PIB, el flutemetamol (Figura 6, B); y derivados del estilbeno, el florbetapir (Figura 6, C) y el florbetaben (Figura 6, D). Hasta la fecha, estos tres compuestos han sido aprobados para uso clínico por la

isotope	$t_{1/2}$ (h)	methods of production	decay mode	E_{β^+} (keV)
^{60}Cu	0.4	cyclotron, $^{60}\text{Ni}(p,n)^{60}\text{Cu}$	β^+ (93%) EC (7%)	3920, 3000 2000
^{61}Cu	3.3	cyclotron, $^{61}\text{Ni}(p,n)^{61}\text{Cu}$	β^+ (62%) EC (38%)	1220, 1150 940, 560
^{62}Cu	0.16	$^{62}\text{Zn}/^{62}\text{Cu}$ generator	β^+ (98%) EC (2%)	2910
^{64}Cu	12.7	cyclotron, $^{64}\text{Ni}(p,n)^{64}\text{Cu}$	β^+ 19(%) EC (41%) β^- (40%)	656
^{66}Ga	9.5	cyclotron, $^{63}\text{Cu}(\alpha,n\gamma)^{66}\text{Ga}$	β^+ (56%) EC (44%)	4150, 935
^{68}Ga	1.1	$^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generator	β^+ (90%) EC (10%)	1880, 770
^{86}Y	14.7	cyclotron, $^{86}\text{Sr}(p,n)^{86}\text{Y}$	β^+ (33%) EC (66%)	2335, 2019 1603, 1248
^{89}Zr	78.5	$^{89}\text{Y}(p,n)^{89}\text{Zr}$	β^+ (22.7%) EC (77%)	1043 897 909, 1675, 1713, 1744

Figura 7: Radioisótopos de metales de transición y sus tiempos de vida media ($t_{1/2}$) más usados en fármacos por ser emisores de positrones (β^+), electrones (β^-) y captura de electrones (EC) (5).

A medida que nuevos métodos de producción de radiofármacos basados en metales de transición (Cu, Ga, In, Y y Zr) estén disponibles, su uso permitirá a los investigadores y médicos aprovechar las distintas vidas medias ($t_{1/2}$) y energías de emisión (E_{β^+}) para explorar su aplicación en imágenes por PET en el diagnóstico y tratamiento de una serie de enfermedades. Precisamente, una de las enfermedades más investigadas que utiliza radiometales como agentes de terapia y/o diagnóstico es el cáncer (5,11).

En este sentido, las formas de diagnóstico por PET más modernas emplean radiometales albergados en compuestos *quelatos* con alta afinidad por un objetivo molecular (*target*). De esa manera, un radiomarcador PET común presenta en su estructura tres partes: la primera, constituye la esfera de coordinación propiamente dicha (complejo quelato que contiene al radionúclido), la segunda parte lo conforma un espaciador y finalmente el grupo molecular de alta afinidad sobre el *target*. El modo de acción de este tipo de radiofármacos se inicia cuando el grupo molecular de alta afinidad interactúa con un receptor de la superficie celular (*target*). Después de esto, el radiometal emisor de positrones se descompone eyectando partículas β^+ de su núcleo. Luego de viajar una corta distancia en el tejido rico en electrones, el positrón (β^+) se recombina con un electrón (β^-) en un proceso llamado *aniquilación*. Con esto, las masas de dichas partículas se convierten en dos fotones de alta energía (rayos γ), que se liberan aproximadamente 180° entre sí para garantizar que la energía y el momento se conserven. Aunque la atenuación es posible, estos dos rayos γ suelen ser lo suficientemente energéticos como para escapar del organismo y ser recogidos por los detectores de un escáner PET (**Figura 8**) (5).

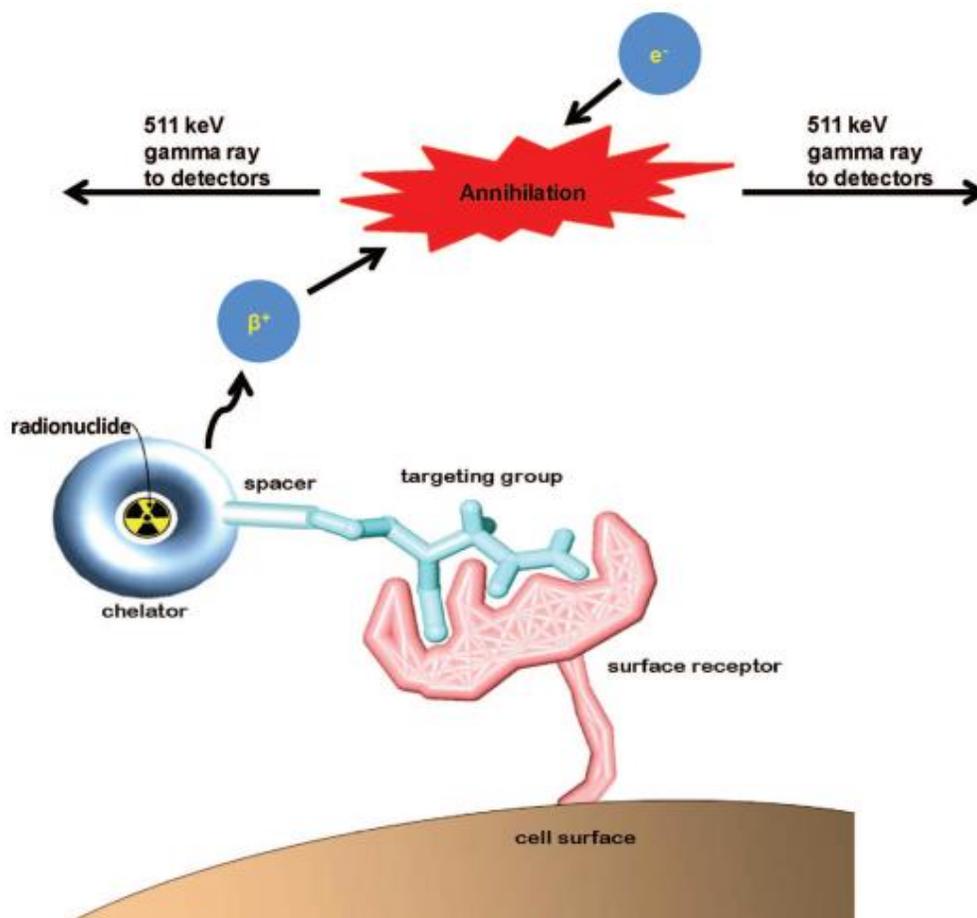


Figura 8: Representación gráfica del modo de acción de un radioisótopo metálico usando tomografía por emisión de positrones (PET) (5).

En este campo, los complejos de cobre son aplicados ampliamente como agentes anticancerígenos (6). Este uso particular del cobre en medicina llevó a postular su posible aplicabilidad como agente de imagen PET en el diagnóstico del Alzheimer (2,7–9). La base en el desarrollo de complejos de cobre para aplicaciones en terapia y diagnóstico se centra en el ambiente químico y los átomos dadores del ligando ya que estos pueden modular las propiedades duras/blandas del metal, el equilibrio lipofílico/hidrofílico de los complejos resultantes y su solubilidad en fluidos extracelulares, así como también en la capacidad de penetrar en la membrana celular. Otro aspecto importante que debe tenerse en cuenta en el diseño de los complejos de cobre incluye su estabilidad frente a las reacciones de transquelación con moléculas fisiológicas (aminoácidos individuales, secuencias de péptidos peculiares o proteínas completas) (6).

El cobre es un elemento esencial para la mayoría de los organismos aeróbicos, empleado como cofactor estructural y catalítico, por lo tanto, está implicado en muchas vías biológicas. Forma, además, una rica variedad de complejos de coordinación con los estados de oxidación (I) y (II). En los complejos de

cobre(II), el número de coordinación varía de cuatro a seis. Las especies tetracoordinadas presentan geometrías cuadradas planas (*sp*), las pentacoordinadas, bipirámides trigonales (*tbp*) y las hexacoordinadas, geometrías octaédricas (*oh*) (6).

Para aplicaciones médicas, existe una gran variedad de ligandos afines al cobre(II) enlazados directamente a diferentes átomos dadores (N, O, S) con las que pueden formar estructuras muy estables (por ejemplo; compuestos quelatos). Este ion metálico es particularmente adecuado para la formación de anillos quelatos de cinco y/o seis miembros. Bajo esta perspectiva podemos encontrar ligandos que pueden actuar como agentes quelantes acíclicos (**Figura 9**) cuya cadena química es abierta, y agentes quelantes macrocíclicos (**Figura 10**) cuyas estructuras consisten de anillos capaces de coordinar al ion metálico. En resumidas cuentas, ambos grupos tienen la capacidad de formar complejos muy estables. De la primera agrupación se puede mencionar a los derivados de las etilendiaminas como, por ejemplo, el **EDTA (Figura 9, L10)**, y de la segunda clase a los populares poliazamacrociclos de donde destacan especialmente el **TACN (Figura 10, L26)**, **CYCLEN (Figura 10, L38)** y **CYCLAM (Figura 10, L48)**. Se sabe que muchas de estas estructuras pueden incorporar restos de carboxilatos y/o tiolatos para derivatización y también para neutralizar la carga del centro metálico (5,6).

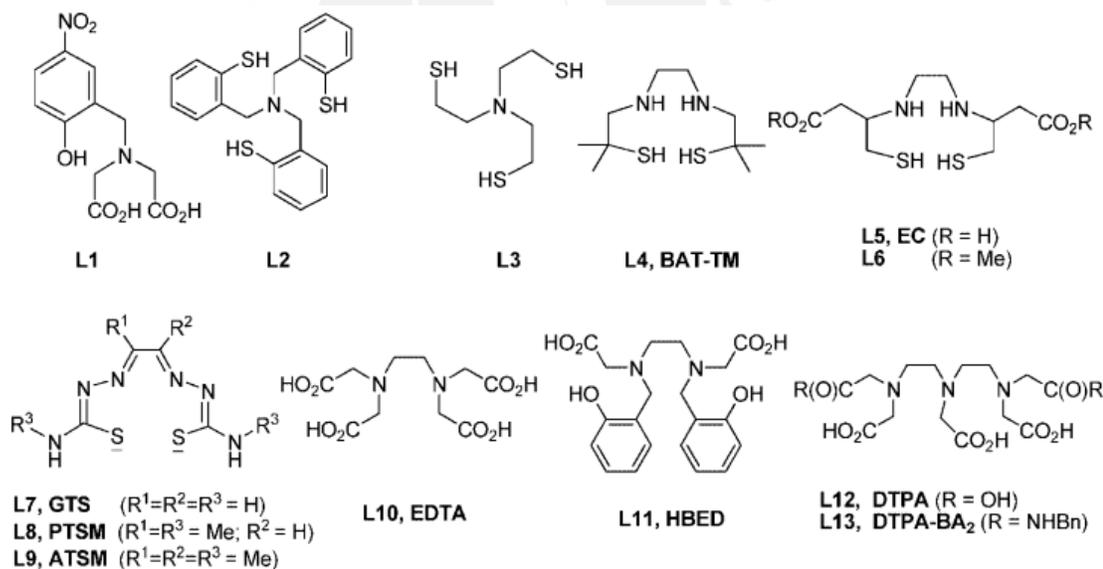


Figura 9: Agentes quelantes acíclicos de uso común para la coordinación de radioisótopos metálicos (5).

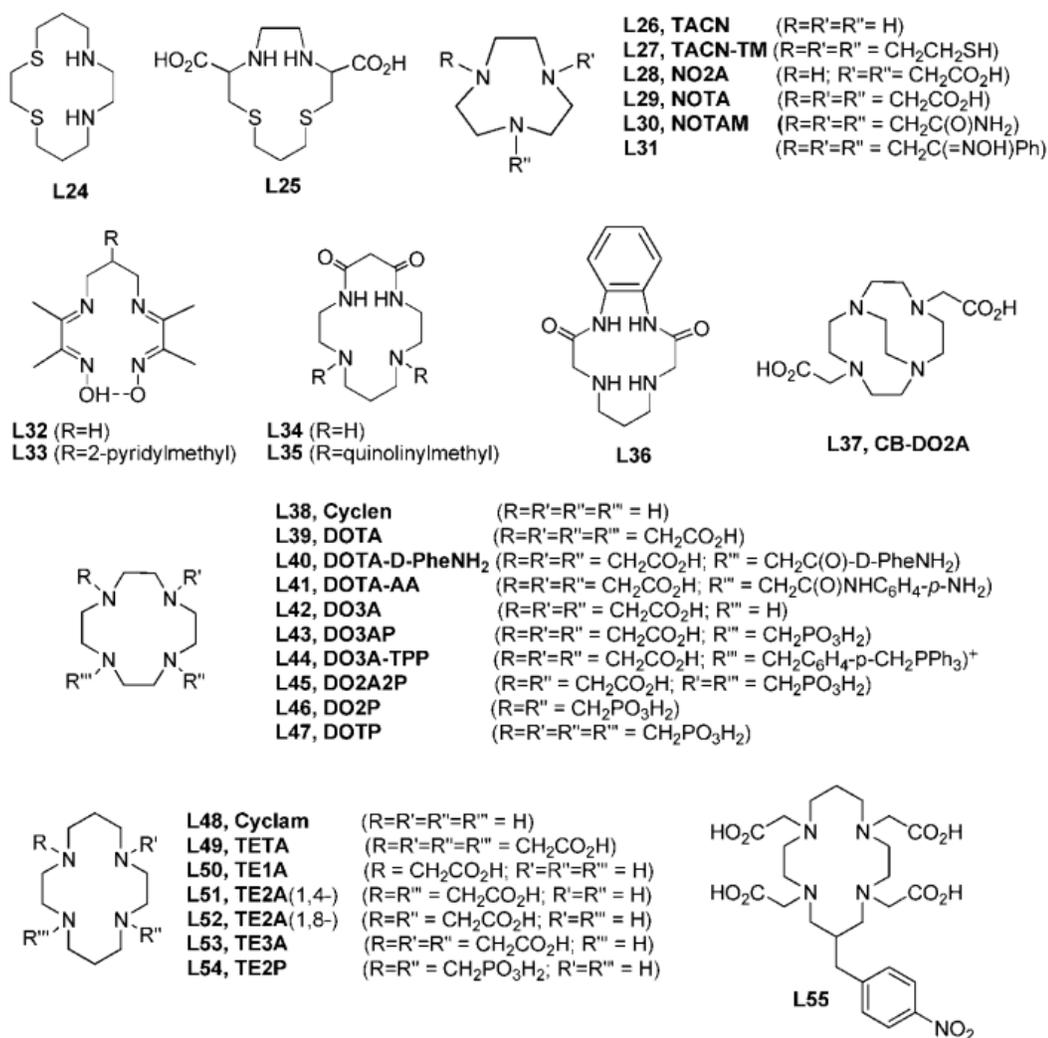


Figura 10: Agentes quelantes macrocíclicos de uso común para la coordinación de radioisótopos metálicos (5).

Dentro de este grupo de ligandos polidentados, que tienen la facultad de formar compuestos de coordinación muy estables con el cobre(II), destacan las bases de Schiff o azometinos ($R_1R_2C=N-R_3$). El uso eficiente de las bases de Schiff como agentes quelantes ha permitido generar muchos compuestos con una gran variedad de aplicaciones industriales, biológicas y médicas. Por tal motivo, han jugado un papel central en el desarrollo de la química de coordinación. Debido a su conveniencia sintética y versatilidad estructural, los complejos con bases de Schiff han sido sometidos a extensos estudios con potenciales aplicaciones en el tratamiento del cáncer, como agentes antimicrobianos, en catálisis (hidrogenación de olefinas, transferencia de grupos aminos, etc.), como agentes antivirales, en el diseño de nuevos materiales y como modelos biológicos para diversas metaloenzimas (19–21). De esta manera, se pueden sintetizar una gran variedad de complejos de cobre con ligandos del tipo bases de Schiff, los cuales se pueden clasificar en diversos sistemas que denotan el tipo de unión a través de los diferentes

átomos dadores (**Figura 11**). Cada sistema tiene características particulares en cuanto a sus formas estructurales, propiedades y aplicaciones. Por consiguiente, se pueden encontrar ligandos derivatizados con cumarinas, piridinas, pirazoles, hidrazonas, semicarbazonas, entre otros (6).

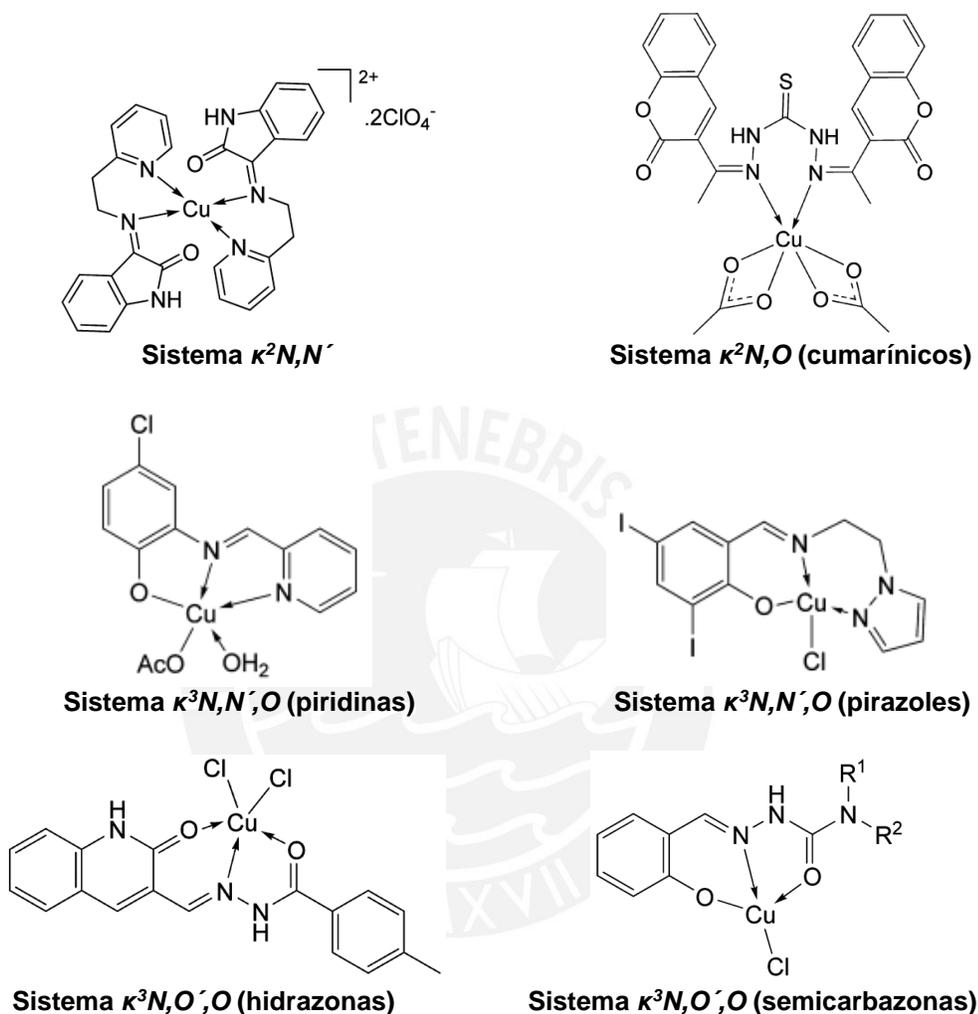


Figura 11: Ejemplos de complejos de cobre(II) con ligandos del tipo base de Schiff derivatizados con diferentes sistemas químicos (6).

4.4. Radiocomplejos de cobre(II) como potenciales agentes de imagen PET en el diagnóstico del Alzheimer

El ^{64}Cu es un radionúclido atractivo para su potencial aplicación en la técnica de imagen PET, en particular, porque tiene una baja energía de emisión de positrones y proporciona una alta resolución de imagen comparable a la del ^{18}F . Además, el ^{64}Cu ($t_{1/2} = 12.7$ h) tiene un tiempo de vida media más amplio a comparación de los cuatro isótopos de cobre conocidos (9,12).

En cuanto a los complejos quelatos marcados con ^{64}Cu y compatibles con las placas seniles, se han reportado algunos ejemplos (**Figura 12**) que serán descritos a continuación. El Cu^{64}L_1 con un armazón de estilbeno fue reportado en el 2010. Este compuesto teñía las placas $\text{A}\beta$ en las secciones cerebrales humanas, y de la misma manera cruzaba la barrera hematoencefálica en ratones normales y con Alzheimer. Sin embargo, había dificultades del ligando para enlazarse al ^{64}Cu . En el 2013, se presentó también a un derivado de benzotiazol, Cu^{64}L_2 , pero este compuesto no mostró interacción selectiva con las placas amiloides. Los derivados de estilpiridina, Cu^{64}L_3 y Cu^{64}L_4 , también fueron reportados en el 2013. Estos compuestos se unieron a las placas $\text{A}\beta$ en las secciones del cerebro humano mediante una tinción de fluorescencia *in vitro*. Mientras el Cu^{64}L_3 mostró una absorción baja en el cerebro del ratón en pruebas *in vivo*, el complejo Cu^{64}L_4 pudo cruzar la barrera hematoencefálica en el ratón durante el experimento. Sin embargo, los niveles de detección empleando Cu^{64}L_4 sobre los agregados de $\text{A}\beta$ no se pudieron establecer (7,9).

Los ligandos comúnmente estudiados H_4DOTA (ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético) y H_4TETA (ácido 1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano-1,4,8,11-tetraacético) han sido capaces de acomplejar al ion Cu^{2+} formando quelatos de una alta estabilidad termodinámica; sin embargo, muestran una limitada farmacocinética. En este sentido, se han desarrollado quelantes poliazamacrocíclicos tipo jaula tales como hexaaminas bicíclicas, etc., necesitando muchas veces condiciones de radiomarcaje más rigurosas. Recientemente, se ha demostrado que los ligandos de CYCLEN (1,4,7,10-tetrazaciclododecano), TACN (1,4,7-triazacillnonano) y bispidina forman rápidamente complejos con el radioisótopo $^{64}\text{Cu}^{2+}$ de muy buena estabilidad. Se ha demostrado también, que estos quelatos metálicos bifuncionalizados con fragmentos de 2-fenilbenzotiazol se parecen mucho al tinte de unión que se usa frecuentemente sobre las placas $\text{A}\beta$ -amiloides en una etapa *post-mortem*. En este sentido, la **Figura 12** muestra a los complejos quelatos basados en los macrociclos del TACN (Cu^{64}L_5 y Cu^{64}L_6) y 2,11-diaza[3.3]-(2,6)piridinofano (N4) ($\text{Cu}^{64}\text{L}_{7-10}$), los cuales están derivatizados con fragmentos de 2-fenilbenzotiazol como ligandos generales que podrían ser radiomarcados con ^{64}Cu , y así mismo, se estudia su acción como posibles agentes de formación de imágenes PET para la detección de los agregados insolubles de $\text{A}\beta$ *in vivo* (2).

Tras la investigación exploratoria de otros radiocomplejos útiles, también se ha demostrado que algunos derivados de benzofuranos pueden ser útiles para la obtención de imágenes *in vivo* sobre agregados de $\text{A}\beta$. Por lo tanto, se ha diseñado y sintetizado un nuevo compuesto de benzofurano marcado con ^{64}Cu y unido a un residuo de CYCLEN (1,4,7,10-tetrazaciclododecano) como quelante ($\text{Cu}^{64}\text{L}_{11}$, **Figura 12**). Hasta donde se sabe, esta es la primera vez que los derivados de benzofurano en complejos de ^{64}Cu se han propuesto como potenciales agentes de imagen en la técnica PET para la evaluación *in vivo* de agregados de $\text{A}\beta$ (8).

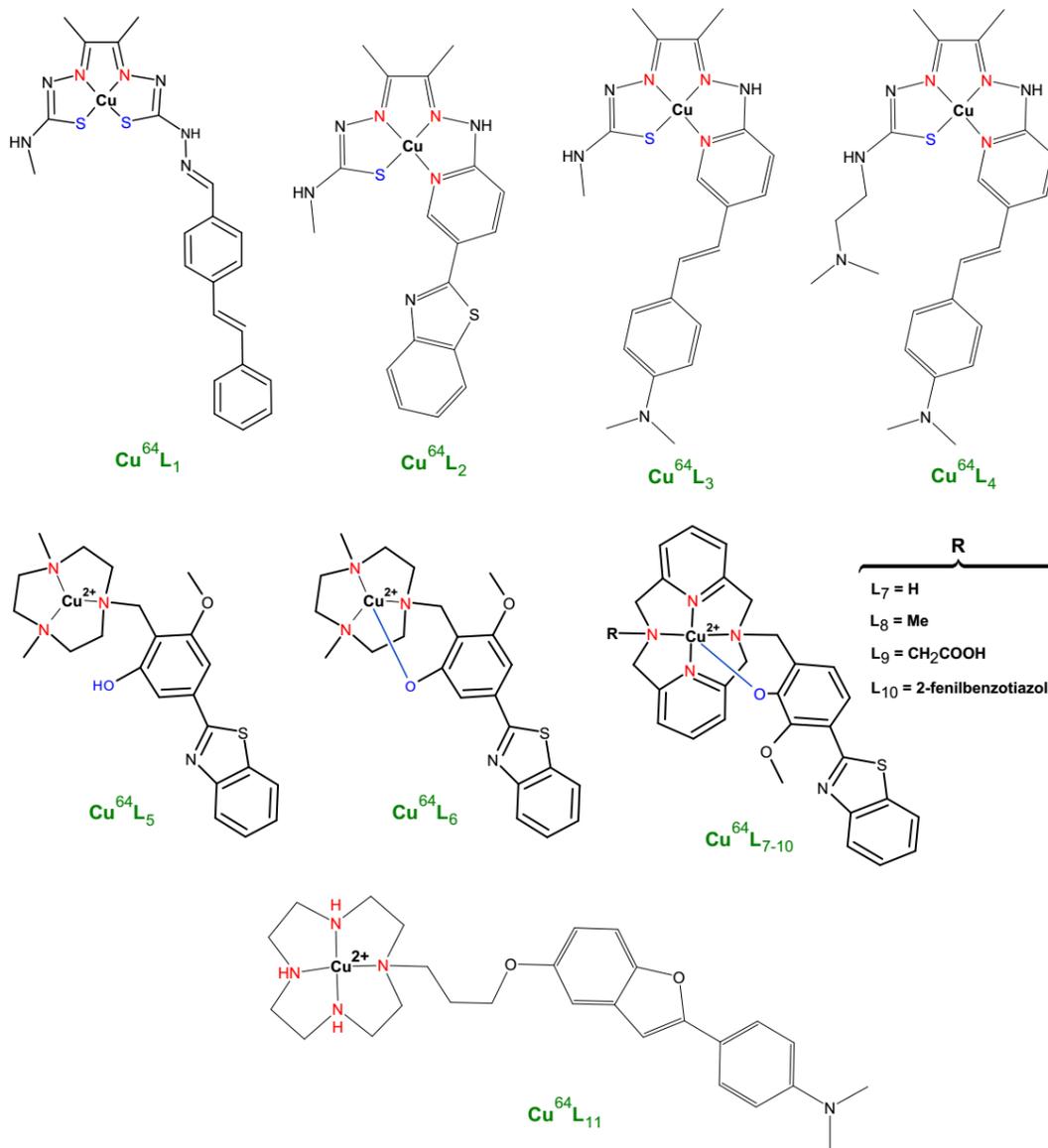


Figura 12: Nuevos radiocomplejos de cobre(II)-64 como potenciales agentes de imagen PET en el diagnóstico del Alzheimer (2,7–9).

En principio, la rápida y simple incorporación de radioisótopos metálicos dentro de ligandos específicos es una alternativa muy atractiva. Dicho esto, los nuevos complejos de $^{64}\text{Cu}^{2+}$ en cuestión se incorporarían a una todavía lista muy reducida de radiocomplejos de cobre diseñados para su interacción selectiva a las placas $\text{A}\beta$ -amiloides; sin embargo, todo esto se encuentra todavía en etapa de exploración e investigación y muy especialmente en el área de diagnóstico preclínico de la enfermedad de Alzheimer.

5. PROPUESTA DE INVESTIGACIÓN

En base a lo expuesto, esta tesis tuvo por finalidad establecer una ruta viable de un nuevo complejo quelato de cobre(II) para su evaluación y potencial uso como agente de imagen PET en la detección temprana del Alzheimer (**Figura 13**). Por tal motivo, a lo largo de la investigación se trabajó en dos puntos principales; en primer lugar, se evaluó la viabilidad sintética y la originalidad estructural de un nuevo ligando; es decir, la posibilidad de sintetizar una molécula orgánica que presente un esqueleto simétrico del tipo base de Schiff capaz de contener restos de benzotiazol como grupos de afinidad a las placas A β -amiloides. Además, se diseñó de manera que dicha molécula sea tetradentada, con la habilidad de poder coordinar y neutralizar la carga del ion Cu²⁺. Desde el punto de vista cualitativo, se procuró también que el ligando en cuestión cumpla con un cierto grado de lipofilicidad para que pueda atravesar eficazmente la barrera hematoencefálica, por consiguiente, se aguarda que éste tenga un tamaño y masa molecular (MW) no muy elevado (MW~500 g/mol). En segundo lugar, se espera que, mediante la caracterización estructural debida se pueda sustentar la formación exitosa de este nuevo complejo quelato cuyo centro metálico esté tetracoordinado por el respectivo ligando en una proporción 1:1, dentro de un ambiente geométrico cuadrado plano.

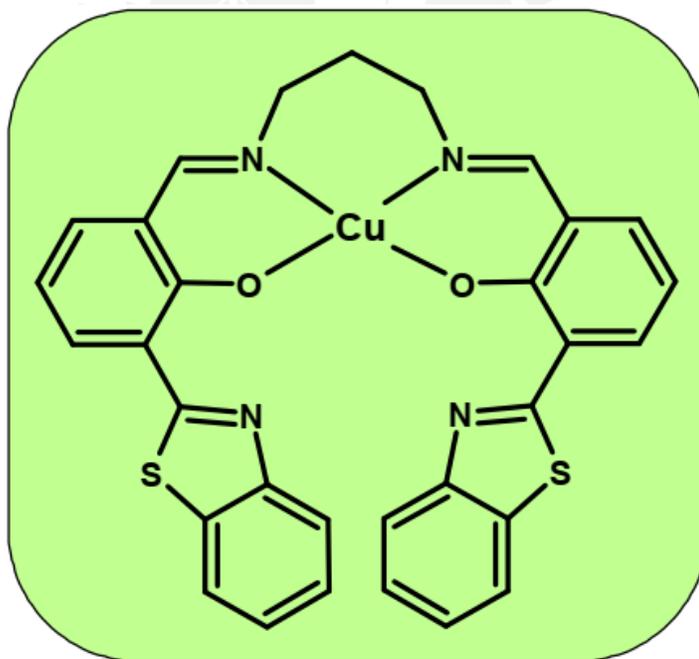


Figura 13: Propuesta de investigación constituida por la hipotética estructura del nuevo complejo quelato de cobre(II).

6. METODOLOGÍA

El presente trabajo de investigación se desarrolla en cuatro etapas donde se describen sistemáticamente cada uno de los intermediarios de reacción que conducen finalmente en el complejo quelato propuesto.

6.1. Primera etapa: síntesis, purificación y caracterización del precursor 2-(1,3-benzotiazol-2-il)fenol (A)

Para la síntesis del derivado de benzotiazol (A) se utilizan en conjunto las rutas químicas reportadas previamente por Khan y colaboradores, y por Chang y colaboradores (22,23). La síntesis se lleva a cabo mediante una reacción de condensación que genera una cicloadición cuando se hace reaccionar 2-aminotiofenol con 2-hidroxibenzaldehído (salicilaldehído) en dimetilformamida (DMF) a reflujo y en presencia de metabisulfito de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) como catalizador. Para la purificación del compuesto (A) se utiliza la técnica de recristalización. Finalmente, la caracterización estructural se realiza mediante las siguientes técnicas instrumentales: FT-IR, ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, RMN bidimensional (COSY, HSQC) y espectrometría de masas (ESI-MS).

6.2. Segunda etapa: síntesis, purificación y caracterización del precursor 3-(1,3-benzotiazol-2-il)-2-hidroxibenzaldehído (B)

Para la segunda etapa sintética se hace uso de algunas variantes en conjunto que tienen como referencia a la reacción de Duff original (24–26). La reacción de Duff es una reacción de formilación (formación de aldehídos) “orto-dirigida” sobre anillos aromáticos activados (fenoles, etc.) que utiliza hexametilentetramina (HMTA) como fuente de grupos formilo (CHO) y un catalizador ácido (26–28). En esta metodología se tiene como precedente la reacción de Duff (24–26) con modificaciones reportadas por Chang I. J., Xu P., Chang C. y colaboradores (22,29,30). Por tal, se plantea un procedimiento que involucra una reacción equimolar entre el precursor A con la amina cíclica (HMTA) usando ácido trifluoroacético (TFA) como solvente/catalizador. Para completar el proceso se fomenta una reacción de hidrólisis usando HCl diluido bajo reflujo. La purificación del producto de interés (B) se lleva a cabo por cromatografía en columna. Por último, la caracterización estructural se realiza mediante las siguientes técnicas instrumentales: FT-IR, ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, RMN bidimensional (COSY, HSQC) y espectrometría de masas (ESI-MS).

6.3. Tercera etapa: síntesis, purificación y caracterización del ligando tipo base de Schiff (C)

La síntesis del nuevo ligando tipo base de Schiff, que es propuesto como un nuevo agente quelante tetradentado y simétrico con restos de benzotiazol (A), se lleva a cabo por una reacción de condensación para producir el grupo funcional imina ($\text{R}_1\text{R}_2\text{C}=\text{N}-\text{R}_3$) (31). Por lo general, estos compuestos se originan cuando aldehídos o cetonas reaccionan reversiblemente con una

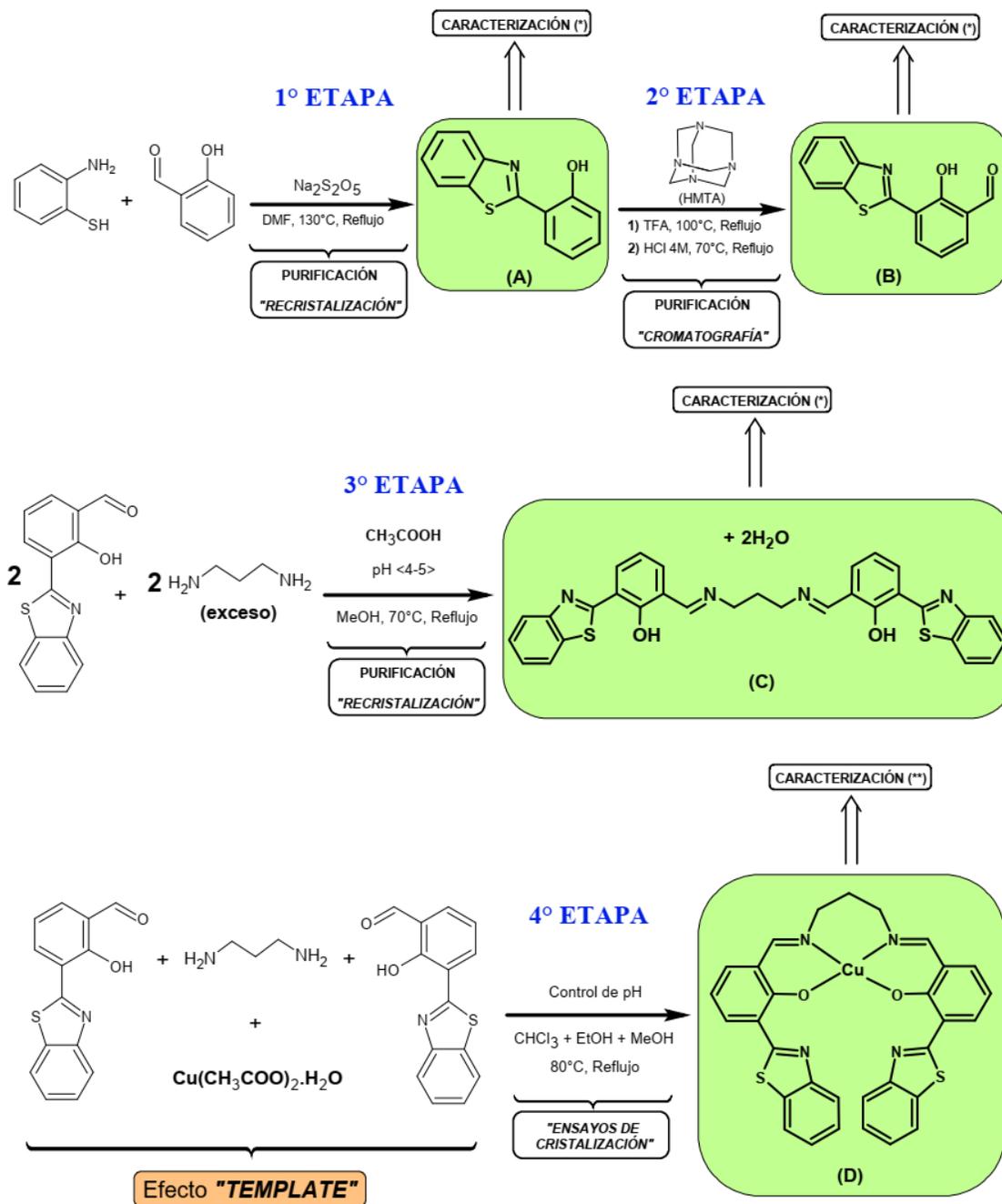
amina primaria bajo catálisis ácida y/o por calentamiento moderado; de esta manera, se producen moléculas de agua (condensación) (31,32). En esta etapa se desarrolla una doble reacción de condensación simultánea que es impulsada esencialmente por los dos grupos aminos ($R-NH_2$) de una diamina acíclica primaria como reactivo en exceso. En base a diversos autores cuyos trabajos experimentales ya han sido reportados (17,19–22,33–36), se presenta un procedimiento donde el aldehído previamente sintetizado (**B**) reacciona con propano-1,3-diamina en metanol bajo reflujo. Adicionalmente, se utiliza ácido acético glacial como catalizador hasta pH ácido recomendado (4-5) (31). El producto obtenido (**C**) es purificado usando la técnica de recristalización. Finalmente, para la caracterización estructural se utilizan las siguientes técnicas instrumentales: espectroscopías FT-IR, 1H -RMN, ^{13}C -RMN, RMN bidimensional (COSY, HSQC), UV-VIS y de fluorescencia, y espectroscopía de masas (ESI-MS).

6.4. Cuarta etapa: síntesis, purificación y caracterización del complejo quelato de cobre(II)

Para la síntesis del complejo quelato de cobre(II) (**D**) se considera la posibilidad de aplicar una reacción impulsada por el efecto *template* o “plantilla” que facilita el centro metálico (Cu^{2+}). Cabe mencionar que esta alternativa se basa en adaptaciones de trabajos y publicaciones que guardan relación con el propuesto (19–21,33,34,37–41). Por tal, en esta tesis se fomenta dicha ruta de síntesis mezclando para ello sal de acetato de cobre(II), precursor **B** y propano-1,3-diamina en la relación estequiométrica 1:2:1. La extracción del producto de interés (**D**) se realiza por precipitación en un sistema a reflujo con solventes convenientemente mezclados ($CHCl_3$ /EtOH/MeOH), en donde se monitorea de inicio a fin el pH de la reacción. Para la caracterización estructural del nuevo complejo quelato (**D**) se aplica las siguientes técnicas instrumentales: espectroscopías FT-IR, UV-VIS y de fluorescencia, y espectroscopía de masas (ESI-MS).

Por otro lado, después de la cuarta etapa, se intenta obtener monocristales bien constituidos del nuevo complejo quelato de cobre(II) haciendo uso de diversos ensayos de cristalización: evaporación lenta y difusión por vapor (42,43). El objetivo de esta parte es complementar el análisis estructural por difracción de rayos X (DRX) en futuras evaluaciones.

Finalmente, en la **Figura 14** se puede apreciar el resumen de la metodología sintética desarrollada en esta tesis.



(*) Espectroscopías FT-IR, ¹H-RMN, ¹³C-RMN, RMN bidimensional (COSY, HSQC), y espectroscopía de masas (ESI-MS).

(**) Espectroscopías FT-IR, UV-VIS y de fluorescencia, y espectrometría de masas (ESI-MS).

Figura 14: Metodología sintética para la obtención del nuevo compuesto quelato de cobre(II).

7. PARTE EXPERIMENTAL

7.1. Equipos, reactivos y solventes

Equipos

- *Espectrofotómetro de infrarrojo (FT-IR/NIR) Perkin Elmer (Frontier)* del Laboratorio de Análisis Instrumental de la Sección Química - PUCP. Las muestras se prepararon sobre pastillas de KBr (grado espectroscópico) y las mediciones se establecieron en el rango de $4000-400\text{ cm}^{-1}$. Finalmente, los datos se procesaron haciendo uso del software Spectrum™ de la marca Perkin Elmer.
- *Espectrofotómetro de resonancia magnética nuclear (RMN) Bruker (Avance III-HD Ascend 500 NMR)* del Centro de Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (CERMN) ubicado en la Sección Química - PUCP. Para las disoluciones se emplearon convenientemente, según sea el caso, CDCl_3 o $\text{DMSO}-d_6$, y las mediciones se realizaron a 25°C usando tetrametilsilano (TMS) como estándar interno. Para el procesamiento de los datos se utilizó el software 1D NMR Processor (Version 12) de la marca ACD Labs.
- *Espectrómetro de masas acoplado a la técnica de ionización por electroespray (ESI-MS) Bruker Daltonics (esquire6000™)* ubicado en el Laboratorio de Análisis Instrumental de la Sección Química - PUCP. Las muestras se disolvieron en acetonitrilo de alta pureza para generar disoluciones estándar de concentraciones aproximadas a 1.5 mg/mL . Finalmente, se usó el software Compass Data Analysis 4.0 de la marca Bruker Daltonics para el procesamiento de los datos presentados.
- *Espectrofotómetro UV-VIS Agilent (modelo 8453)* del Laboratorio de Análisis Instrumental de la Sección Química - PUCP. Las mediciones se llevaron a cabo por diferentes barridos en un rango de 190 a 1100 nm. Luego, para el procesamiento de los datos obtenidos se utilizó el software Excel 2013 de Microsoft.
- *Espectrofluorómetro Perkin Elmer (modelo LS - 55)* localizado en el Laboratorio de Análisis Instrumental de la Sección Química - PUCP. La medición de los espectros de emisión se efectuaron a temperatura ambiente (25°C) en diferentes rangos de barridos. Para el ligando **(C)** y el complejo **(D)** se usaron haces de excitación de 350 y 320 nm respectivamente, e idénticos *slits* de 10 nm. Finalmente, los datos obtenidos fueron procesados usando Excel 2013 de Microsoft.

Reactivos

Compuesto	Proveedor	Grado de Pureza
2-aminotiofenol	<i>Sigma-Aldrich</i>	99%
2-hidroxibenzaldehído	<i>Sigma-Aldrich</i>	98%
Metabisulfito sódico	<i>Sigma-Aldrich</i>	P.A.
Hexametilentetramina (HMTA)	<i>Merck</i>	P.A.
Ácido trifluoroacético (TFA)	<i>Merck</i>	P.A.
Ácido clorhídrico	<i>Merck</i>	P.A.
Propano-1,3-diamina	<i>Merck</i>	P.A.
Ácido acético glacial	<i>Merck</i>	P.A.
Acetato de cobre(II) monohidratado	<i>Merck</i>	P.A.

Solventes

Compuesto	Proveedor	Grado de Pureza
Agua desionizada	<i>Sec. Química-PUCP</i>	P.A.
Metanol	<i>J.T. Baker</i>	P.A.
N,N-dimetilformamida (DMF)	<i>J.T. Baker</i>	P.A.
Dimetilsulfóxido (DMSO)	<i>J.T. Baker</i>	P.A.
Acetonitrilo	<i>Merck</i>	P.A.
Acetona	<i>J.T. Baker</i>	P.A.
Etanol	<i>J.T. Baker</i>	P.A.
Acetato de etilo	<i>J.T. Baker</i>	P.A.
Tetrahidrofurano	<i>J.T. Baker</i>	P.A.
Diclorometano	<i>J.T. Baker</i>	P.A.
Cloroformo	<i>J.T. Baker</i>	P.A.
Hexano	<i>J.T. Baker</i>	P.A.

7.2. Procedimientos

7.2.1. Ligando tipo base de Schiff

7.2.1.1. Primera etapa: síntesis y purificación del precursor 2-(1,3-benzotiazol-2-il)fenol (A)

En un balón de 100 mL de capacidad, se disolvieron 2-aminotiofenol (0.80 g, 680 μ L, 6.40 mmol) y 2-hidroxibenzaldehído (0.78 g, 680 μ L, 6.40 mmol) con 20 mL de DMF (pre-secado con tamices moleculares 4Å) en presencia de 1.22 g (6.40 mmol) de metabisulfito sódico ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) como catalizador. Las condiciones experimentales de la mezcla resultante fueron exploradas a diferentes temperaturas y tiempos de reacción. El progreso de la reacción fue monitoreado por cromatografía en capa fina (CCF) usando hexano/acetato de etilo (10:1, v/v) como fase móvil. Finalizado el proceso y enfriado el sistema, el producto crudo fue separado en forma de un precipitado color pardo tras añadir cuidadosamente y con agitación constante 50 mL de agua desionizada helada. A continuación, el crudo obtenido fue filtrado al vacío y lavado con abundante agua; después de ello, fue secado en estufa a 50°C por 2 horas y almacenado en un desecador. La purificación del producto de interés (A) se llevó a cabo por recristalización en aproximadamente 70 mL de metanol.

Rendimiento: 72 % (1.05 g)

Solubilidad a 25°C: soluble en DMF, DMSO, acetona, etanol, diclorometano, cloroformo. Parcialmente soluble en metanol. Insoluble en agua.

FT-IR (KBr, cm^{-1}): 3450 ($\nu_{\text{O-H}}$ fenol); 3058 ($\nu_{\text{C-H}}$ aromático); 1623, 1590 ($\nu_{\text{C=N}}$ tiazol); 1487, 1439, 1405 ($\nu_{\text{C=C}}$ aromático); 1273 - 974 ($\delta_{\text{C-H}}$ aromático); 818 - 734 ($\pi_{\text{C-H}}$ aromático).

$^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, CDCl_3 , TMS, ppm): 12.53 (s, 1H), 7.99 (d, $J = 8.24$ Hz, 1H), 7.89 (d, $J = 7.93$ Hz, 1H), 7.69 (d, $J = 7.78$ Hz, 1H), 7.51 (t, $J = 7.71$ Hz, 1H), 7.45 - 7.35 (m, 2H), 7.12 (d, $J = 7.93$ Hz, 1H), 6.96 (t, $J = 7.50$ Hz, 1H).

$^{13}\text{C-RMN}$ (125 MHz, CDCl_3 , TMS, ppm): 169.31, 157.89, 151.78, 132.70, 132.53, 128.36, 126.63, 125.48, 122.12, 121.45, 119.46, 117.81, 116.73.

ESI-MS ($[\text{M}+\text{H}]^+$). Calculado: m/z 228.04; encontrado: m/z 228.1.

7.2.1.2. Segunda etapa: síntesis y purificación del precursor 3-(1,3-benzotiazol-2-il)-2-hidroxibenzaldehído (B)

Se mezclaron y disolvieron 2-(1,3-benzotiazol-2-il)fenol (**A**) (600 mg, 2.64 mmol) y hexametilentetramina (HMTA) (400 mg, 2.64 mmol) con 10 mL de ácido trifluoroacético (TFA). La solución resultante fue sometida a 100°C bajo reflujo, con y sin atmosfera inerte, y a diferentes tiempos de reacción. El progreso de reacción fue monitoreado por cromatografía en capa fina (CCF) usando hexano como fase móvil. A continuación, se llevó a cabo la hidrólisis ácida del intermediario principal con HCl (4M, 16.5 mL) a 70°C por 2 horas adicionales. El producto fue extraído con diclorometano (3x15 mL) y la fase orgánica de interés fue posteriormente secada sobre sulfato de sodio anhidro. Tras filtrar y rotaevaporar el solvente de extracción, se recolectó un producto crudo viscoso de color pardo. Para la purificación se aplicó cromatografía en columna (silica gel 60, 0.040-0.063 mm, hexano/acetato de etilo = 10:1, v/v); y de esta manera, se obtuvo el intermediario (**B**) como un sólido de color amarillo claro.

Rendimiento: 20 % (0.13 g)

Solubilidad a 25°C: soluble en DMF, DMSO, acetona, acetato de etilo, diclorometano, cloroformo. Parcialmente soluble en metanol, etanol. Insoluble en agua.

FT-IR (KBr, cm⁻¹): 3437 ($\nu_{\text{O-H}}$ fenol); 3058 ($\nu_{\text{C-H}}$ aromático); 1683 ($\nu_{\text{C=O}}$ aldehído); 1622, 1595 ($\nu_{\text{C=N}}$ tiazol); 1475, 1459, 1440 ($\nu_{\text{C=C}}$ aromático); 1279 - 993 ($\delta_{\text{C-H}}$ aromático); 811 - 725 ($\pi_{\text{C-H}}$ aromático).

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃, TMS, ppm): 13.26 (br. s, 1H), 10.54 (br. s, 1H), 8.06 - 8.02 (m, 2H), 7.92 - 7.90 (m, 2H), 7.54 (m, 1H), 7.45 (m, 1H), 7.07 (t, $J = 7.70$ Hz, 1H).

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃, TMS, ppm): 190.01, 168.39, 160.65, 151.61, 134.72, 132.72, 132.24, 127.05, 126.07, 122.57, 121.74, 119.62, 118.85, 117.26.

ESI-MS ([M+H]⁺). Calculado: m/z 256.04; encontrado: m/z 256.1.

7.2.1.3. Tercera etapa: síntesis y purificación del ligando 2,2'-{propano-1,3-diilbis[nitrilo(*E*)metililideno]}bis[6-(1,3-benzotiazol-2-il)fenol] (C)

El intermediario (B) (98 mg, 0.38 mmol) se disolvió en 10 mL de metanol bajo calentamiento a reflujo y agitación constante. A la solución amarilla resultante se le agregó paulatinamente propano-1,3-diamina (28 mg, 32 μ L, 0.38 mmol) ante lo cual y de manera inmediata la solución inicial adoptó una coloración naranja característica. Después de 15 minutos, se añadió ácido acético glacial gota a gota para ajustar el pH del sistema dentro del rango ácido recomendado (4-5). Bajo estas circunstancias, se desarrolló la reacción a 70°C durante 3 horas continuas. El progreso de la reacción fue monitoreado por cromatografía en capa fina (CCF) usando hexano/acetato de etilo (10:1, v/v) como fase móvil. Luego, la mezcla obtenida se enfrió durante una hora y el precipitado crudo formado fue filtrado al vacío y lavado con agua, metanol caliente y acetona helada. La purificación se llevó a cabo por recristalización usando 30 mL de una mezcla de solventes (acetato de etilo/metanol = 2:1, v/v); de esta manera, se recolectaron cristales anaranjados del producto de interés (C).

Rendimiento: 58 % (0.06 g)

Solubilidad a 25°C: soluble en DMF, DMSO, diclorometano, cloroformo. Parcialmente soluble en metanol, acetonitrilo, acetona, etanol, acetato de etilo. Insoluble en agua.

FT-IR (KBr, cm^{-1}): 3437 ($\nu_{\text{O-H}}$ fenol); 3057 ($\nu_{\text{C-H}}$ aromático); 2931 ($\nu_{\text{C-H}}$ cadena alifática); 2852 ($\nu_{\text{C-H}}$ imina); 1635 ($\nu_{\text{C=N}}$ imina); 1535, 1484, 1431 ($\nu_{\text{C=C}}$ aromático); 1379 ($\delta_{\text{C-H}}$ imina); 1316 - 926 ($\delta_{\text{C-H}}$ aromático); 870 - 729 ($\pi_{\text{C-H}}$ aromático).

$^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, CDCl_3 , TMS, ppm): 8.62 (m, 2H), 8.47 (s, 2H), 8.08 (m, 2H), 7.96 (d, $J = 7.90$ Hz, 2H), 7.60 - 7.30 (br. s, 2H), 7.51 (m, 2H), 7.45 - 7.40 (m, 2H), 7.38 (m, 2H), 7.00 (t, $J = 7.60$ Hz, 2H), 3.86 (m, 4H), 2.30 (q, $J = 6.60$ Hz, 2H).

$^{13}\text{C-RMN}$ (125 MHz, CDCl_3 , TMS, ppm): 169.02, 160.50, 152.21, 134.11, 133.21, 132.39, 126.09, 124.64, 122.77, 121.54, 118.07, 117.00, 116.78, 58.51, 55.29, 31.28.

ESI-MS ($[\text{M}+\text{H}]^+$). Calculado: m/z 549.49; encontrado: m/z 549.2.

UV-VIS (MeCN, λ_{max} , nm): 228, 449. **Fluorescencia (MeCN, λ_{em} , nm):** 557 ($\lambda_{\text{ex}} = 350$ nm).

7.2.2. Complejo quelato de cobre(II)

7.2.2.1. Cuarta etapa: síntesis *template* del complejo quelato [2,2'-{propano-1,3-diilbis[nitrilo(E)metililideno]}bis[6-(1,3-benzotiazol-2-il)fenolato]- κ^4 -N,N',O,O']cobre(II) (D)

A una solución a reflujo del precursor 3-(1,3-benzotiazol-2-il)-2-hidroxibenzaldehído (**B**) (115 mg, 0.45 mmol) disuelto en una mezcla de cloroformo/etanol (1:10, v/v), se le agregó una cantidad estequiométrica de propano-1,3-diamina (17 mg, 20 μ L, 0.23 mmol). Después de 15 minutos de reacción, a la solución naranja formada de pH neutro se le añadió lentamente, en el transcurso de 15 minutos, acetato de cobre(II) monohidratado (46 mg, 0.23 mmol) disuelto en 5 mL de metanol ligeramente caliente. Bajo estas circunstancias, se pudo observar la formación incipiente de un precipitado marrón cuya cantidad aumentó con el tiempo. La mezcla de reacción, cuyo pH oscila de inicio a fin entre 4 y 5, se mantiene bajo reflujo a 80°C por tres horas adicionales. Después de monitorear el progreso de la reacción con CCF para observar el consumo del intermediario **B**, la mezcla resultante se enfrió a temperatura ambiente y posteriormente dentro de la refrigeradora durante una hora. Finalmente, el precipitado formado fue filtrado al vacío y lavado con agua, metanol caliente y acetona helada.

Rendimiento: 92 % (0.13 g)

Solubilidad a 25°C: parcialmente soluble en DMSO, tetrahidrofurano y cloroformo. Solamente existe disolución total en DMSO caliente.

FT-IR (KBr, cm^{-1}): 3436 ($\nu_{\text{O-H}}$ fenol); 3054 ($\nu_{\text{C-H}}$ aromático); 2940 ($\nu_{\text{C-H}}$ cadena alifática); 2850 ($\nu_{\text{C-H}}$ imina); 1612 ($\nu_{\text{C=N}}$ imina); 1549, 1498, 1434 ($\nu_{\text{C=C}}$ aromático); 1399 ($\delta_{\text{C-H}}$ imina); 1315 - 925 ($\delta_{\text{C-H}}$ aromático); 874 - 729 ($\pi_{\text{C-H}}$ aromático); 534 ($\nu_{\text{Cu-N}}$ complejo); 449 ($\nu_{\text{Cu-O}}$ complejo).

ESI-MS ($[\text{M}]^+$). Calculado: m/z 610.04. Encontrado: m/z 610.2.

UV-VIS (MeCN, λ_{max} , nm): 227, 393. **Fluorescencia (MeCN, λ_{em} , nm):** 453 ($\lambda_{\text{ex}} = 320$ nm).

7.3. Ensayos de cristalización del complejo quelato de cobre(II)

7.3.1. Método 1: evaporación/enfriamiento gradual

En tres viales por separado y a 25°C, se intentó disolver hasta el punto de saturación 5 mg del complejo quelato **(D)** con suficiente cantidad de DMSO, tetrahidrofurano y cloroformo respectivamente. De esta manera, se impulsó la evaporación lenta de los solventes respectivos manteniendo aproximadamente la temperatura inicial de disolución.

De forma paralela y en tres viales diferentes, se disolvieron en caliente 5 mg del nuevo complejo **(D)** con suficiente cantidad de DMSO, tetrahidrofurano y cloroformo. Después, dichas soluciones fueron enfriadas hasta 25°C para impulsar la cristalización de manera gradual.

7.3.2. Método 2: difusión de vapor

Se disolvieron totalmente 5 mg del nuevo complejo de coordinación **(D)** con suficiente cantidad de DMSO en caliente. Esta solución fue colocada en un vial de 5 mL de capacidad. A continuación, dentro de un segundo vial de mayor dimensión, se agregó una mezcla de metanol/agua (solventes más volátiles donde es insoluble el complejo) y dentro del cual fue puesto el primer recipiente que recolecta los vapores condensados de un sistema preferiblemente hermético.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1. Síntesis y purificación

8.1.1. Ligando tipo base de Schiff

8.1.1.1. Primera etapa: síntesis y purificación del precursor 2-(1,3-benzotiazol-2-il)fenol (A)

La obtención del primer precursor sintético (A) fue establecida a partir de dos metodologías sintéticas que fueron ensayadas a diferentes condiciones experimentales. Estos procedimientos se basan en las preparaciones previas de otros benzotiazoles (22,23). Aunque las dos metodologías se relacionan por utilizar los mismos reactivos y solventes, la principal diferencia radica en el uso de distintas temperaturas y tiempos de reacción. Las dos rutas desarrolladas se presentan en la **Tabla 1** y producen eficientemente el mismo compuesto (A). Complementariamente, la secuencia experimental de esta primera etapa se puede apreciar por medio de imágenes en el **Anexo 12.1**.

Tabla 1: Métodos experimentales relacionados a la síntesis del precursor 2-(1,3-benzotiazol-2-il)fenol (A).

Metodologías	Método 1 (23)	Método 2 (22)
Reactivo I: 2-aminotiofenol	6.40 mmol	
Reactivo II: 2-hidroxibenzaldehído	6.40 mmol	
Catalizador: Na₂S₂O₅	6.40 mmol	5.52 mmol
Solvente: DMF	20 mL	
Solvente de extracción: H₂O	50 mL	
Temperatura de reacción (°C)	130°C	110°C
Tiempo de reacción (h)	3 h	15 h
Aspecto físico del producto crudo	Precipitado pardo	
Aspecto físico del producto puro (recristalizado)	Cristales cremas claros	
Rendimiento del producto puro	72 % (1.05 g)	

Las condiciones del *método 1*, que se presentan en el procedimiento detallado de la parte experimental, se basan en el trabajo reportado por Khan y colaboradores (23) para preparar el respectivo benzotiazol (**A**). Esta metodología se fundamenta en una reacción equimolar entre 2-aminotiofenol y 2-hidroxibenzaldehído en DMF seco. En la misma relación estequiométrica, se añadió metabisulfito sódico ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) para catalizar el medio de reacción. Si bien es cierto que la temperatura de reacción no es mencionada en la referencia, tras múltiples ensayos realizados se logró sostener una síntesis a 130°C bajo reflujo durante 3 horas. El tiempo de reacción se estableció supervisando el progreso de la reacción por CCF usando hexano/acetato de etilo (10:1, v/v) como fase móvil. De esta manera, se pudo evidenciar la formación mayoritaria del producto principal. La adición de agua helada a la mezcla de reacción permitió la extracción de **A** mediante precipitación del producto crudo. Cabe mencionar que el agua favorece también la disolución total del catalizador remanente, el cual es muy soluble en dicho solvente (54 g/100 mL) (44). Finalmente, el producto crudo obtenido fue recolectado por filtración al vacío y lavado con abundante agua.

De similar forma, se llevaron a cabo múltiples ensayos para el *método 2* que es reportado por Chang y colaboradores (22). La diferencia fundamental de este caso, además de considerar una cantidad ligeramente menor de catalizador, radica en las condiciones experimentales de la reacción. Probablemente, este hecho se pueda justificar en el propósito de llevar a cabo una reacción bajo circunstancias moderadas para no alterar el rendimiento ni la pureza del producto. En ese sentido, la **Tabla 1** compara y demuestra el uso de una menor cantidad de catalizador a una menor temperatura (110°C) con un mayor tiempo de reacción (aprox. 15 horas). Tanto la pureza y el rendimiento del producto formado (**A**) por ambas rutas son similares, por lo que se usó en adelante el procedimiento del *método 1* reportado por Khan y colaboradores (23) para futuras aplicaciones por ser más conveniente.

La purificación del intermediario (**A**) se llevó a cabo por recristalización en metanol. Con esta cantidad se logró producir y recolectar eficientemente cristales bien definidos del derivado de benzotiazol (**A**) para fines de índole sintéticos (85-90% puro).

El mecanismo de reacción propuesto para esta primera etapa se muestra en la **Figura 15**. En base a esta propuesta, se puede describir principalmente la síntesis del precursor **A** como una *reacción de cicloadición-condensación* catalizada por el metabisulfito de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$). En primer lugar, se indica la formación consecuente de moléculas de agua a partir de la reacción equimolar entre 2-aminotiofenol y 2-hidroxibenzaldehído. En segundo lugar, la participación del $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ como un agente reductor puede inhibir la potencial oxidación del sustrato fenólico (**A**) en polímeros coloreados no deseados; este hecho se conoce

comúnmente como el *pardeamiento no enzimático* o *reacción de Maillard* (45). Sin embargo, fue muy difícil controlar tal acontecimiento bajo las condiciones experimentales desarrolladas. Por tal motivo, la descomposición por pardeamiento no enzimático ha sido por lo general un aspecto inevitable en los múltiples ensayos realizados, siendo el color de la mezcla de reacción un respaldo principal de lo manifestado.

La cantidad del agente antioxidante ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$), en relación estequiométrica con el resto de reactivos de la síntesis establecida (*método 1*), es razonable tal cual lo describe el mecanismo de reacción propuesto en la **Figura 15**. En base a la importancia reactiva del metabisulfito de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$), se estableció aplicar 130°C como temperatura de reacción para no descomponer al mencionado catalizador, el cual tiende a degradarse irremediablemente a temperaturas por encima de 150°C (44).

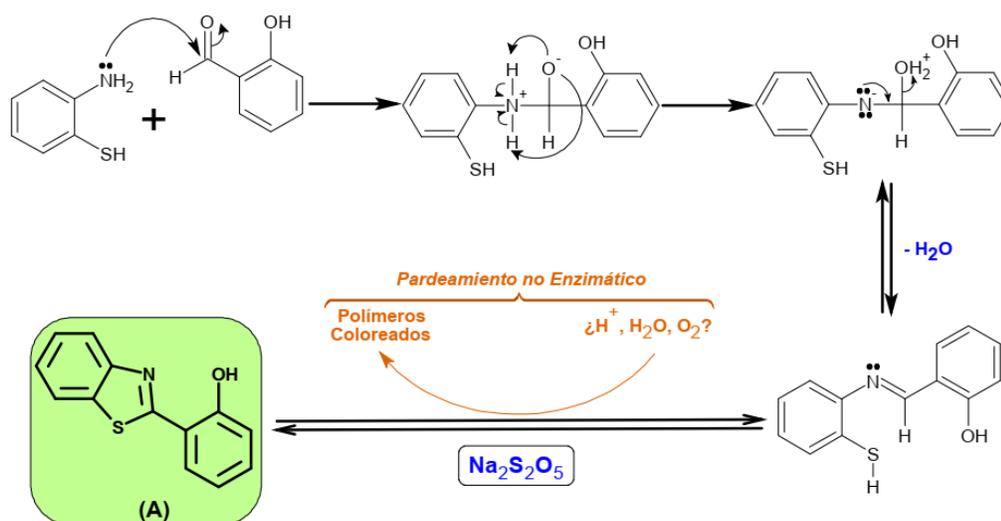


Figura 15: Propuesta del mecanismo de reacción en la síntesis del precursor 2-(1,3-benzotiazol-2-il)fenol **(A)**.

8.1.1.2. Segunda etapa: síntesis y purificación del precursor 3-(1,3-benzotiazol-2-il)-2-hidroxibenzaldehído (B)

La síntesis del precursor (B) se ajusta a ciertas modificaciones que tienen como referencia a la reacción de Duff original (24–26). La reacción de Duff es una reacción de formilación “orto-dirigida” sobre anillos aromáticos activados (fenoles), que utiliza hexametilentetramina (HMTA) como reactante y un catalizador ácido en exceso (26–28). La metodología establecida producto de múltiples intentos, se desarrolla con parámetros experimentales presentados en la **Tabla 2**. Este procedimiento se basa en las modificaciones reportadas por Chang I. J., Xu P., Chang C. y colaboradores (22,29,30). Complementariamente, la secuencia experimental de esta segunda etapa se puede apreciar por medio de imágenes en el **Anexo 12.2**.

Tabla 2: Parámetros experimentales relacionados a la síntesis del precursor 3-(1,3-benzotiazol-2-il)-2-hidroxibenzaldehído (B).

Metodología	Parámetros
Sustrato: Precursor (A)	2.64 mmol
Reactante: Hexametilentetramina (HMTA)	2.64 mmol
Solvente - Catalizador: Ácido trifluoroacético (TFA)	10 mL
<i>Primera parte:</i> Mecanismo clave	100°C, 6 h
<i>Segunda parte:</i> Hidrólisis (HCl 4M, 16.5 mL)	70°C, 2 h
Solvente de extracción: CH₂Cl₂	50 mL
Aspecto físico del producto crudo	Líquido viscoso color pardo
Aspecto físico del producto puro	Sólido color amarillo claro
Rendimiento	20 % (0.13 g)

La síntesis de **B** involucra una reacción equimolar entre el precursor **A** con la respectiva amina cíclica (HMTA) usando un exceso de ácido trifluoroacético (TFA) que actúa como solvente y catalizador. El procedimiento en cuestión tiene dos partes principales que en conjunto conforman la denominada reacción de Duff. La primera de ellas se llevó a cabo a 100°C bajo reflujo durante 6 horas. Este tiempo fue establecido tras supervisar el progreso de la reacción por CCF (eluyente: hexano) teniendo como única referencia el consumo del compuesto de partida (**A**). Cabe mencionar que se exploraron otros tiempos de reacción (5, 7, 8 y 9

horas) pero no se lograron alcances significativos. A continuación, y como segunda instancia, se completó la reacción llevándose a cabo la hidrólisis del intermediario final usando para ello una solución de HCl 4M a 70°C. Solo fue necesario 2 horas adicionales para completar la hidrólisis ácida lo cual se pudo evidenciar por la formación de una mezcla heterogénea. Por último, se utilizó diclorometano (CH₂Cl₂) para la extracción líquido-líquido del producto crudo. Complementariamente, se exploró el mencionado procedimiento sintético, pero bajo atmósfera inerte (N₂) con la esperanza de mejorar tanto la pureza como el rendimiento de reacción del precursor **B**. Sin embargo, bajo la nueva condición experimental no se observó ningún cambio sustancial, por lo que el procedimiento anterior se mantuvo.

La purificación del producto de interés (**B**) fue sin lugar a duda el punto crítico de toda la ruta metodológica. Evidentemente, esta parte fue ensayada con numerosas fases móviles, y el mejor resultado de purificación se estableció por cromatografía en columna (silica gel 60, 0.040-0.063 mm, hexano/acetato de etilo = 10:1, v/v). A pesar de utilizar una columna de dimensiones considerables con la mejor fase móvil y teniendo en cuenta que el compuesto de interés (**B**) tiene un R_f aproximadamente igual a 1/2, la separación no fue del todo selectiva. En base a lo que se demuestra en las placas de CCF y los espectros de ¹H-RMN que se discutirán más adelante, lo que se recolecta es una mezcla de dos componentes contiguos cuyas características químicas (R_f) son muy similares (< 0.1 de diferencia). Esta mezcla está constituida en mayor proporción por el precursor **B** (pureza del 75 %) y por el producto de la formilación en posición "para" (pureza del 25 %) que no es reportado en los artículos de referencia (22,29,30) (ver **Figura 16**). Estos compuestos son razonablemente producidos por la reacción de Duff debido a que el grupo hidroxilo (OH) del sustrato (**A**) actúa naturalmente como un director *orto-para*. Finalmente, el precursor de interés (**B**) se obtuvo como un sólido de color amarillo claro con un 20 % de rendimiento.

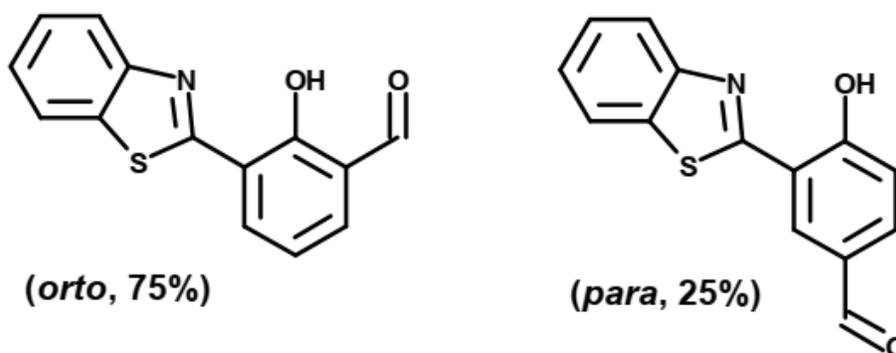


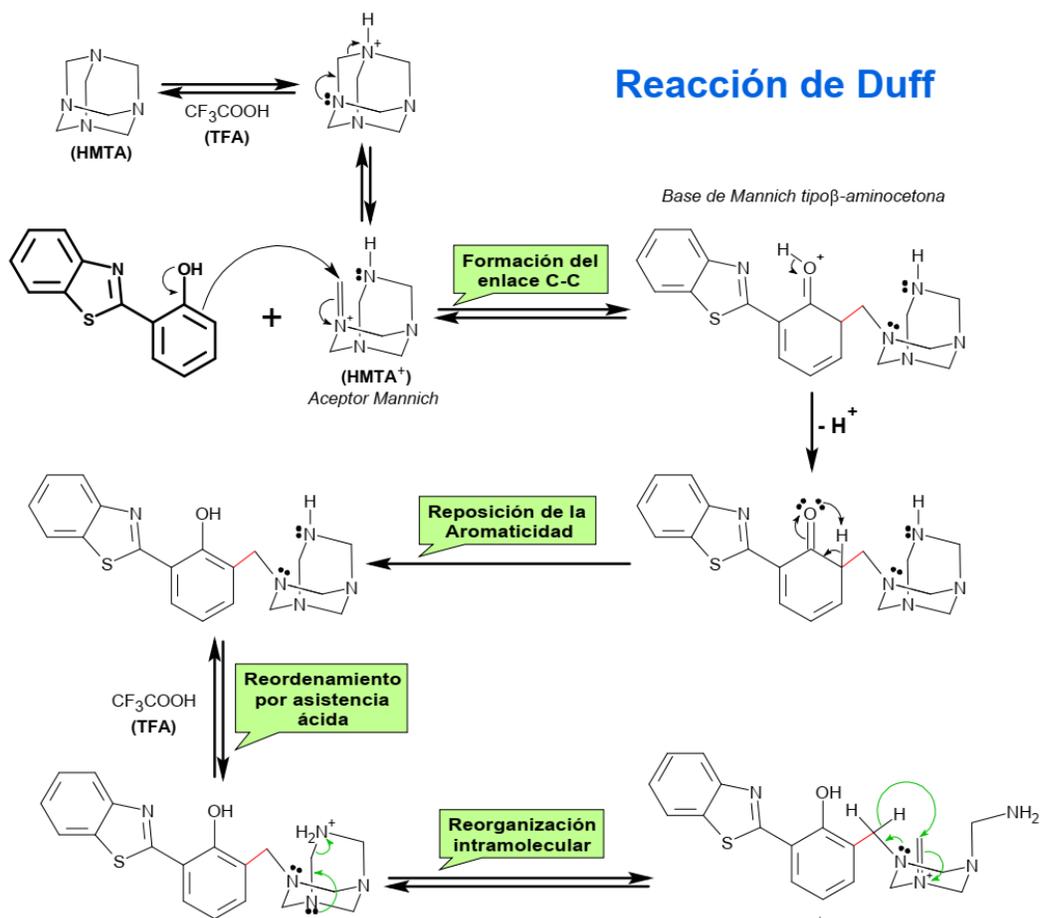
Figura 16: Isómeros de posición *orto* (**B**) y *para* obtenidos de la reacción de Duff.

La propuesta del mecanismo de reacción en la segunda etapa sintética (**Figura 17**) está adaptada a los trabajos de Grimblat N.; March J. y colaboradores (28,46). Al analizar el mecanismo de forma general, se puede observar que la síntesis se desarrolla en dos etapas principalmente. En la primera parte, la formilación de Duff implica una *reacción de tipo Mannich* (formación del enlace C—C), donde la base de Mannich del tipo β -aminocetona actúa como sustrato por su resto carbonilo inicialmente sometido a una orto-aminometilación con hexametilentetramina (HMTA), que a su vez sirve como el componente amino necesario y como la fuente latente de grupos formilo. La reacción, que requiere catálisis ácida, se llevó a cabo en exceso de ácido trifluoroacético (TFA) caliente e implica una serie compleja de pasos (reposición de la aromaticidad, reordenamiento por asistencia ácida, reorganización intramolecular y transposición de hidruros) (ver **Figura 17, 1° Parte**). Es menester destacar para la primera parte, que luego de haber hecho pruebas exploratorias con ácido acético, se estableció trabajar con TFA por ser un ácido mucho más fuerte y por demostrar mejores resultados. Finalmente, se utilizó HCl en medio acuoso para impulsar como última etapa una *reacción de hidrólisis* sobre el intermediario principal, lo que lleva al producto de interés (**B**) (ver **Figura 17, 2° Parte**).

Al estudiar el mecanismo propuesto para esta segunda etapa sintética, se puede justificar la participación de los diferentes parámetros experimentales en cuestión, entre ellos, destaca el uso razonable de la relación estequiométrica (1:1) entre el sustrato fenólico (**A**) y la hexametilentetramina (HMTA) lo cual evitaría una posible diformilación.

Por otro lado, dentro del mecanismo propuesto de la **Figura 17**, es viable la posibilidad de una competencia por la *formilación de Duff* “*para-dirigida*”, pues como ya se mencionó, el grupo hidroxilo (OH) del sustrato **A** puede actuar también como un director *para*. Naturalmente, esta competencia le resta regioselectividad a la reacción de Duff desarrollada, por ende, es evidente obtener rendimientos bajos del producto de interés (**B**) (20 %).

1° PARTE



2° PARTE

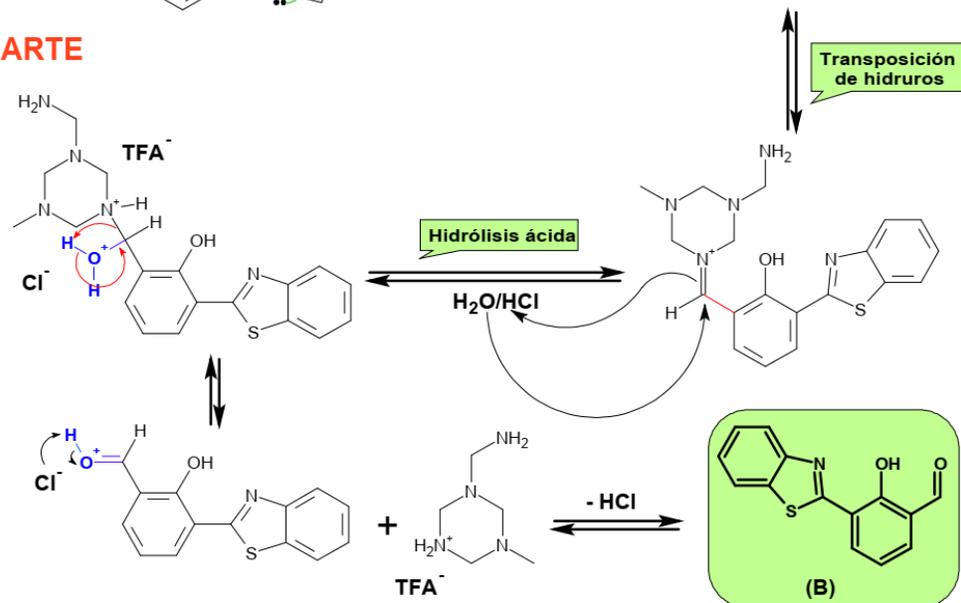


Figura 17: Propuesta del mecanismo de reacción en la síntesis del precursor 3-(1,3-benzotiazol-2-il)-2-hidroxibenzaldehído **(B)** (28,46).

8.1.1.3. Tercera etapa: síntesis y purificación del ligando 2,2'-{propano-1,3-diilbis[nitrilo(*E*)metililideno]}bis[6-(1,3-benzotiazol-2-il)fenol] (C)

El ligando del tipo base de Schiff (**C**), propuesto como un ejemplar tetradentado y simétrico con dos restos de benzotiazol, no ha sido reportado hasta la fecha. La síntesis de este compuesto se basó en una reacción de condensación para formar el grupo funcional imina, que se conoce comúnmente como base de Schiff ($R_1R_2C=N-R_3$) (31). Por lo general, estos compuestos se originan cuando aldehídos o cetonas reaccionan reversiblemente con una amina primaria bajo catálisis ácida y/o por calentamiento moderado; de esta manera, se produce la base en cuestión y la pérdida consecuente de moléculas de agua (31,32). Particularmente, la tercera etapa se llevó a cabo por una *doble reacción de condensación simultánea* que fue impulsada por los dos grupos aminos ($R-NH_2$) de una diamina acíclica primaria. La metodología establecida, cuyos parámetros experimentales se describen en la **Tabla 3**, fue adaptada principalmente de síntesis similares (17,19–22,33–36). Para complementar el trabajo propuesto, la secuencia experimental de esta tercera etapa se puede apreciar por medio de imágenes en el **Anexo 12.3**.

Tabla 3: Parámetros experimentales relacionados a la síntesis del ligando 2,2'-{propano-1,3-diilbis[nitrilo(*E*)metililideno]}bis[6-(1,3-benzotiazol-2-il)fenol] (**C**).

Metodología	Parámetros
Sustrato: Precursor (B)	0.38 mmol
Diamina acíclica primaria: Propano-1,3-diamina	0.38 mmol (<i>en exceso</i>)
Catalizador: Ácido acético glacial	pH (4-5)
Solvente: Metanol	10 mL
Temperatura de reacción (°C)	70°C
Tiempo de reacción (h)	3 h
Aspecto físico del producto crudo	Precipitado anaranjado
Aspecto físico del producto puro	Cristales anaranjados
Rendimiento	58 % (0.06 g)

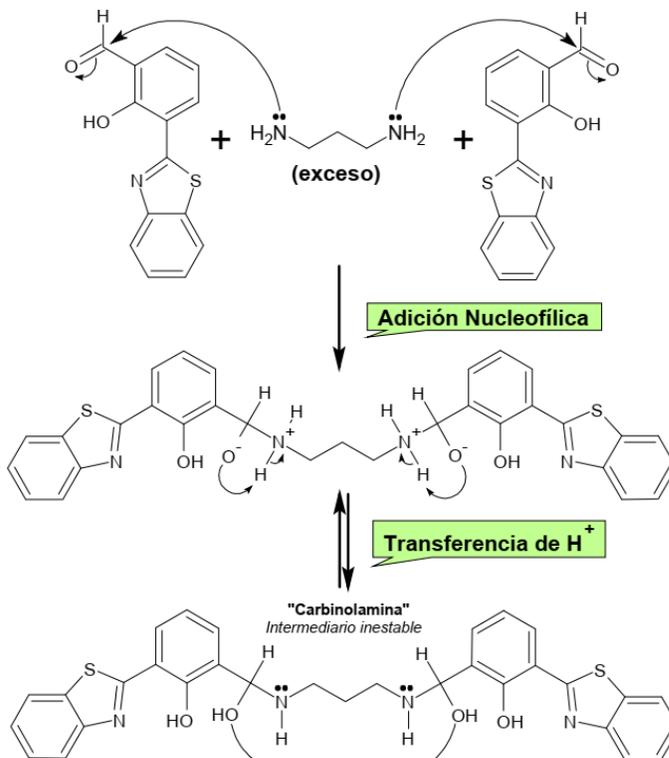
En base a lo anterior expuesto, se presenta un procedimiento experimental en donde el aldehído de interés (**B**), previamente obtenido por la reacción de Duff y considerando su porcentaje de pureza, reacciona por condensación con un exceso de propano-1,3-diamina en la relación

molar (2:1) tal como se plantea en el mecanismo propuesto de la **Figura 18**. En esta parte, tras múltiples ensayos, se estableció el uso de metanol como el mejor solvente para desarrollar la reacción bajo reflujo a una temperatura de 70°C. Seguidamente, se utilizó ácido acético glacial como catalizador para ajustar el pH de la solución dentro del rango ácido recomendado (4-5) (31), y esto mejoró considerablemente el rendimiento de la reacción. Después de tres horas de reacción, el ligando (**C**) fue separado de la solución por precipitación como un sólido anaranjado.

La purificación del ligando en cuestión (**C**) se intentó alcanzar por recristalización en una mezcla de solventes (acetato de etilo/metanol = 2:1, v/v). Como resultado de la técnica, se recolectaron pequeños cristales de color anaranjado. A pesar de someter el producto de reacción a una recristalización, la pureza del ligando de interés (**C**) es todavía un aspecto a mejorar ya que otra molécula (formada a partir de la reacción del aldehído en el isómero *para* con la propano-1,3-diamina) co-cristaliza con el ligando de interés (**C**). Esto se explica pues el reactivo inicial contiene una mezcla de aldehídos (isómeros *orto* y *para*) que reaccionan al mismo tiempo por condensación, por ende, los respectivos productos son difícilmente separables. Esto se demuestra más adelante en la caracterización por espectroscopía de ¹H-RMN.

La propuesta del mecanismo de reacción en la tercera etapa sintética (**Figura 18**) es adaptada a los fundamentos teóricos de Wade L. G. y March J. (31,46). Al analizar el mecanismo propuesto, se puede argumentar que la síntesis se desarrolla esencialmente en dos pasos continuos dentro de una *doble reacción de condensación simultánea*. En la primera parte, se describe la posibilidad de una adición nucleofílica impulsada por el ataque de la amina en exceso sobre el grupo carbonilo del sustrato (**B**). Este camino conlleva a la formación transitoria de un intermediario inestable denominado *carbinolamina* o *hemiaminal*. Por último, en una segunda etapa, se puede apreciar la condensación del intermediario respectivo gracias al efecto catalítico del ácido acético glacial dentro del pH ácido recomendado (4-5), todo esto conlleva a la formación del producto final de interés (**C**). En base al mecanismo propuesto, se puede argumentar también la razón de emplear un exceso de la diamina correspondiente, y es que, al tratarse de una reacción naturalmente reversible, fue conveniente desplazar el equilibrio en la dirección deseada aplicando el principio de Le Châtelier. Por último y no menos importante, se debe destacar también la participación del catalizador ácido como pieza fundamental en el mecanismo de reacción. De esta manera, el ácido acético impulsaría la condensación final mediante la transferencia de protones al intermediario inestable *carbinolamina*.

1° PASO
formación
inmediata de la
carbinolamina



2° PASO
condensación
catalizada por
CH₃COOH (pH: 4-5)

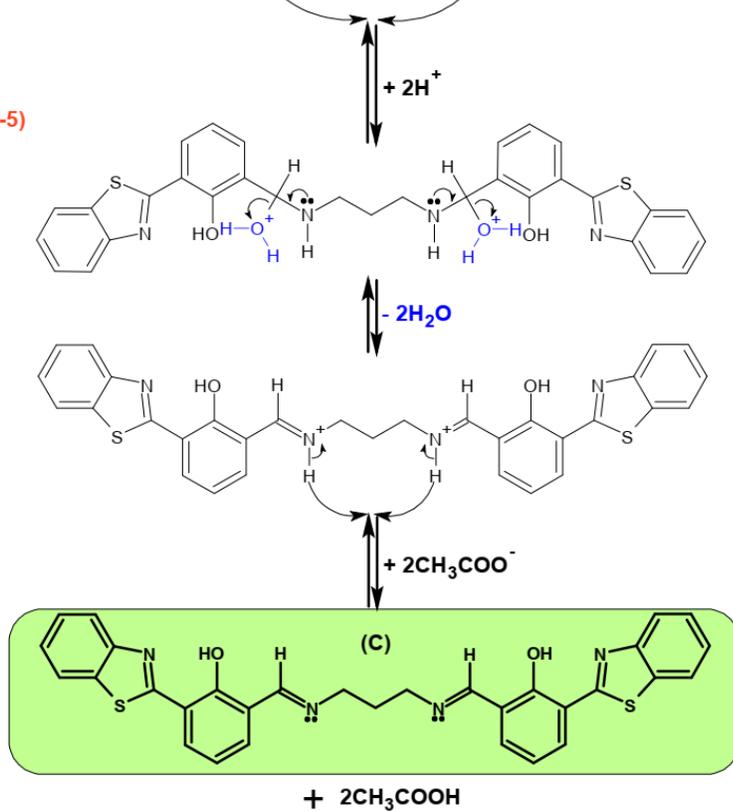


Figura 18: Propuesta del mecanismo de reacción en la síntesis del ligando 2,2'-{propano-1,3-diilbis[nitrilo(*E*)metililideno]}bis[6-(1,3-benzotiazol-2-il)fenol] **(C)** (31,46).

8.1.2. Complejo quelato de cobre(II)

8.1.2.1. Cuarta etapa: síntesis *template* del complejo quelato [2,2'-{propano-1,3-diilbis[nitrilo(*E*)metililideno]}bis[6-(1,3-benzotiazol-2-il)fenolato]- κ^4 -*N,N',O,O'*]cobre(II) (D)

La síntesis del complejo de cobre(II) (D) consiste en la aplicación del efecto *template* o “plantilla” del centro metálico (Cu^{2+}). Cabe mencionar que esta alternativa se basa en adaptaciones de muchos trabajos y publicaciones (19–21,33,34,37–41) que guardan estrecha relación con la metodología sintética establecida. En resumen, la síntesis se basa en una reacción *template* muy eficiente (con un 92 % de rendimiento), que utiliza como sustrato al precursor **B** para producir el mencionado complejo de interés (D) en un solo paso concertado, y sin necesidad de la síntesis previa del ligando tipo base de Schiff (C). La **Tabla 4** presenta los parámetros experimentales aplicados; y el **Anexo 12.4**, la secuencia experimental de esta etapa por medio de imágenes.

Tabla 4: Parámetros experimentales relacionados a la síntesis del complejo quelato [2,2'-{propano-1,3-diilbis[nitrilo(*E*)metililideno]}bis[6-(1,3-benzotiazol-2-il)fenolato]- κ^4 -*N,N',O,O'*]cobre(II) (D).

Metodología	Parámetros
Sustrato: Precursor (B)	0.45 mmol
Diamina acíclica primaria: Propano-1,3-diamina	0.23 mmol
Plantilla: $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.23 mmol
Solvente: $\text{CHCl}_3:\text{EtOH}:\text{MeOH}$	16 mL (1:10:5)
Temperatura de reacción (°C)	80°C
Tiempo de reacción (h)	3 h
Aspecto físico del producto crudo	Precipitado marrón
Aspecto físico del producto puro	Cristales marrones
Rendimiento	92 % (0.13 g)

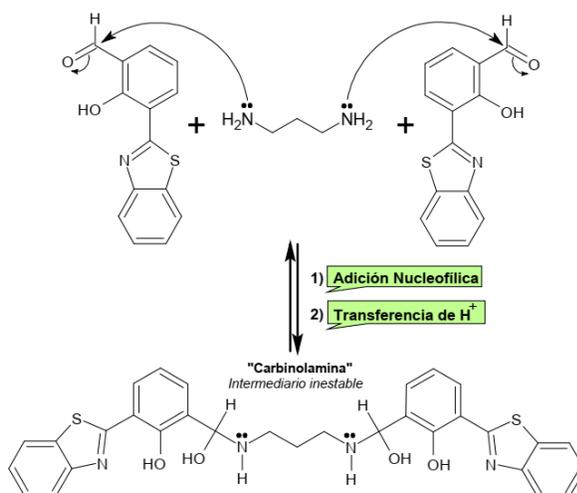
El procedimiento experimental de esta etapa utiliza el aldehído principal (B) con su respectivo porcentaje de pureza (75 %). La reacción se desarrolla con propano-1,3-diamina en la relación molar (2:1) sobre una mezcla de cloroformo/etanol (1:10, v/v). Después de 15 minutos de reacción, a la solución naranja formada de pH neutro se le añadió lentamente acetato de cobre(II) disuelto en 5 mL de metanol. Bajo estas circunstancias, se pudo observar la formación incipiente de un precipitado

marrón cuya cantidad aumentó con el tiempo. La mezcla de reacción cuyo pH se encontró de inicio a fin entre 4 y 5, se desarrolló bajo reflujo a 80°C por tres horas adicionales. Cabe mencionar que el tiempo fue establecido por CCF tras observar solamente el consumo total del aldehído principal **B** (isómero *orto*). Evidentemente, la señal que representa al otro aldehído (isómero *para*) permaneció en el sistema sin reaccionar. Es importante mencionar que el efecto *template* establecido fue necesario para aumentar la regioselectividad de la ruta metodológica principal, la cual conlleva al objetivo central que es sintetizar eficientemente el complejo de interés (**D**). Es por esta razón que no se optó por la *reacción de doble desplazamiento* (ruta convencional) entre la especie metálica (Cu^{2+}) y el ligando tipo base de Schiff (**C**) previamente sintetizado.

La propuesta del mecanismo de reacción en la cuarta etapa sintética (**Figura 19**) es adaptada de los fundamentos teóricos de Wade L. G. y March J. (31,46) y de los trabajos ya reportados por diversos autores (19–21,33,34,37–41). Esta propuesta describe la síntesis como una *reacción de efecto template* o “*plantilla*” dentro de una sola etapa muy eficiente que conduce la formación del complejo quelato (**D**). A manera de hipótesis, un paso previo contemplaría la formación transitoria del intermediario inestable *carbinolamina*, el cual, como en el mecanismo anterior (formación del ligando base de Schiff, ver **Figura 18**), justifica una reacción reversible de adición nucleofílica. Inmediatamente después, se manifiesta la participación oportuna de la especie Cu^{2+} con su respectivo efecto *template*, en donde además la estequiometría y el carácter básico del contraión acetato (CH_3COO^-) desempeñan un papel determinante dentro de la ruta química propuesta. Como es de esperarse, la mezcla final de reacción presenta un pH ácido por la correspondiente formación de ácido acético (CH_3COOH) que en paralelo impulsa también una reacción de condensación. Es fundamental mencionar que la destacada regioselectividad del efecto *template* por el aldehído **B** (isómero *orto*) se justificaría en la formación eficiente del producto más estable (*complejo quelato*) tal como se propone en el mecanismo de la **Figura 19**.

Es pertinente mencionar que los *agregados de coordinación* formados instantáneamente se vuelven por naturaleza *altamente insolubles* con respecto al sistema de solventes cuya capa de solvatación va perdiendo movilidad y *entropía* ($\Delta S < 0$). Esto último probablemente se justifique en las altas *energías de enlace por coordinación* (*formación de quelatos*), y al *efecto hidrofóbico* $\pi-\pi$ que los restos de benzotiazol pueden fomentar en el ambiente estructural. Naturalmente y a consecuencia de la pérdida de entropía que experimenta la capa de solvatación, se puede producir de *forma espontánea* un *proceso de autoensamblaje* que es termodinámicamente favorable ($\Delta G < 0$). En otras palabras, es posible la formación de un complejo neutro con residuos hidrofóbicos que causan la baja solubilidad (precipitación) en el medio de reacción.

1° PARTE formación previa de la carbinolamina



2° PARTE efecto "template" del $Cu(CH_3COO)_2$

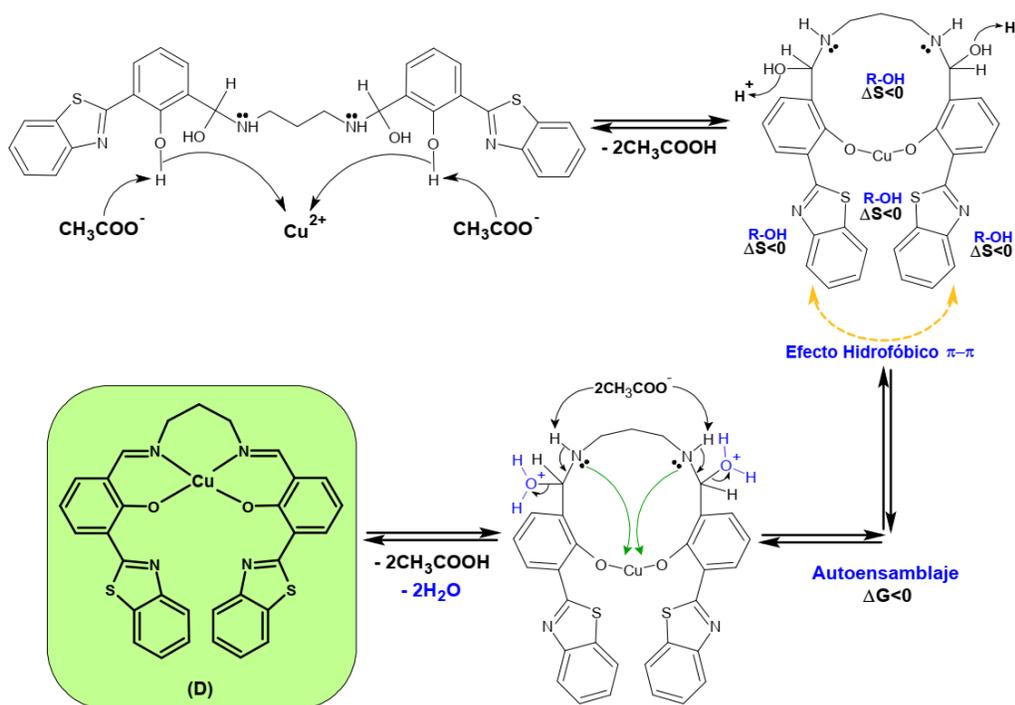


Figura 19: Propuesta del mecanismo de reacción en la síntesis del complejo quelato [2,2'-{propano-1,3-diilbis[nitrilo(*E*)metilideno]}bis[6-(1,3-benzotiazol-2-il)fenolato]- κ^4-N,N',O,O']cobre(II) (**D**).

8.1.2.2. Ensayos de cristalización

- **Método 1: evaporación/enfriamiento gradual**

Resultado: Después de un mes, se observó la precipitación de un sólido color marrón en las soluciones de cloroformo y tetrahidrofurano; para el caso del DMSO no se obtuvo cristalización alguna en el tiempo mencionado; sin embargo, la posibilidad de un resultado positivo sigue latente para el futuro más próximo.

- **Método 2: difusión de vapor**

Resultado: Al cabo de dos a tres semanas, sin perturbar el sistema, se lograron recolectar monocristales de color marrón oscuro tal como se pueden evidenciar en las fotografías del **Anexo 12.5**.



8.2. Caracterización

Los precursores sintéticos (**A**, **B**), el ligando tipo base de Schiff (**C**) y el complejo quelato (**D**) fueron caracterizados por espectroscopía infrarroja (IR), espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) y espectrometría de masas (ESI-MS). Complementariamente, el ligando **C** y el complejo **D** fueron analizados por espectroscopías UV-VIS y de fluorescencia. La asignación de las señales en los espectros ^1H -RMN fue directa; sin embargo, para la asignación en los espectros ^{13}C -RMN fue necesario recurrir a las técnicas bidimensionales ^1H - ^{13}C HSQC y ^1H - ^1H COSY para un mejor estudio. Asimismo, es pertinente aclarar que las asignaciones realizadas para todos los casos mediante RMN se presentan como numeraciones arbitrarias basadas principalmente en el orden de aparición de las señales del carbono (de menor a mayor desplazamiento químico, δ) de los espectros ^{13}C -RMN.

8.2.1. Primer precursor sintético 2-(1,3-benzotiazol-2-il)fenol (**A**)

8.2.1.1. Espectroscopía infrarroja (FT-IR)

En la **Figura 20** se presenta el espectro completo FT-IR (KBr) del precursor 2-(1,3-benzotiazol-2-il)fenol (**A**), mientras que en la **Tabla 5** se resumen las asignaciones de las principales bandas de absorción IR en números de onda (cm^{-1}) correspondientes a los grupos funcionales de la molécula. Para la asignación se emplearon los argumentos teóricos de diferentes autores (47,48).

Dentro de la región característica de los grupos funcionales (aprox. $4000\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$) en el espectro mencionado, se observa la vibración correspondiente al estiramiento del O—H fenólico a 3450 cm^{-1} como una banda ancha y de intensidad característica que permite confirmar la formación del producto deseado (**A**) después del proceso de secado. Por tal, se descarta la posibilidad de interferencia por parte del agua de lavado y/o metanol de recristalización. Asimismo, dentro de esta región destaca la señal poca intensa correspondiente al estiramiento C—H aromático a 3058 cm^{-1} .

Entre la zona de grupos funcionales y la región de huellas dactilares ($1600\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$), sobresale las vibraciones pertenecientes al estiramiento del grupo C=N del tiazol a 1623 y 1590 cm^{-1} . Estas señales, desde el punto de vista sintético, son las más importantes porque permiten elucidar y confirmar la correcta formación del precursor **A**. Seguidamente, se observan las vibraciones del estiramiento C=C aromático comprendidas entre 1487 (s), 1439 y 1405 cm^{-1} . A menores frecuencias, destaca la flexión O—H en el plano del fenol a 1316 cm^{-1} con una intensidad media. Lo mismo sucede con las señales a 1272 y 1262

cm⁻¹ correspondientes a la flexión C—H en el plano del anillo fenólico. También, sobresale el estiramiento C—O del fenol a 1220 cm⁻¹; y las bandas a 1034 y 974 cm⁻¹ pertenecientes a la flexión C—H en el plano del anillo benzotiazol.

Finalmente, dentro de la región aromática (900-675 cm⁻¹), destacan las bandas características a las flexiones C—H fuera del plano, a 818 cm⁻¹ para el caso del fenol, y a 757, 742 (s) y 734 cm⁻¹ para el respectivo anillo benzotiazol.

Tabla 5: Asignaciones de las principales bandas de absorción FT-IR (KBr) del precursor 2-(1,3-benzotiazol-2-il)fenol (**A**).

2-(1,3-benzotiazol-2-il)fenol (A)	
Tipos de vibraciones IR (grupo estructural)	Bandas de absorción FT-IR (cm⁻¹)
$\nu(\text{O—H})$ Fenol	3450
$\nu(\text{C—H})$ Aromático	3058
$\nu(\text{C=N})$ Tiazol	1623, 1590
$\nu(\text{C=C})$ Aromático	1487, 1439, 1405
$\delta(\text{O—H})$ Fenol	1316
$\delta(\text{C—H})$ Aromático/Fenol	1272, 1262
$\nu(\text{C—O})$ Fenol	1220
$\delta(\text{C—H})$ Aromático/Benzotiazol	1034, 974
$\pi(\text{C—H})$ Aromático/Fenol	818
$\pi(\text{C—H})$ Aromático/Benzotiazol	757, 742, 734
Considérese las siguientes abreviaturas; ν : estiramiento δ : flexión en el plano π : flexión fuera del plano	

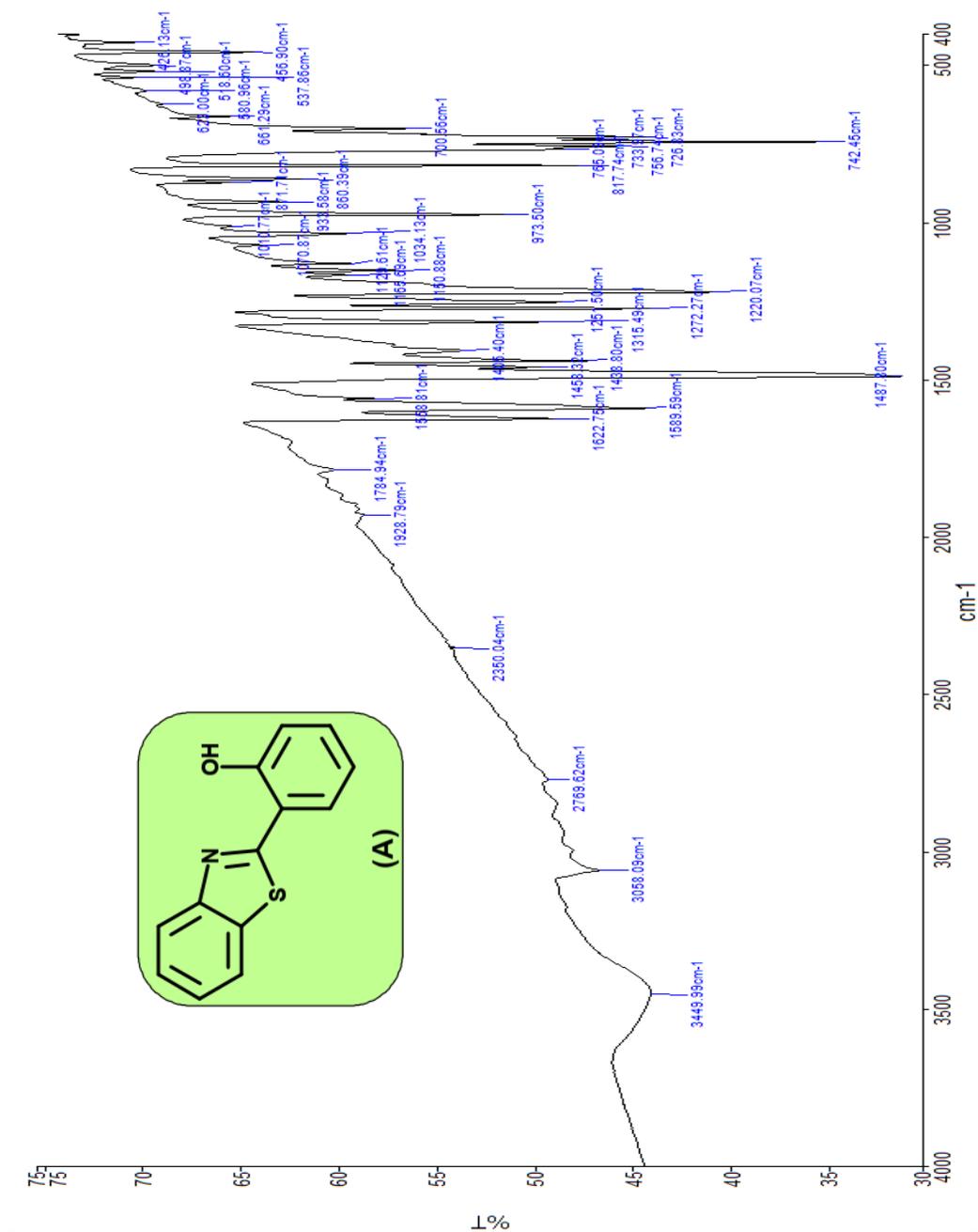


Figura 20: Espectro FT-IR (KBr) del precursor 2-(1,3-benzotiazol-2-il)fenol (A).

8.2.1.2. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN)

Un análisis al detalle del presente precursor sintético (**A**), mediante la espectrometría de resonancia magnética nuclear, ha permitido satisfactoriamente procesar y asignar los restos orgánicos principales de la molécula en cuestión. La **Tabla 6** presenta a modo de resumen las correspondientes asignaciones estructurales del 2-(1,3-benzotiazol-2-il)fenol (**A**) por medio de los datos RMN tomados en CDCl₃. Así mismo, las **Figuras 21** y **22** presentan los espectros RMN que sostienen el análisis mencionado.

Tabla 6: Compendio de los datos obtenidos de los análisis espectrales RMN del 2-(1,3-benzotiazol-2-il)fenol (**A**) tomados en CDCl₃ y a 25°C.

2-(1,3-benzotiazol-2-il)fenol (A)					
C _{num}	δ _c (ppm)	δ _H (ppm)	Multiplicidad	³ J _{H-H} (Hz)	¹ H— ¹ H COSY
1	116.73	-	-	-	-
2	117.81	7.12	Doblete(d)	7.90	H ₂ ↔H ₉
3	119.46	6.96	Triplete(t)	7.50x(2)	H ₃ ↔H _{8,9}
4	121.45	7.89	Doblete(d)	7.90	H ₄ ↔H _{5,6,7}
5	122.12	7.99	Doblete(d)	8.20	H ₅ ↔H _{4,6,7}
6	125.48	7.40	Multiplete(m)	-	H ₆ ↔H _{4,5,7}
7	126.63	7.51	Triplete(t)	7.70x(2)	H ₇ ↔H _{4,5,6}
8	128.36	7.69	Doblete(d)	7.80	H ₈ ↔H ₃
9	132.53	7.40	Multiplete(m)	-	H ₉ ↔H _{2,3}
10	132.70	-	-	-	-
11	151.78	-	-	-	-
12	157.89	12.53(OH)	Singulete(s)	-	-
13	169.31	-	-	-	-

El análisis por resonancia magnética nuclear ¹H-RMN del precursor **A** demuestra en general dos zonas características y bien delimitadas; la primera de ellas, establece una serie de protones naturalmente aromáticos (rango de 6.5-8.5 ppm) los cuales, en base a las condiciones instrumentales y a la disposición estructural de la molécula, evidencian fundamentalmente acoplamiento de parte de sus vecinos en posición *orto* (6-10 Hz). La otra región, a campo más bajo y con un mayor desplazamiento químico (δ, 12.53 ppm), contiene a otra señal característica cuyo perfil espectral sin acoplamiento (singulete ancho) propone la presencia de un protón hidroxílico (OH). Es importante mencionar que las integrales de las señales toman como referencia principal al H₃ (integración = 1.00) por estar en posición *orto* respecto al grupo OH en la molécula **A**, y porque dicha señal tendrá un papel determinante en los espectros ¹H-RMN de los próximos compuestos en los cuales debería permanecer como una constante.

Por su parte, el estudio por resonancia magnética nuclear del carbono-13 (^{13}C -RMN) avala lo anteriormente discutido, mostrando en esencia carbonos del tipo aromáticos (rango de 110-140 ppm), de los cuales algunos (C_{13} , C_{12} , C_{11}) presentan mayores desplazamientos a campo bajo por el simple hecho de estar enlazados directamente a heteroátomos electronegativos (N, O, S). En conclusión, después de analizar los espectros RMN monodimensionales (^1H -RMN y ^{13}C -RMN) que se exponen en la **Figura 21**, y al contrastarlos con las referencias bibliográficas (30,47), se puede establecer la confirmación del presente precursor sintético (**A**) de muy buena pureza que es reflejada por las integrales de las señales respectivas del espectro ^1H -RMN.

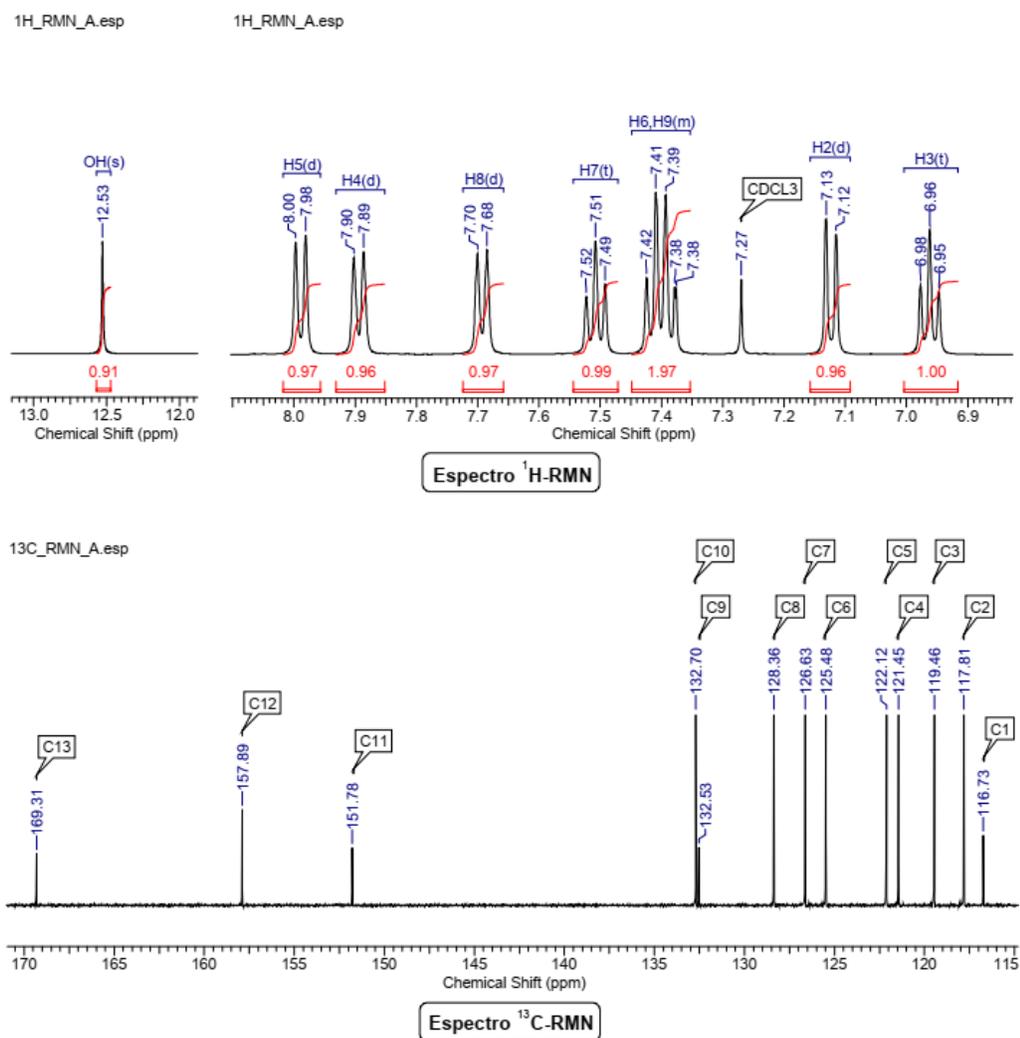


Figura 21: Espectros monodimensionales de resonancia magnética nuclear (^1H -RMN y ^{13}C -RMN) del precursor 2-(1,3-benzotiazol-2-yl)fenol (**A**).

Por otro lado, la asignación completa se ha logrado por medio del análisis de los espectros bidimensionales de resonancia magnética nuclear que

se presentan en la **Figura 22** y cuyos datos se resumen en la **Tabla 6**. Los datos muestran las interacciones ^{13}C - ^1H y ^1H - ^1H a través de las técnicas HSQC y COSY respectivamente. Con estos, se logró asignar los protones H_2 y H_3 orientados, con referencia al OH, en las posiciones *orto* y *para* respectivamente.

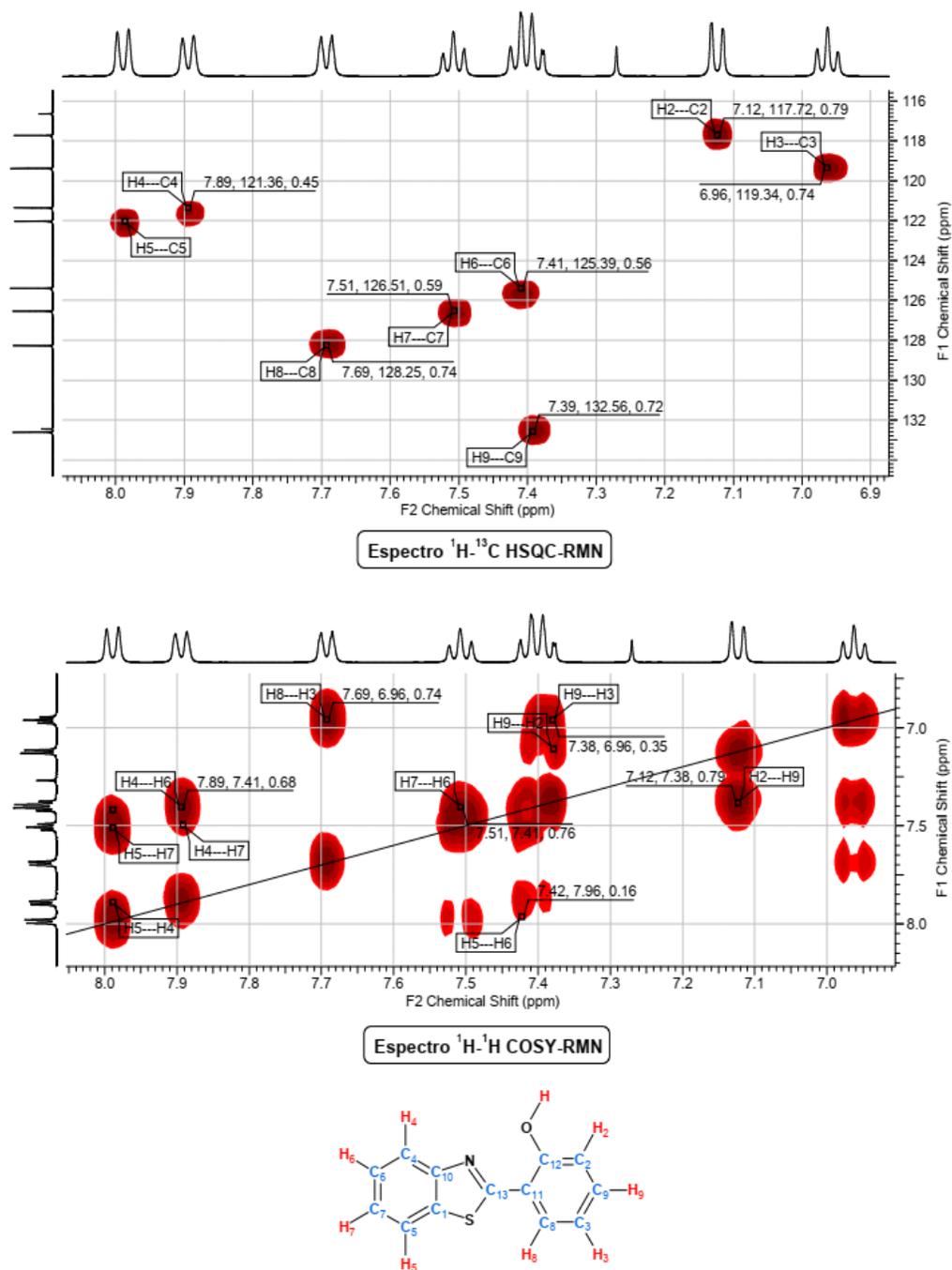


Figura 22: Espectros bidimensionales de resonancia magnética nuclear (^1H - ^{13}C HSQC-RMN y ^1H - ^1H COSY-RMN) del precursor 2-(1,3-benzotiazol-2-il)fenol (**A**).

8.2.1.3. Espectrometría de masas

La presente espectrometría ha permitido confirmar la presencia del precursor sintético **A**. En base a la técnica empleada (ESI-MS), en donde se asume una escasa fragmentación inicial, y en donde solo se reflejan los resultados de una leve ionización, es pertinente destacar las señales espectrales correspondientes a los *iones aductos* (positivos: $[M+H]^+$ y $[M+Na]^+$) que revelan la masa molecular del precursor 2-(1,3-benzotiazol-2-il)fenol (**A**). Las señales dentro de la zona activa de la relación m/z (300-400) solo reflejan la participación del blanco (BK) con sus respectivos iones. En general, los datos obtenidos se resumen en la **Tabla 7**, y los mismos son avalados por el correspondiente espectro registrado en la **Figura 23**, que además son cotejados con la literatura pertinente (23,49).

Tabla 7: Datos de la espectrometría de masas (ESI-MS) del precursor 2-(1,3-benzotiazol-2-il)fenol (**A**).

2-(1,3-benzotiazol-2-il)fenol (A)			
Masa molecular exacta (M): 227.04 g/mol			
Iones Aductos	Relación m/z calculada	Relación m/z encontrada	Intensidad ($\times 10^6$)
$[M+H]^+$	228.04	228.1	1.25
$[M+Na]^+$	250.04	250.1	0.25

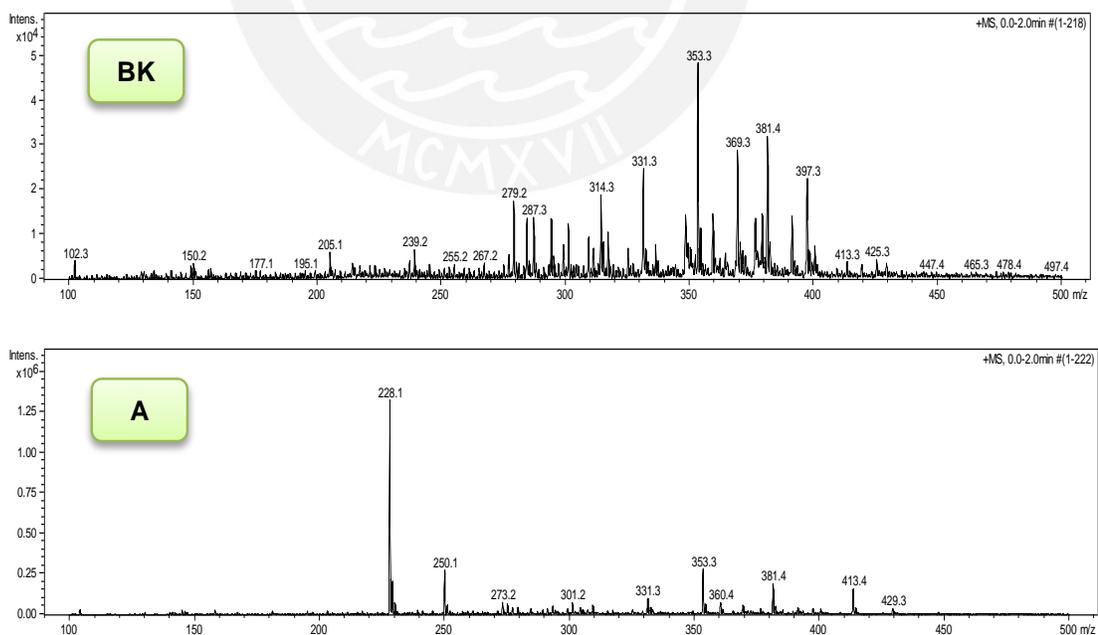


Figura 23: Espectro ESI-MS del precursor 2-(1,3-benzotiazol-2-il)fenol (**A**).

8.2.2. Segundo precursor sintético 3-(1,3-benzotiazol-2-il)-2-hidroxibenzaldehído (B)

8.2.2.1. Espectroscopía infrarroja (FT-IR)

La **Figura 24** muestra el espectro completo FT-IR (KBr) del precursor 3-(1,3-benzotiazol-2-il)-2-hidroxibenzaldehído (**B**), mientras que en la **Tabla 8** se asignan las principales bandas de absorción IR en números de onda (cm^{-1}) correspondientes a los grupos funcionales de la molécula. Para dicha asignación se emplearon los argumentos teóricos de diferentes autores (47,48).

En la región característica de los grupos funcionales (aprox. $4000\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$) del espectro mencionado, se observa la vibración correspondiente al estiramiento del O—H fenólico que ha disminuido a 3437 cm^{-1} con respecto a 3450 cm^{-1} del precursor **A**. Su intensidad es prácticamente la misma pero la señal se desplaza a menores frecuencias debido al efecto que ejercería el puente de hidrógeno intramolecular provocado por la disposición estructural del precursor de interés (**B**). La interferencia por solventes acuosos provenientes de la etapa sintética (hidrólisis) es una posibilidad, sin embargo, no es un hecho que altere significativamente el análisis. Asimismo, dentro de esta región destaca la señal poco intensa correspondiente al estiramiento C—H aromático a 3058 cm^{-1} y principalmente la del correspondiente aldehído (C—H) a 2870 y 2765 cm^{-1} . También, es pertinente destacar como evidencia principal a la señal 1683 cm^{-1} que representaría al estiramiento C=O del aldehído de interés (**B**). La presencia de insaturaciones, anillos aromáticos y/o grupos funcionales vecinos pueden alterar la frecuencia de absorción del grupo carbonilo en aldehídos similares. Un ejemplo de referencia sería el salicilaldehído, un aldehído aromático con un grupo OH en posición *orto* cuyo estiramiento C=O vibra a 1666 cm^{-1} (47), una señal muy cercana al presente caso (1683 cm^{-1}). Por tal motivo, las últimas señales en discusión confirmarían la formación del precursor **B** como un aldehído aromático con un grupo hidroxilo (OH) en posición *orto*. Cerca de la señal principal (1683 cm^{-1}), se superpone una pequeña banda a 1701 cm^{-1} que podría representar el otro aldehído obtenido (isómero *para*). Por último, sobresalen en esta región las vibraciones pertenecientes al estiramiento del grupo C=N a 1622 y 1595 cm^{-1} propias del esqueleto de benzotiazol.

Por otro lado, en la zona de huellas dactilares ($1600\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$), destacan las vibraciones del estiramiento C=C aromático comprendidas entre 1475 , 1459 y 1440 cm^{-1} . Además, destaca la flexión C—H en el plano del aldehído (**B**) a 1393 cm^{-1} con una intensidad leve pero característica. Igual sucede con las señales a 1279 y 1260 cm^{-1} correspondientes a la flexión C—H en el plano del anillo fenólico. Asimismo, se puede distinguir aún el estiramiento C—O del fenol a 1225 cm^{-1} , y las bandas a 1038 , 1013 y 993 cm^{-1} pertenecientes a la flexión C—H en el plano del anillo benzotiazol.

Finalmente, dentro de la región aromática (900-675 cm^{-1}), destacan las bandas características a las flexiones C—H fuera del plano, a 811 cm^{-1} para el caso del fenol, y a 756, 745 y 725 cm^{-1} para el respectivo anillo benzotiazol.

Tabla 8: Asignaciones de las principales bandas de absorción FT-IR (KBr) del precursor 3-(1,3-benzotiazol-2-il)-2-hidroxibenzaldehído (**B**).

3-(1,3-benzotiazol-2-il)-2-hidroxibenzaldehído (B)	
Tipos de vibraciones IR (grupo estructural)	Bandas de absorción FT-IR (cm^{-1})
$\nu(\text{O—H})$ Fenol	3437
$\nu(\text{C—H})$ Aromático	3058
$\nu(\text{C—H})$ Aldehído	2870, 2765
$\nu(\text{C=O})$ Aldehído	1683*
$\nu(\text{C=N})$ Tiazol	1622, 1595
$\nu(\text{C=C})$ Aromático	1475, 1459, 1440
$\delta(\text{C—H})$ Aldehído	1393
$\delta(\text{C—H})$ Aromático/Fenol	1279, 1260
$\nu(\text{C—O})$ Fenol	1225
$\delta(\text{C—H})$ Aromático/Benzotiazol	1038, 1013, 993
$\pi(\text{C—H})$ Aromático/Fenol	811
$\pi(\text{C—H})$ Aromático/Benzotiazol	756, 745, 725
Considérese las siguientes abreviaturas; ν : estiramiento δ : flexión en el plano π : flexión fuera del plano	

*Superpuesto con la banda 1701 (w) que representa a la vibración $\nu(\text{C=O})$ de su respectivo isómero “para”.

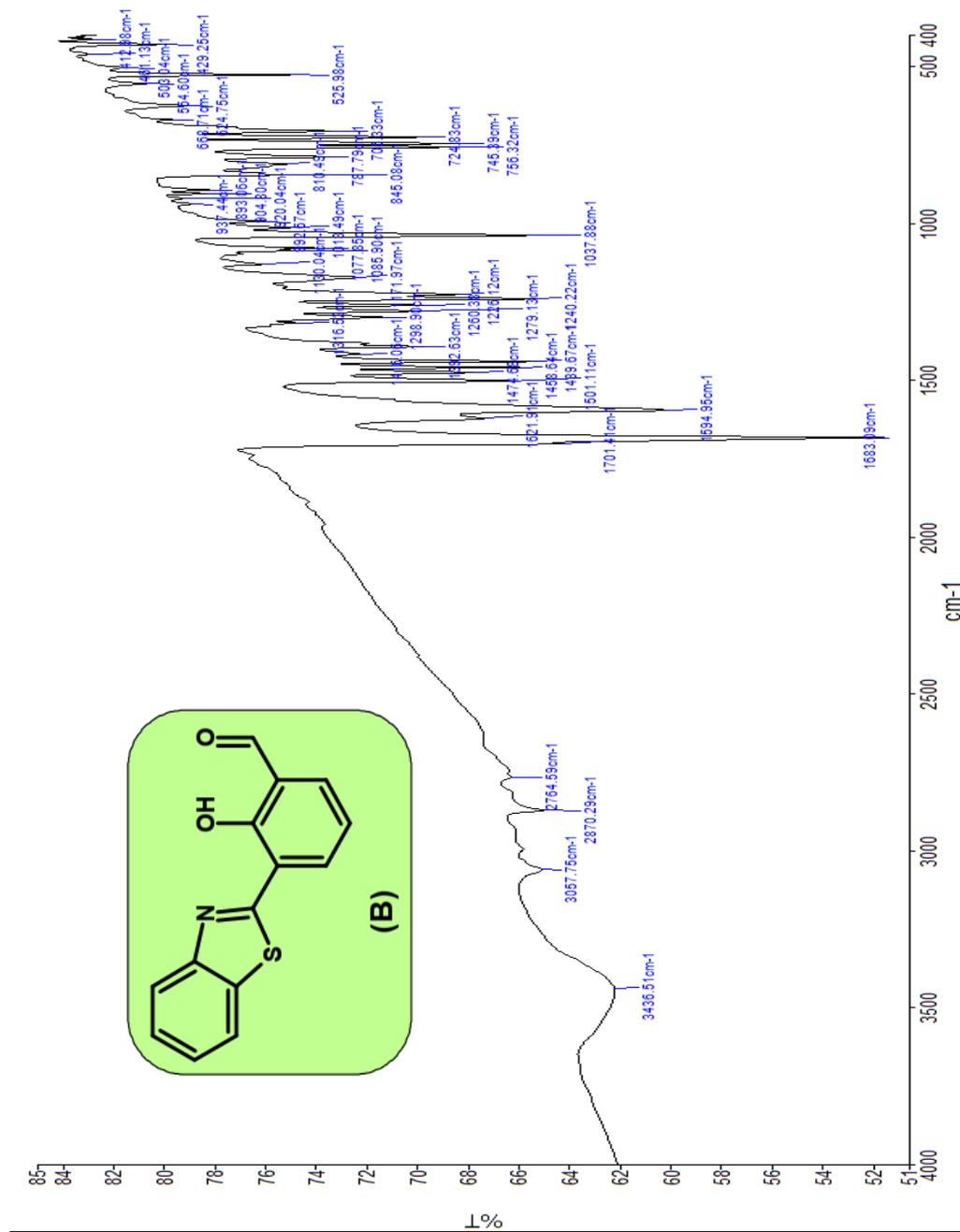


Figura 24: Espectro FT-IR (KBr) del precursor 3-(1,3-benzotiazol-2-il)-2-hidroxibenzaldehído **(B)**.

8.2.2.2. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN)

Los problemas con la purificación del precursor sintético **B** dificultaron el análisis por resonancia magnética nuclear (RMN). Sin embargo, con los datos obtenidos y teniendo como referencia fundamental al precursor **A**, ha sido posible el procesamiento y la asignación estructural de la molécula en cuestión (**B**) teniendo como referencia algunos trabajos previos (30,47). La **Tabla 9** presenta un resumen con las correspondientes asignaciones estructurales del 3-(1,3-benzotiazol-2-il)-2-hidroxibenzaldehído (**B**) a partir de los datos RMN tomados en CDCl₃. Asimismo, las **Figuras 25** y **26** presentan los espectros que sostienen el análisis mencionado.

Tabla 9: Compendio de los datos obtenidos de los análisis espectrales RMN del 3-(1,3-benzotiazol-2-il)-2-hidroxibenzaldehído (**B**) tomados en CDCl₃ y a 25°C.

3-(1,3-benzotiazol-2-il)-2-hidroxibenzaldehído (B)					
C _{num}	δ _c (ppm)	δ _H (ppm)	Multiplicidad	³ J _{H-H} (Hz)	¹ H— ¹ H COSY
1	117.26	-	-	-	-
2	118.85	-	-	-	-
3	119.62	7.07	Triplete(t)	7.70x(2)	H ₃ ↔H _{8,9}
4	121.74	8.02	Multiplete(m)	-	H ₄ ↔H ₆
5	122.57	8.06	Multiplete(m)	-	H ₅ ↔H ₇
6	126.07	7.45	Multiplete(m)	-	H ₆ ↔H ₄
7	127.05	7.54	Multiplete(m)	-	H ₇ ↔H _{5,6}
8	132.24	7.90	Multiplete(m)	-	H ₈ ↔H ₃
9	132.72	7.92	Multiplete(m)	-	H ₉ ↔H ₃
10	134.72	-	-	-	-
11	151.61	-	-	-	-
12	160.65	13.26(OH)	Singulete ancho(br.s)	-	-
13	168.39	-	-	-	-
14	190.01	10.54(CHO)	Singulete ancho(br.s)	-	-

El análisis del espectro ¹H-RMN (**Figura 25**) demuestra, en primer lugar, la presencia de impurezas (representadas por la señal H₂) las cuales ocasionan considerables interferencias. Dichas impurezas corresponderían naturalmente al otro aldehído (isómero *para*) producto de la limitada regioselectividad de la reacción de Duff. En segundo lugar, del mismo análisis es posible destacar dos señales anchas, sin acoplamiento, y a campo bajo que evidencia pronunciada desprotección de los correspondientes protones (¹H) de los grupos OH (δ, 13.26 ppm) y CHO (δ, 10.54 ppm). En base a estos desplazamientos químicos, se

justificaría además una interacción importante entre ambos restos orgánicos (OH y CHO) mediante un posible puente de hidrógeno intramolecular. El espectro ^1H -RMN establece también una serie de protones naturalmente aromáticos (rango de 6.5-8.5 ppm) en los cuales la multiplicidad no está bien definida por la interferencia del otro aldehído (isómero *para*) con señales a desplazamientos químicos muy similares. La señal H_3 (*triplete*, $^3J_{\text{H-H}}=7.7$ Hz), que es el único protón aromático sin interferencia, ha permitido fundamentalmente evidenciar la existencia del aldehído **B** (isómero *orto*). Asimismo, ha servido como referencia para establecer las integraciones del resto de señales principales.

Por intermedio de las integraciones de los protones H_3 (isómero *orto*) y H_2 (isómero *para*) que se aprecian en la **Figura 25**, se puede establecer también que el aldehído principal **B** (isómero *orto*), dentro de la mezcla obtenida, representa aproximadamente el 75 % del total; es decir, predomina en cantidad sobre el otro isómero. Este valor numérico (grado de pureza) es importante porque permite calcular aproximadamente el rendimiento global de la **formilación de Duff orto-dirigida** (20 %).

Por otro lado, el estudio por resonancia magnética nuclear del carbono-13 (^{13}C -RMN) mediante su respectivo espectro (**Figura 25**) avala lo anteriormente discutido, mostrando en esencia carbonos del tipo aromáticos (rango de 110-140 ppm), de los cuales algunos (C_{13} , C_{12} , C_{11}) presentan un mayor desplazamiento a campos bajos por el simple hecho de estar enlazados directamente a heteroátomos electronegativos (N, O, S). Es oportuno destacar también la señal a 190.01 ppm (C_{14} a campo bajo) que avala la presencia del grupo formilo (CHO) dentro de la estructura del compuesto **B**.

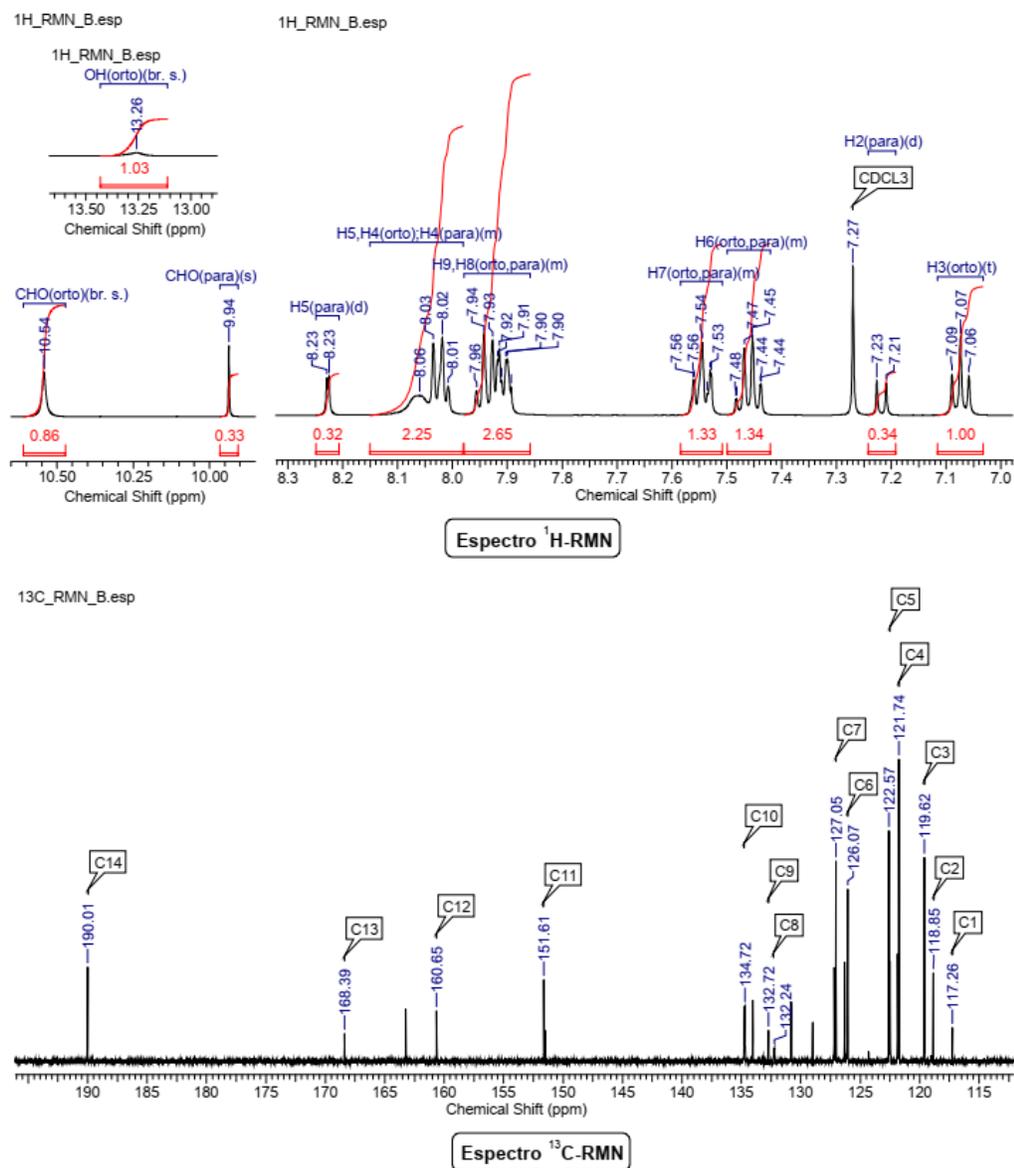
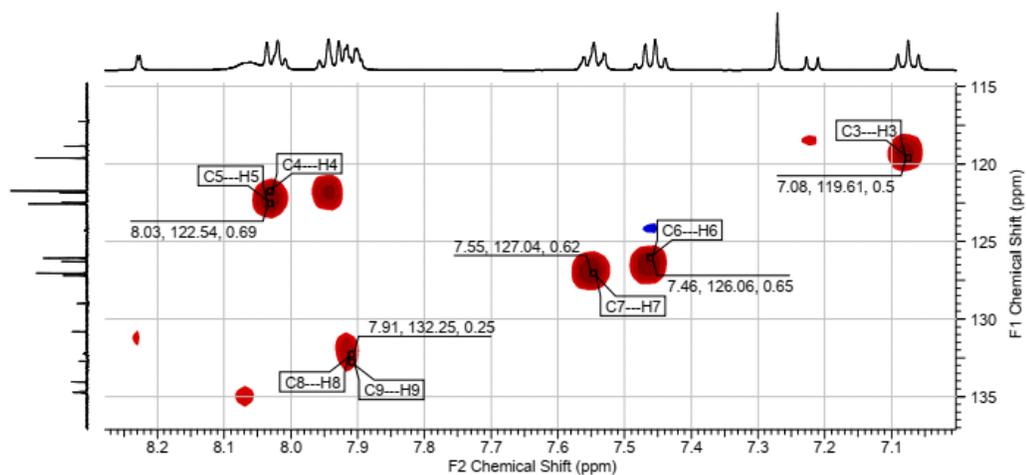


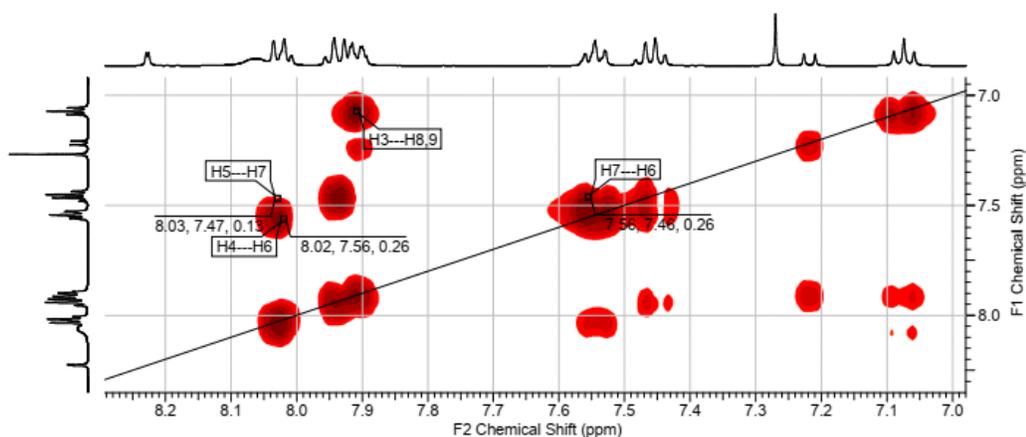
Figura 25: Espectros monodimensionales de resonancia magnética nuclear (¹H-RMN y ¹³C-RMN) del precursor 3-(1,3-benzotiazol-2-il)-2-hidroxibenzaldehído (**B**).

La asignación se complementó con los espectros bidimensionales de resonancia magnética nuclear que se presentan en la **Figura 26** y cuyos datos se resumen en la **Tabla 9**. Estos datos permiten observar las interacciones ¹³C-¹H y ¹H-¹H a través de las técnicas HSQC y COSY respectivamente. Por medio de la técnica HSQC, a pesar de las discutidas interferencias del espectro del protón (¹H-RMN), se ha logrado establecer las diferentes interacciones que justifican las asignaciones contempladas en la **Tabla 9** y en la estructura presentada por la **Figura 26**. Asimismo, en base a la técnica COSY, es importante destacar una señal muy notoria que evidencia las correlaciones del protón H₃ (posición *para* respecto al

OH) con los protones H₈ y H₉; de esta manera, se puede establecer que el precursor **B** (isómero *orto*) destaca sobre el otro aldehído (isómero *para*) dentro de la mezcla analizada.



Espectro ¹H-¹³C HSQC-RMN



Espectro ¹H-¹H COSY-RMN

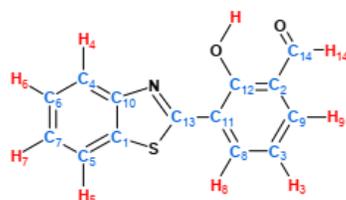


Figura 26: Espectros bidimensionales de resonancia magnética nuclear (¹H-¹³C HSQC-RMN y ¹H-¹H COSY-RMN) del precursor 3-(1,3-benzotiazol-2-il)-2-hidroxibenzaldehído (**B**).

8.2.2.3. Espectrometría de masas

La presente espectrometría ha permitido confirmar, en términos generales, la presencia del precursor sintético **B**. En base a la técnica empleada (ESI-MS), en donde solo se reflejan los resultados de una leve ionización, destacan las señales espectrales correspondientes a los *iones aductos positivos* ($[M+H]^+$, $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$) que revelan la masa molecular del precursor 3-(1,3-benzotiazol-2-il)-2-hidroxibenzaldehído (**B**). El resto de señales solo evidencian los iones del blanco (BK) respectivo. Dichas señales se resumen en la **Tabla 10**, y los mismos son avalados por el correspondiente espectro registrado en la **Figura 27**, que además son cotejados con la literatura pertinente (22,29,49). Es importante mencionar que esta técnica no permite distinguir un isómero del otro pero esto no representó mayor obstáculo para la confirmación estructural mediante la masa molecular (M).

Tabla 10: Datos de la espectrometría de masas (ESI-MS) del precursor 3-(1,3-benzotiazol-2-il)-2-hidroxibenzaldehído (**B**).

3-(1,3-benzotiazol-2-il)-2-hidroxibenzaldehído (B)			
Masa molecular exacta (M): 255.04 g/mol			
Iones Aductos	Relación m/z calculada	Relación m/z encontrada	Intensidad ($\times 10^6$)
$[M+H]^+$	256.04	256.1	0.50
$[M+Na]^+$	278.04	278.1	1.50
$[M+K]^+$	294.04	294.0	0.30

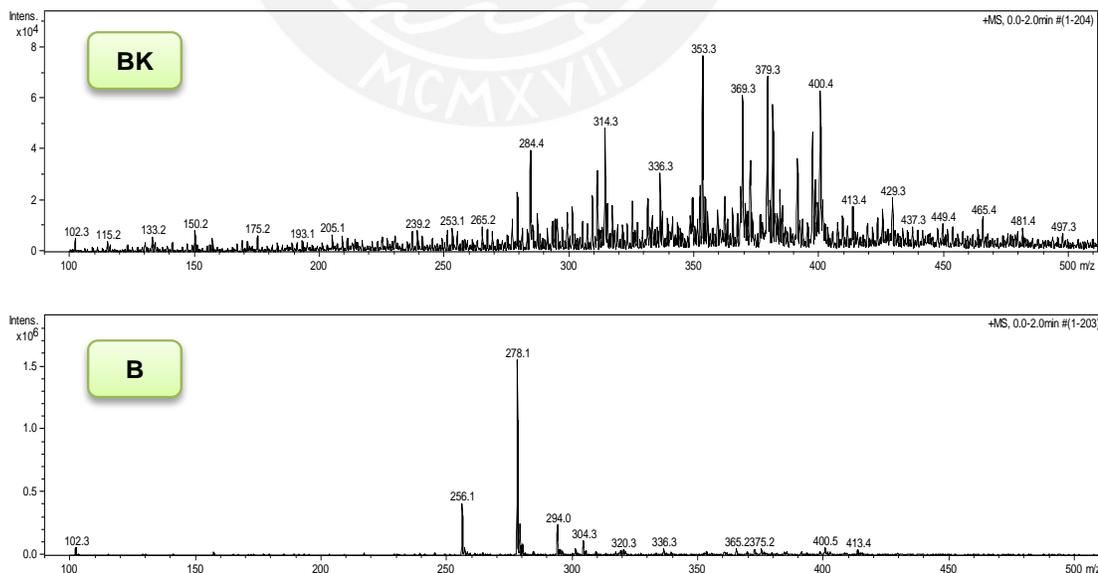


Figura 27: Espectro ESI-MS del precursor 3-(1,3-benzotiazol-2-il)-2-hidroxibenzaldehído (**B**).

8.2.3. Ligando tipo base de Schiff 2,2'-{propano-1,3-diilbis[nitrilo(*E*)metililideno]}bis[6-(1,3-benzotiazol-2-il)fenol] (C)

8.2.3.1. Espectroscopía infrarroja (FT-IR)

La **Figura 28** muestra el espectro completo FT-IR (KBr) del ligando tipo base de Schiff 2,2'-{propano-1,3-diilbis[nitrilo(*E*)metililideno]}bis[6-(1,3-benzotiazol-2-il)fenol] (**C**), mientras que en la **Tabla 11** se presentan las asignaciones de las principales bandas de absorción IR en números de onda (cm^{-1}) correspondientes a los grupos funcionales de una nueva molécula orgánica. La asignación de estas señales está basada en los argumentos teóricos de dicha espectroscopía (47,48) y en los reportes experimentales de moléculas similares (bases de Schiff) (17,19–22,33–36).

En la región de grupos funcionales (aprox. $4000\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$) del espectro mencionado, se observa la vibración correspondiente al estiramiento del O—H fenólico que se ha mantenido a 3437 cm^{-1} con respecto al precursor (**B**). Su perfil es casi igual, así como también, su desplazamiento a menores frecuencias producto del efecto que posiblemente ejerce el puente de hidrógeno intramolecular en la disposición estructural del nuevo ligando tipo *imina* (**C**). Opcionalmente, esta señal podría ser atribuida al metanol usado tanto en la síntesis como en la purificación por recristalización. Dentro de esta región destaca principalmente la señal poco intensa correspondiente al estiramiento C—H de la cadena alifática $\text{—(CH}_2\text{)}_3\text{—}$ a 2931 cm^{-1} , procedente de la propano-1,3-diamina, y del mismo modo, la vibración $\nu_{\text{(C—H)}}$ perteneciente a la base de Schiff (H—C=N) a 2852 cm^{-1} . Estas últimas bandas son importantes porque confirmarían la presencia del grupo funcional *imina* tras realizar la debida comparación de espectros con el precursor **B**. El cambio estructural a *imina* se confirma notablemente con la evidencia de la señal a 1635 cm^{-1} que representaría el estiramiento C=N del ligando en cuestión (**C**), muy diferente a la banda del estiramiento C=O del aldehído **B** (originalmente a 1683 cm^{-1}), por tal, esto confirmaría el cambio a nivel estructural que conlleva a proponer la posible formación del ligando tipo base de Schiff (**C**). Esta banda en particular, al ser muy intensa y ligeramente ancha, apantalla lógicamente a la señal proveniente del estiramiento $\nu_{\text{(C=N)}}$ del grupo tiazol (que debería vibrar a 1622 cm^{-1}); por tal motivo, esta última no se distingue dentro del espectro presentado en la **Figura 28**.

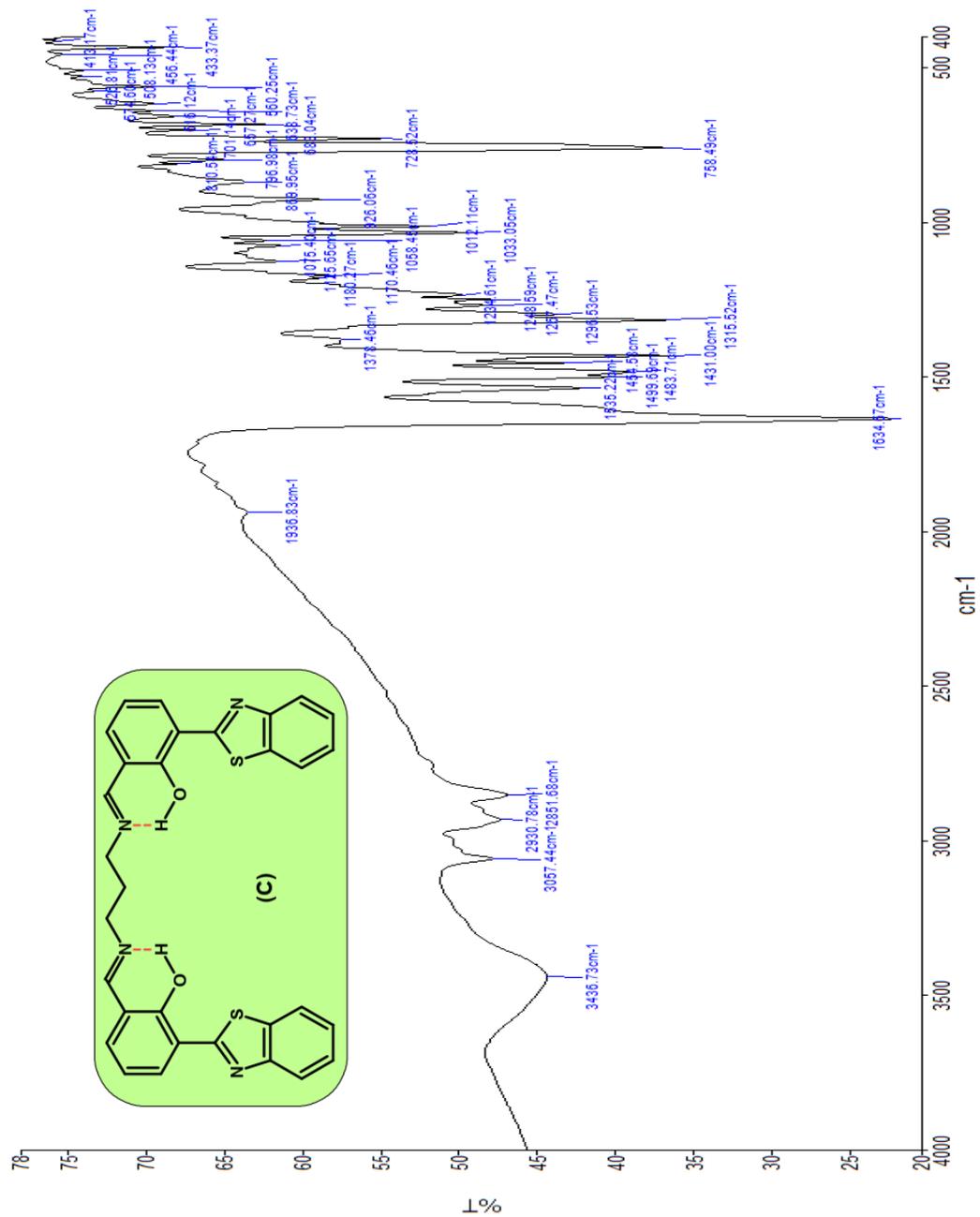
Por otro lado, en la zona de huellas dactilares ($1600\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$) se observan las vibraciones del estiramiento C=C aromático comprendidas entre 1535 , 1484 y 1431 cm^{-1} ; además, destaca la flexión C—H en el plano de la imina (**C**) a 1379 cm^{-1} con una intensidad leve pero característica. Igual sucede con las señales a 1316 y 1297 cm^{-1} correspondientes a la flexión C—H en el plano del anillo fenólico.

Asimismo, se puede distinguir aún el estiramiento C—O del fenol a 1235 cm^{-1} , y las bandas a 1170, 1125, 1033, 1012 y 926 cm^{-1} pertenecientes a la flexión C—H en el plano del anillo de benzotiazol.

Finalmente, dentro de la región aromática (900-675 cm^{-1}), destacan las bandas características a las flexiones C—H fuera del plano, a 870 y 810 cm^{-1} para el caso del fenol, y a 759 y 729 cm^{-1} para el respectivo anillo de benzotiazol.

Tabla 11: Asignaciones de las principales bandas de absorción FT-IR (KBr) del ligando base de Schiff 2,2'-{propano-1,3-diilbis[nitrilo(*E*)metililideno]}bis[6-(1,3-benzotiazol-2-il)fenol] (**C**).

2,2'-{propano-1,3-diilbis[nitrilo(<i>E</i>)metililideno]}bis[6-(1,3-benzotiazol-2-il)fenol] (C)	
Tipos de vibraciones IR (grupo estructural)	Bandas de absorción FT-IR (cm^{-1})
$\nu(\text{O—H})$ Fenol	3437
$\nu(\text{C—H})$ Aromático	3057
$\nu(\text{C—H})$ Cadena Alifática —(CH₂)₃—	2931
$\nu(\text{C—H})$ Base de Schiff (H—C=N)	2852
$\nu(\text{C=N})$ Base de Schiff (H—C=N)	1635
$\nu(\text{C=C})$ Aromático	1535, 1484, 1431
$\delta(\text{C—H})$ Base de Schiff (H—C=N)	1379
$\delta(\text{C—H})$ Aromático/Fenol	1316, 1297
$\nu(\text{C—O})$ Fenol	1235
$\delta(\text{C—H})$ Aromático/Benzotiazol	1170, 1125, 1033, 1012, 926
$\pi(\text{C—H})$ Aromático/Fenol	870, 810
$\pi(\text{C—H})$ Aromático/Benzotiazol	759, 729
Considérese las siguientes abreviaturas; <i>v</i> : estiramiento <i>δ</i> : flexión en el plano <i>π</i> : flexión fuera del plano	



8.2.3.2. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN)

Nuevamente, la impureza presente en **C** dificultó el análisis; sin embargo, en base a los precursores sintéticos (**A**, **B**), ha sido posible el procesamiento y la asignación estructural de el nuevo ligando tetradentado y simétrico (de 24 protones en total) (**C**) teniendo como referencia compuestos similares (bases de Schiff) (21,22,40,47). La **Tabla 12** presenta los datos RMN tomados en CDCl₃. Asimismo, las **Figuras 29** y **30** presentan los espectros RMN correspondientes.

Tabla 12: Compendio de los datos obtenidos de los análisis espectrales RMN del ligando base de Schiff 2,2'-{propano-1,3-diilbis[nitrilo(*E*)metililideno]}bis[6-(1,3-benzotiazol-2-il)fenol] (**C**) tomados en CDCl₃ y a 25°C.

2,2'-{propano-1,3-diilbis[nitrilo(<i>E</i>)metililideno]}bis[6-(1,3-benzotiazol-2-il)fenol] (C)					
C _{num}	δ _C (ppm)	δ _H (ppm)	Multiplicidad	³ J _{H-H} (Hz)	¹ H- ¹ H COSY
1,1'	116.78	-	-	-	-
2,2'	117.00	-	-	-	-
3,3'	118.07	7.00	Triplete(<i>t</i>)	7.60x(2)	H ₃ ↔H _{8,9} H _{3'} ↔H _{8',9'}
4,4'	121.54	7.96	Doblete(<i>d</i>)	7.90	H ₄ ↔H ₆ H _{4'} ↔H _{6'}
5,5'	122.77	8.08	Multiplete(<i>m</i>)	-	H ₅ ↔H ₇ H _{5'} ↔H _{7'}
6,6'	124.64	7.38	Multiplete(<i>m</i>)	-	H ₆ ↔H ₄ H _{6'} ↔H _{4'}
7,7'	126.09	7.51	Multiplete(<i>m</i>)	-	H ₇ ↔H ₅ H _{7'} ↔H _{5'}
8,8'	132.39	8.62	Multiplete(<i>m</i>)	-	H ₈ ↔H ₃ H _{8'} ↔H _{3'}
9,9'	133.21	7.40- 7.45	Multiplete(<i>m</i>)	-	H ₉ ↔H ₃ H _{9'} ↔H _{3'}
10,10'	134.11	-	-	-	-
11,11'	152.21	-	-	-	-
12,12'	160.50	7.30- 7.60 (OH)	Singulete ancho(<i>br.s</i>)	-	-
13,13'	169.02	-	-	-	-
14,14'	169.02	8.47 (H- C=N)	Singulete(<i>s</i>)	-	-
15,15'	58.51, 55.29	3.86	Multiplete(<i>m</i>)	-	H _{15,15'} ↔H ₁₆
16	31.28	2.30	Quintuplete(<i>q</i>)	6.60x(4)	H ₁₆ ↔H _{15,15'}

El análisis del espectro ^1H -RMN (**Figura 29**) demuestra, en primer lugar, la presencia de impurezas (representadas por la señal $\text{H}_{2,2'}$) las cuales ocasionan interferencias, tal como en el caso de **B**. En base al análisis de sus integraciones y multiplicidades, dichas impurezas podrían ser atribuidas al ligando residual producido a partir del otro aldehído (isómero *para*) durante la reacción de condensación ya discutida.

Del análisis por resonancia magnética nuclear ^1H -RMN (**Figura 29**) destaca la desaparición de la señal correspondiente al grupo CHO del precursor **B** (δ , 10.54 ppm) y a su vez la aparición de una nueva señal a 8.47 ppm que sugiere la formación del grupo imino ($\text{H}-\text{C}=\text{N}$) del ligando tipo base de Schiff (**C**). Asimismo, el nuevo contexto químico, que fomenta los nuevos puentes de hidrógeno intramolecular entre los fenoles y los restos de azometina, justificaría los desplazamientos de las señales anchas de los protones OH a campos más altos (rango de 6.5-8.5 ppm) donde interfieren con los protones aromáticos asignados a los precursores **A** y **B**. Con respecto a las señales de los protones aromáticos que experimentan interferencias por las impurezas ya discutidas, se tomará nuevamente a los protones $\text{H}_{3,3'}$ (δ , 7.00 ppm) como referencia para las integraciones de las señales principales. Por último, es oportuno destacar las señales propias de la cadena alifática saturada $-(\text{CH}_2)_3-$ que aparecen a campo alto (δ , 2.0-4.0 ppm) que corresponderían a la cadena alifática saturada $-(\text{CH}_2)_3-$ del ligando en cuestión (**C**).

Por medio de las integraciones de los protones $\text{H}_{3,3'}$ (ligando **C**) y $\text{H}_{2,2'}$ (ligando residual) que se aprecian en el respectivo espectro de la **Figura 29**, se puede establecer que el ligando de interés **C** proveniente del precursor **B**, representa aproximadamente el 80 % del producto de reacción. Este valor numérico (grado de pureza) permite calcular el rendimiento global (58 %) de la **doble reacción de condensación simultánea** desarrollada en esta tesis.

Paralelamente, el estudio por resonancia magnética nuclear del carbono-13 (^{13}C -RMN) demuestra la presencia de carbonos del tipo aromáticos (rango de 110-140 ppm), de los cuales algunos ($\text{C}_{13,13'}$, $\text{C}_{12,12'}$, $\text{C}_{11,11'}$) presentan desplazamientos a campos bajos por el simple hecho de estar enlazados directamente a heteroátomos electronegativos (N, O, S). Asimismo, es oportuno destacar la ausencia de la señal a 190.01 ppm que avala la transformación del grupo formilo (CHO) en la respectiva imina ($\text{H}-\text{C}=\text{N}$) que aparece a 169.02 ppm. También, es menester resaltar las señales de campo alto (δ , 30-60 ppm) que demuestran la presencia de carbonos secundarios dentro de la cadena alifática saturada $-(\text{CH}_2)_3-$ ya discutida. Es importante aclarar que la asignación por medio de numeraciones arbitrarias se basa exclusivamente en el orden de aparición de las señales ^{13}C del mencionado espectro, y no en determinadas reglas de formulación y nomenclatura.

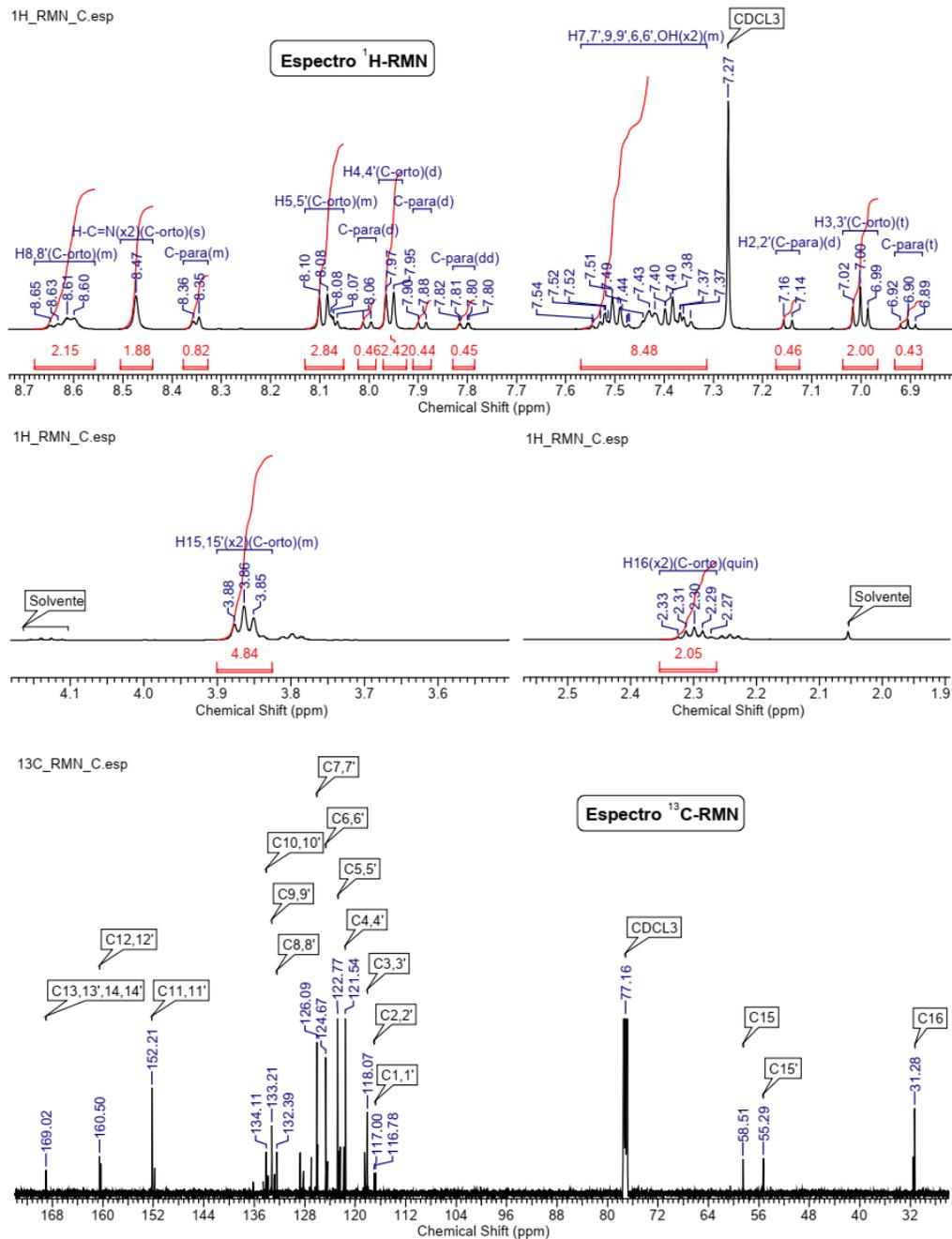


Figura 29: Espectros monodimensionales de resonancia magnética nuclear (¹H-RMN y ¹³C-RMN) del ligando base de Schiff 2,2'-[propano-1,3-diilbis[nitrilo(*E*)metililideno}]bis[6-(1,3-benzotiazol-2-il)fenol] (**C**).

Complementariamente, la asignación para el nuevo ligando (**C**), a pesar de las impurezas persistentes, se ha logrado por medio de las técnicas HSQC y COSY, destacando las principales interacciones ¹³C-¹H y ¹H-¹H respectivamente, que se presentan en la **Figura 30** y cuyos datos se resumen en la **Tabla 12**. En conclusión, el resultado final de la presente

caracterización se sintetiza en la asignación estructural del nuevo ligando **C** propuesto por la **Figura 31**.

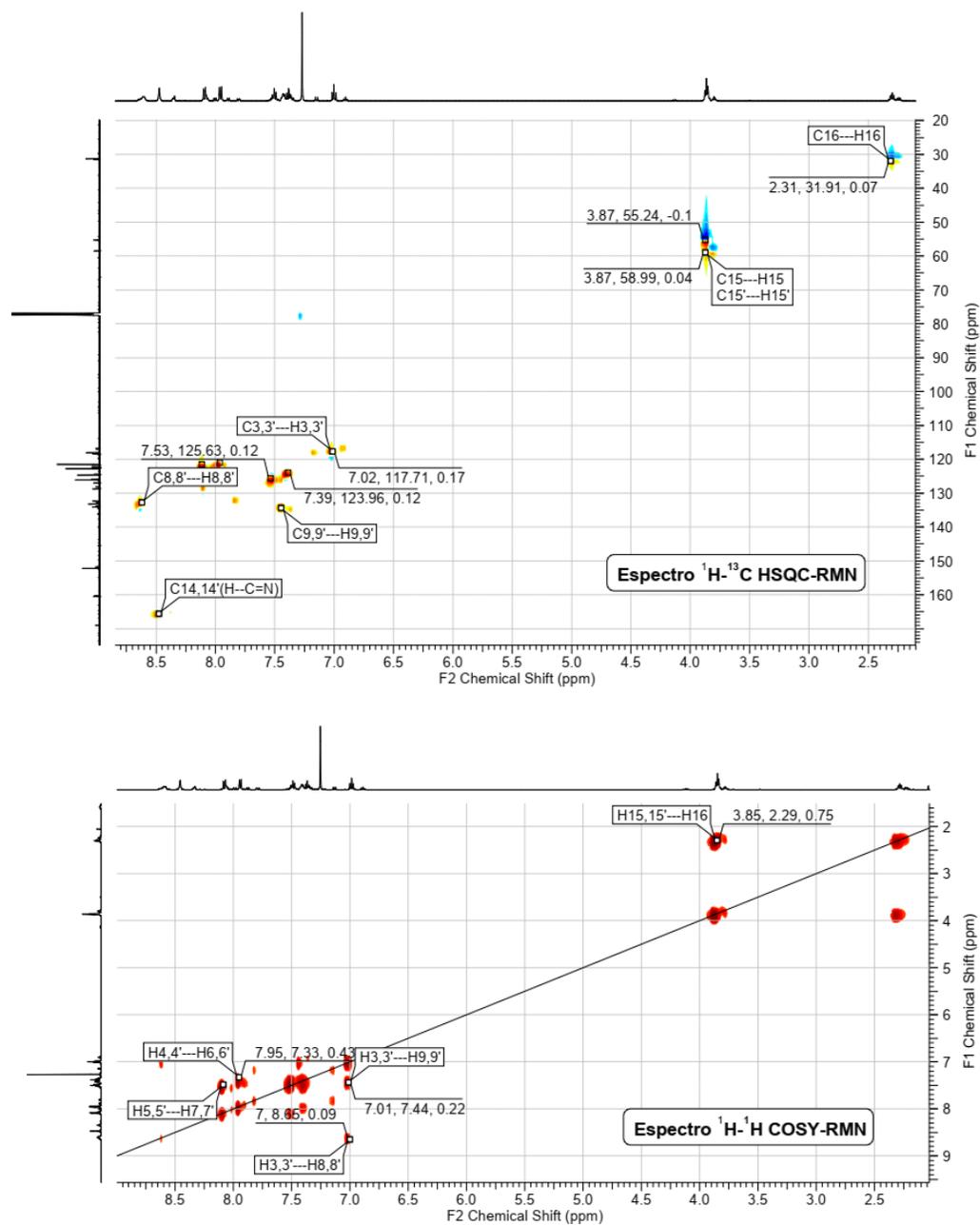


Figura 30: Espectros bidimensionales de resonancia magnética nuclear (^1H - ^{13}C HSQC-RMN y ^1H - ^1H COSY-RMN) del ligando base de Schiff 2,2'-(propano-1,3-diilbis[nitrilo(*E*)metililideno]]bis[6-(1,3-benzotiazol-2-il)fenol] (**C**).

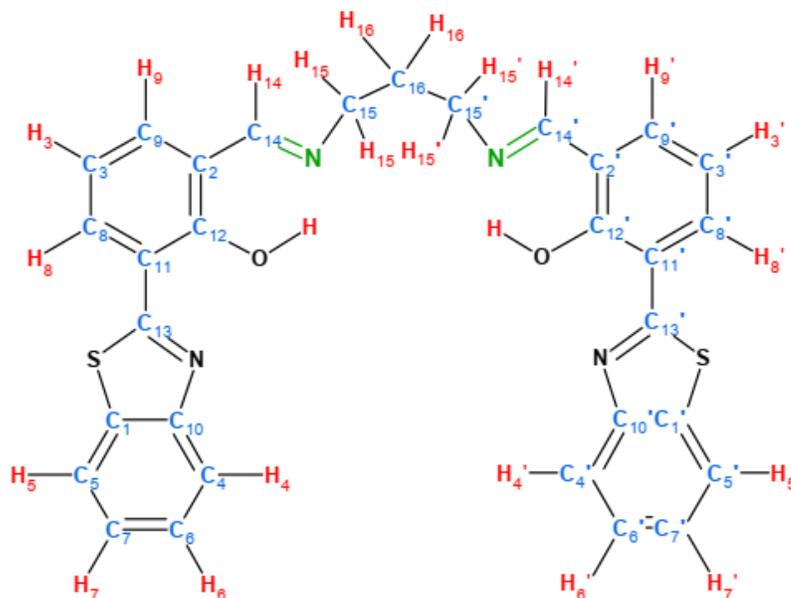


Figura 31: Asignación propuesta para el ligando base de Schiff 2,2'-{propano-1,3-diilbis[nitrilo(*E*)metililideno]}bis[6-(1,3-benzotiazol-2-il)fenol] (**C**).

8.2.3.3. Espectrometría de masas

En el análisis por ESI-MS destaca principalmente las señales espectrales correspondientes a los *iones aductos positivos* ($[M+H]^+$, $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$) cuyas relaciones m/z (549.2, 571.2, 588.9, respectivamente) son presentados en la **Tabla 13**. Asimismo, los espectros del blanco (BK) y del ligando (**C**) que avalan el análisis son mostrados comparativamente en la **Figura 32**. En base a los resultados analíticos, la presente técnica instrumental ha permitido confirmar la obtención de un nuevo ligando del tipo base de Schiff simétrico y tetradentado con dos unidades de benzotiazol (**C**).

Pese a que la técnica empleada (ESI-MS) se basa en una *leve ionización*, no se descarta la posibilidad de pequeñas *fragmentaciones* durante el inicio de la prueba. Por esta razón, se puede observar en el espectro obtenido (**Figura 32**) una señal intensa ($m/z = 533.0$) que podría corresponder a un *ion aducto positivo* del tipo $[(M-O)+H]^+$, demostrando la fragmentación inicial del ligando (**C**) sin un oxígeno de uno de los grupos hidroxilos (OH). Este hecho podría ser impulsado por un puente de hidrogeno intramolecular formado entre el grupo hidroxilo (OH) y el grupo imina (H-C=N). Aunque la presente técnica no puede distinguir a los isómeros formados del propio ligando **C** (*orto* y *para*), puede evidenciar algunas impurezas que corresponderían al precursor **B** (*orto* y/o *para*) por medio de una señal débil del espectro (**Figura 32**) a 278.1

(m/z) asociado a su *ion aducto* $[M_B+Na]^+$. Cabe señalar que no existen interferencias por parte del blanco (BK).

Tabla 13: Datos de la espectrometría de masas (ESI-MS) del ligando base de Schiff 2,2'-{propano-1,3-diilbis[nitrilo(*E*)metililideno]}bis[6-(1,3-benzotiazol-2-il)fenol] (**C**).

2,2'-{propano-1,3-diilbis[nitrilo(<i>E</i>)metililideno]}bis[6-(1,3-benzotiazol-2-il)fenol] (C)			
Masa molecular exacta (M): 548.49 g/mol			
Iones Aductos	Relación m/z calculada	Relación m/z encontrada	Intensidad ($\times 10^7$)
$[M+H]^+$	549.49	549.2	< 0.25
$[M+Na]^+$	571.49	571.2	< 0.25
$[M+K]^+$	587.49	588.9	< 0.25
$[(M-O)+H]^+$	533.49	533.0	1.25

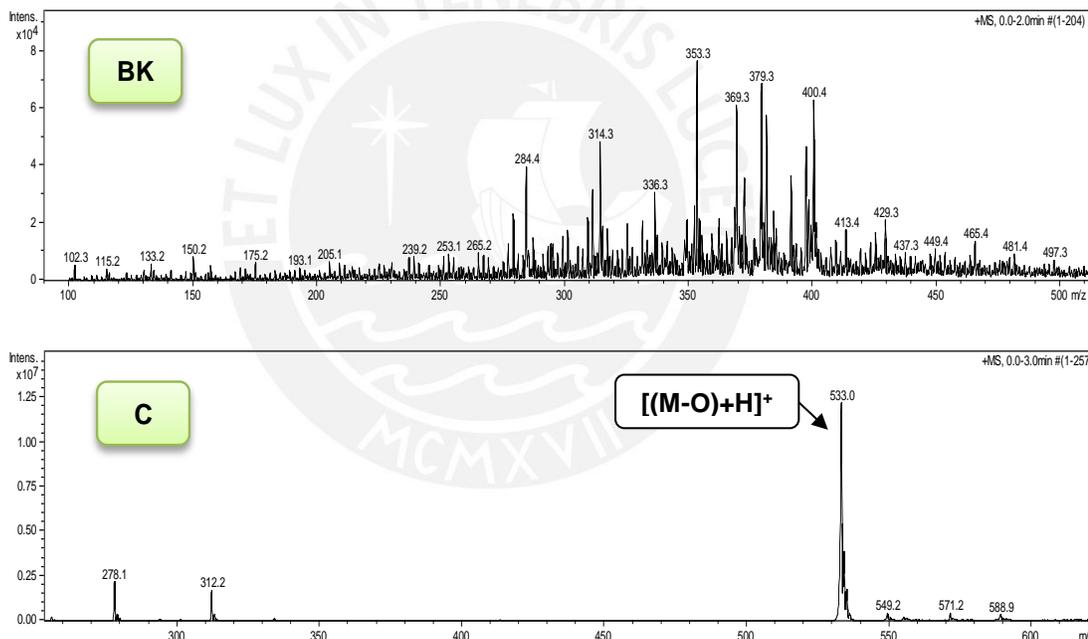


Figura 32: Espectro ESI-MS del ligando base de Schiff 2,2'-{propano-1,3-diilbis[nitrilo(*E*)metililideno]}bis[6-(1,3-benzotiazol-2-il)fenol] (**C**).

8.2.3.4. Espectroscopía Ultravioleta-Visible

La caracterización de la naturaleza electrónica-molecular del nuevo ligando tipo base de Schiff (**C**) se llevó a cabo por medio de la espectrofotometría de absorción UV-VIS en acetonitrilo (MeCN).

Particularmente, se usó acetonitrilo como solvente porque presenta una alta transmitancia (aprox. 100 % a partir de 190 nm) (49); por tal motivo, se espera que el medio no altere cualitativamente el espectro UV-VIS del analito (**C**). Como referencia se preparó una solución patrón de 250 ppm la cual fue diluida convenientemente durante la prueba para no saturar al detector. De esta manera, por medio de un barrido continuo en un rango de 190 a 1100 nm, se registró el espectro de absorción UV-VIS del compuesto **C** que es mostrado en la **Figura 33**. Asimismo, la **Tabla 14** presenta las longitudes de onda de los máximos de absorción (λ_{\max} , nm) con sus respectivos grupos cromóforos (transiciones electrónicas) pertenecientes a la nueva molécula sintetizada (**C**).

Tabla 14: Asignaciones de las principales bandas de absorción UV-VIS (nm) con sus respectivas transiciones electrónicas del ligando 2,2'-{propano-1,3-diilbis[nitrilo(*E*)metililideno]}bis[6-(1,3-benzotiazol-2-il)fenol] (**C**) en acetonitrilo.

2,2'-{propano-1,3-diilbis[nitrilo(<i>E</i>)metililideno]}bis[6-(1,3-benzotiazol-2-il)fenol] (C)	
Tipos de transiciones electrónicas (grupos cromóforos)	Longitudes de onda de los máximos de absorción UV-VIS (λ_{\max}, nm)
$\pi \rightarrow \pi^*$ (Anillos aromáticos del grupo fenilbenzotiazol)	201, 228, 262
$n \rightarrow \pi^*$ (grupo imina C=N del ligando)	449

Conociendo de ante mano la escasa interferencia del acetonitrilo como solvente en el rango de medición, el análisis del espectro UV-VIS que representa al nuevo ligando tipo base de Schiff (**C**) destaca cuatro bandas de absorción (**Figura 33**). Estas señales se disponen, según su naturaleza electrónica, en las dos zonas del espectro UV-VIS. En primer lugar, dentro del rango ultravioleta (UV) sobresalen las transiciones electrónicas $\pi \rightarrow \pi^*$ pertenecientes a los sistemas aromáticos con sus respectivas bandas de absorción a 201, 228 y 262 nm, que en este trabajo sugieren corresponder a los *grupos fenilbenzotiazol* (2,50,51). Esta asignación considera la presencia de grupos *auxocromos* (grupos O—H y C=N/tiazol) cuyos electrones no enlazantes influyen sobre la *conjugación π* (49). En segundo lugar, dentro de la región visible, la cuarta banda de absorción a 449 nm sugiere una transición del tipo $n \rightarrow \pi^*$ que puede corresponder al *grupo imina* (C=N) del ligando tipo base de Schiff (**C**). Esta asignación se basa en el estudio de moléculas similares (21,40). Asimismo, esta señal sería responsable del color anaranjado claro (luz transmitida) que presenta característicamente el nuevo compuesto sintetizado (**C**).

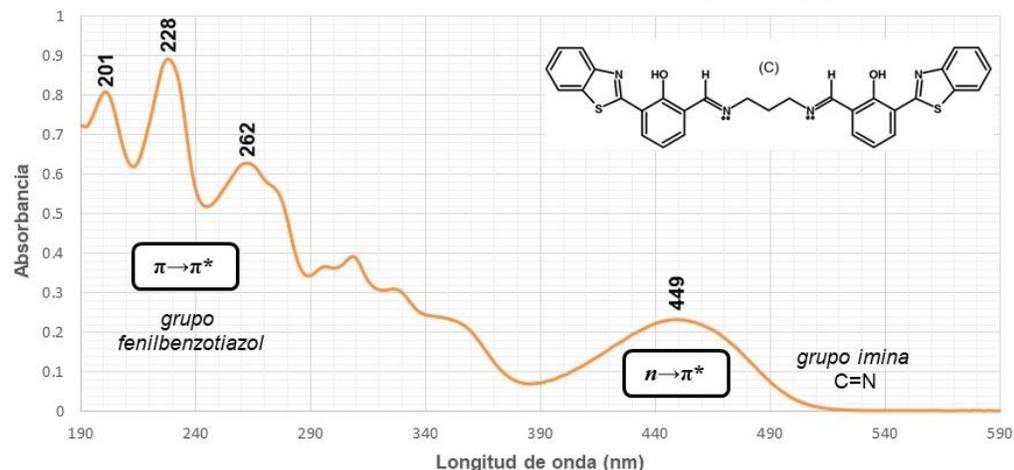


Figura 33: Espectro UV-VIS del ligando base de Schiff 2,2'-{propano-1,3-diilbis[nitrilo(*E*)metililideno]}bis[6-(1,3-benzotiazol-2-il)fenol] (**C**).

8.2.3.5. Espectroscopía de fluorescencia

Para la interpretación y caracterización de la naturaleza de emisión radiativa del presente sistema electrónico-molecular (ligando **C**) se registró el respectivo espectro de fluorescencia (**Figura 34**) en un rango de 371 a 684 nm. Para la determinación se utilizaron idénticos *slits* de 10 nm, y un haz de excitación de 350 nm sobre una muestra de ligando (**C**) disuelta en acetonitrilo. La **Tabla 15** presenta los datos espectrales de interés que se obtienen. Finalmente, la medición de la intensidad fotoluminiscente a una determinada longitud de onda de máxima emisión ha permitido caracterizar al ligando tipo base de Schiff (**C**).

Tabla 15: Datos de la espectroscopía de fluorescencia del ligando 2,2'-{propano-1,3-diilbis[nitrilo(*E*)metililideno]}bis[6-(1,3-benzotiazol-2-il)fenol] (**C**) en acetonitrilo ($\lambda_{\text{ex}} = 350 \text{ nm}$).

Compuesto	Longitud de onda (λ_{em} , nm)	Intensidad relativa de fluorescencia
Ligando (C)	444	254
	557	546

En el espectro de emisión fotoluminiscente mostrado en la **Figura 34** se aprecia que el nuevo ligando tipo base de Schiff (**C**) emite a 444 y 557 nm cuando el sistema es excitado con un haz cuya longitud de onda es de 350 nm. Dicha excitación se establece a partir del espectro de absorción UV-VIS (**Figura 33**) del correspondiente ligando **C**. Por tal, con una excitación a 350 nm se producirían transiciones de emisión con mayor eficacia cuántica y por ende un efecto fluorescente más intenso y aprovechable.

La fluorescencia en la molécula tipo base de Schiff **(C)** se podría deber, en principio, a las transiciones de emisión $\pi^* \rightarrow \pi$ de los *grupos fenilbenzotiazol* (fluoróforos) los cuales no experimentarían *transferencias electrónicas fotoinducidas* (TEP) por parte de los pares electrónicos del nitrógeno *imino*, pues según la propuesta estructural, éstos estarían formando puentes de hidrógenos intramoleculares tal como se muestra en la **Figura 34**. Este enunciado que destaca la inhibición del mecanismo TEP como una posible causa de la fluorescencia se basa en estudios teóricos previos con moléculas similares (49,52,53).

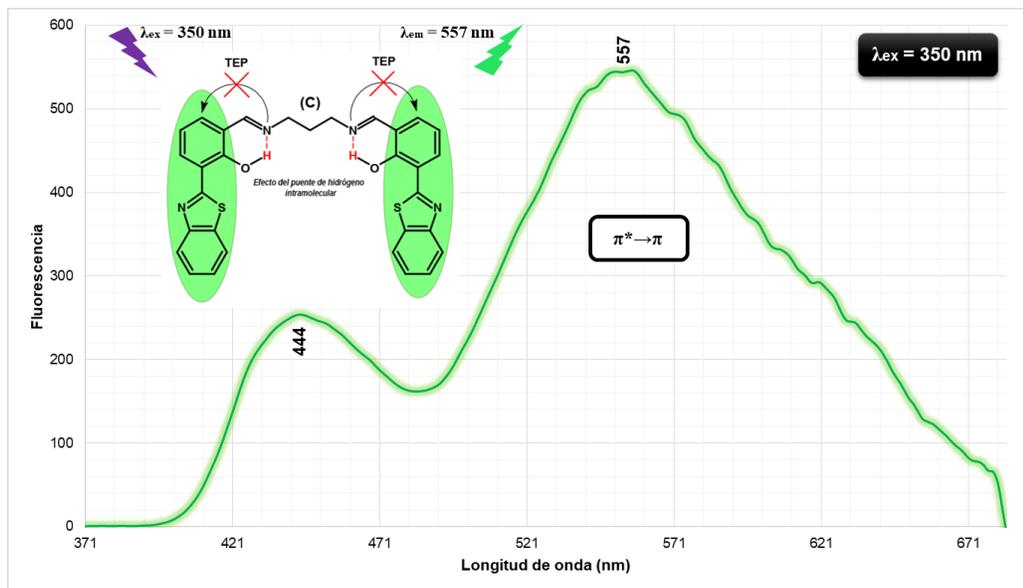


Figura 34: Espectro de fluorescencia del ligando base de Schiff 2,2'-{propano-1,3-diilbis[nitrilo(*E*)metililideno]}bis[6-(1,3-benzotiazol-2-il)fenol] **(C)** en acetonitrilo.

8.2.4. Complejo quelato [2,2'-{propano-1,3-diilbis[nitrilo(*E*)metililideno]}bis[6-(1,3-benzotiazol-2-il)fenolato]- κ^4 -*N,N',O,O'*]cobre(II) (**D**)

8.2.4.1. Espectroscopía infrarroja (FT-IR)

La **Figura 35** muestra el espectro completo FT-IR (KBr) del nuevo complejo quelato (**D**) obtenido por la reacción *template* desarrollada. Asimismo, la **Tabla 16** resume las asignaciones de las principales bandas de absorción IR, en números de onda (cm^{-1}), de los diferentes modos vibracionales correspondientes a los grupos funcionales del mencionado compuesto (**D**). La asignación de estas señales está basada en los argumentos teóricos de dicha espectroscopía (47,48) y en los reportes experimentales de complejos quelatos similares (19–21,33,34,37–41).

En la región característica de los grupos funcionales (aprox. 4000-1600 cm^{-1}) del espectro mencionado, se puede observar la vibración correspondiente a un estiramiento O—H a 3436 cm^{-1} a diferencia de lo observado para el ligando (**C**). Según la estructura propuesta para el nuevo compuesto de coordinación (**D**) no debería apreciarse una señal por vibración del estiramiento O—H. En esta discusión se asume que dicha señal puede ser propia de los solventes usados en la síntesis (etanol y/o metanol), los cuales probablemente estén adheridos por fuerzas intermoleculares a la esfera interna o externa de coordinación. No obstante, la señal en cuestión no es tan significativa para la caracterización del nuevo compuesto de coordinación (**D**) del cual se presume una estructura tipo quelato. A continuación, se observa también una señal poco intensa correspondiente al estiramiento C—H aromático a 3054 cm^{-1} . Fundamentalmente, dentro de esta región, destacan las señales poco intensas correspondientes al estiramiento C—H de la cadena alifática —(CH₂)₃— a 2940 y 2925 cm^{-1} , procedentes de la propano-1,3-diamina, y del mismo modo la vibración $\nu_{\text{C—H}}$ perteneciente al grupo funcional imina (H—C=N) a 2850 cm^{-1} . Estas últimas bandas son importantes porque respaldan la posible presencia de una molécula orgánica del tipo base de Schiff dentro del complejo quelato (**D**). Asimismo, es importante destacar como evidencia principal el estiramiento C=N del complejo (**D**) con una señal a 1612 cm^{-1} la cual ha sufrido un desplazamiento desde 1635 cm^{-1} (ligando **C**). La coordinación del par libre del nitrógeno en el grupo *imina* deslocaliza la densidad electrónica hacia el metal (Cu^{2+}), lo cual tiene un efecto debilitador en el enlace C=N que es evidenciado con este menor número de onda (1612 cm^{-1}) y que se diferencia notablemente con la señal del ligando **C** (1635 cm^{-1}). Desplazamientos significativos como el observado en el complejo (**D**), en comparación con el ligando (**C**), constituye una evidencia determinante que confirma la formación de un compuesto de coordinación. Esta banda en particular (1612 cm^{-1}) al ser muy intensa pero angosta, no apantalla del todo a la señal proveniente del estiramiento

$\nu(\text{C}=\text{N})$ del grupo tiazol, por tal motivo, esta última es apreciable dentro del espectro presentado en la **Figura 35** a 1626 cm^{-1} .

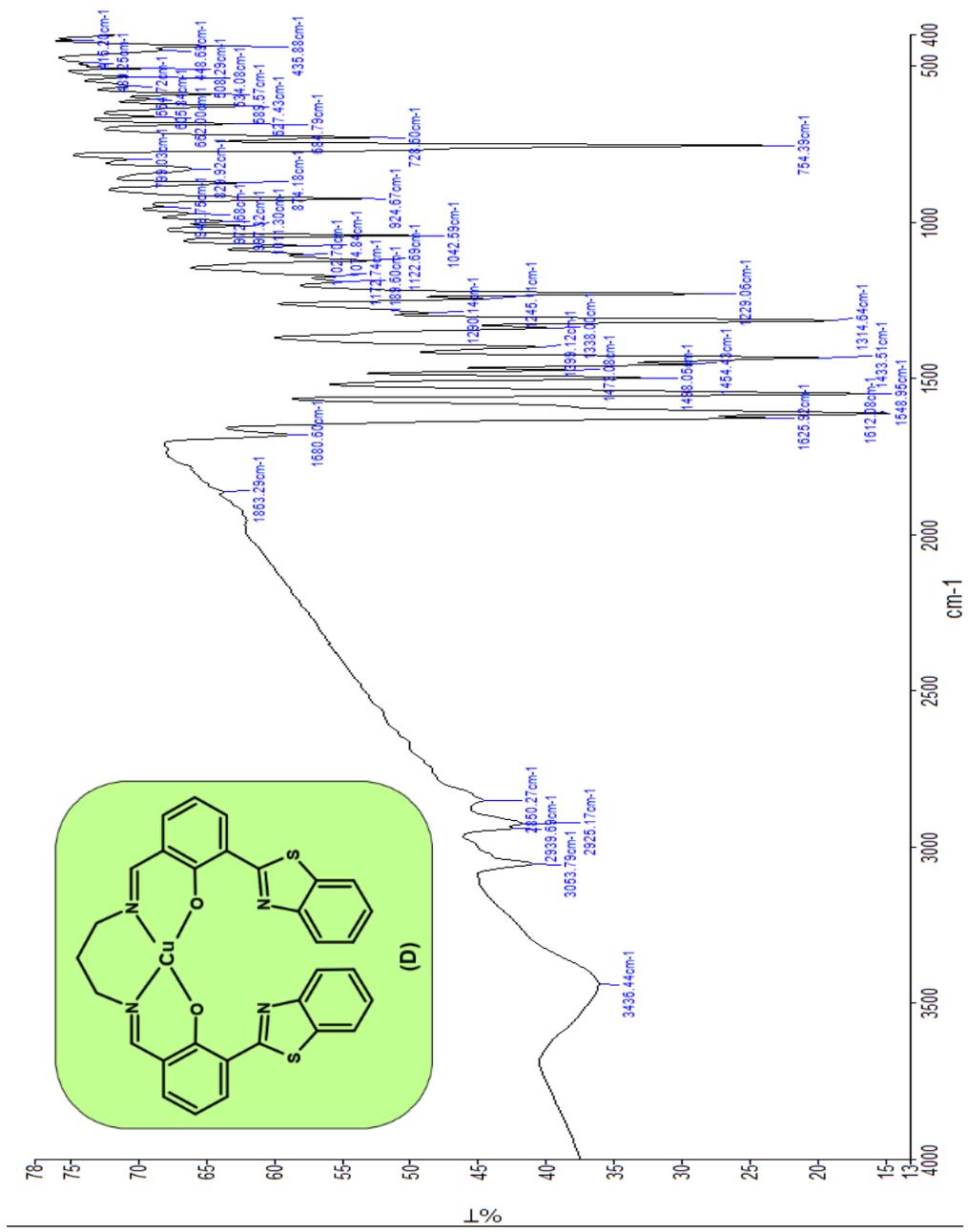
Por otro lado, en la zona de huellas dactilares ($1600\text{-}1000 \text{ cm}^{-1}$) se pronuncian las vibraciones del estiramiento $\text{C}=\text{C}$ aromático comprendidas entre 1549 , 1498 y 1434 cm^{-1} ; además, destaca la flexión $\text{C}-\text{H}$ en el plano de la imina ($\text{H}-\text{C}=\text{N}$) a 1399 cm^{-1} con una intensidad leve pero característica. Del mismo modo sucede con las señales a 1315 y 1290 cm^{-1} correspondientes a la flexión $\text{C}-\text{H}$ en el plano del anillo fenólico. Asimismo, se puede distinguir el estiramiento $\text{C}-\text{O}$ del fenol en el nuevo complejo quelato (**D**) a 1229 cm^{-1} el cual se desplaza desde 1235 cm^{-1} para el caso del ligando **C**, y las bandas a 1173 , 1123 , 1043 , 1011 y 925 cm^{-1} pertenecientes a la flexión $\text{C}-\text{H}$ en el plano del anillo de benzotiazol.

Por otro lado, dentro de la región aromática ($900\text{-}675 \text{ cm}^{-1}$), destacan las bandas características a las flexiones $\text{C}-\text{H}$ fuera del plano, a 874 y 830 cm^{-1} para el caso del fenol, y a 754 y 729 cm^{-1} para el respectivo anillo de benzotiazol.

Complementariamente, se pueden distinguir las bandas que evidencian la formación del nuevo complejo quelato (**D**) obtenido por la reacción *template*. Dichas señales, a pesar de no ser muy intensas, se pueden establecer como los correspondientes estiramientos del enlace de coordinación entre el centro metálico y los átomos dadores, a 534 y 449 cm^{-1} para el $\nu(\text{Cu}-\text{N})$ y $\nu(\text{Cu}-\text{O})$ respectivamente.

Tabla 16: Asignaciones de las principales bandas de absorción FT-IR (KBr) del complejo quelato [2,2'-{propano-1,3-diilbis[nitrilo(E)metililideno]}bis[6-(1,3-benzotiazol-2-il)fenolato]- κ^4 -N,N',O,O'}cobre(II) (D).

[2,2'-{propano-1,3-diilbis[nitrilo(E)metililideno]}bis[6-(1,3-benzotiazol-2-il)fenolato]- κ^4 -N,N',O,O'}cobre(II) (D)	
Tipos de vibraciones IR (grupo estructural)	Bandas de absorción FT-IR (cm ⁻¹)
$\nu_{(O-H)}$ Alcohol (solvente)	3436
$\nu_{(C-H)}$ Aromático	3054
$\nu_{(C-H)}$ Cadena Alifática —(CH ₂) ₃ —	2940, 2925
$\nu_{(C-H)}$ Base de Schiff (H—C=N)	2850
$\nu_{(C=N)}$ Tiazol	1626
$\nu_{(C=N)}$ Base de Schiff (H—C=N)	1612
$\nu_{(C=C)}$ Aromático	1549, 1498, 1434
$\delta_{(C-H)}$ Base de Schiff (H—C=N)	1399
$\delta_{(C-H)}$ Aromático/Fenol	1315, 1290
$\nu_{(C-O)}$ Fenol	1229
$\delta_{(C-H)}$ Aromático/Benzotiazol	1173, 1123, 1043, 1011, 925
$\pi_{(C-H)}$ Aromático/Fenol	874, 830
$\pi_{(C-H)}$ Aromático/Benzotiazol	754, 729
$\nu_{(Cu-N)}$ Complejo quelato	534
$\nu_{(Cu-O)}$ Complejo quelato	449
Considérese las siguientes abreviaturas; ν : estiramiento δ : flexión en el plano π : flexión fuera del plano	



8.2.4.2. Espectrometría de masas

El análisis por ESI-MS destaca principalmente las señales espectrales correspondientes a los *iones positivos* (ion molecular: $[M]^+$, ion aducto: $[M+Na]^+$) cuyas relaciones m/z (610.2, 632.1, respectivamente) son presentados en la **Tabla 17**. Asimismo, los espectros del blanco (BK) y del complejo (**D**) que avalan el análisis son mostrados comparativamente en la **Figura 36**. En base a los resultados analíticos, la presente técnica instrumental ha permitido confirmar la obtención de un nuevo complejo de cobre(II) del tipo quelato (**D**). Esta idea se basa en el fundamento de la técnica empleada (ESI-MS), en donde solo se reflejan los resultados de una leve ionización de la propuesta estructural. La confirmación de la masa esperada para el complejo **D** no muestra otras señales provenientes del ligando o precursores, esto daría indicación de la alta pureza del compuesto obtenido y a su vez refleja la alta selectividad de la reacción *template* empleada.

Tabla 17: Datos de la espectrometría de masas (ESI-MS) del complejo quelato [2,2'-{propano-1,3-diilbis[nitrilo(*E*)metililideno]}bis[6-(1,3-benzotiazol-2-il)fenolato]- κ^4 -*N,N',O,O'*]cobre(II) (**D**).

[2,2'-{propano-1,3-diilbis[nitrilo(<i>E</i>)metililideno]}bis[6-(1,3-benzotiazol-2-il)fenolato]-κ^4-<i>N,N',O,O'</i>]cobre(II) (D)			
Masa molecular exacta (M): 610.04 g/mol			
Iones	Relación m/z calculada	Relación m/z encontrada	Intensidad ($\times 10^5$)
$[M]^+$	610.04	610.2	7.0
$[M+Na]^+$	633.04	632.1	6.0

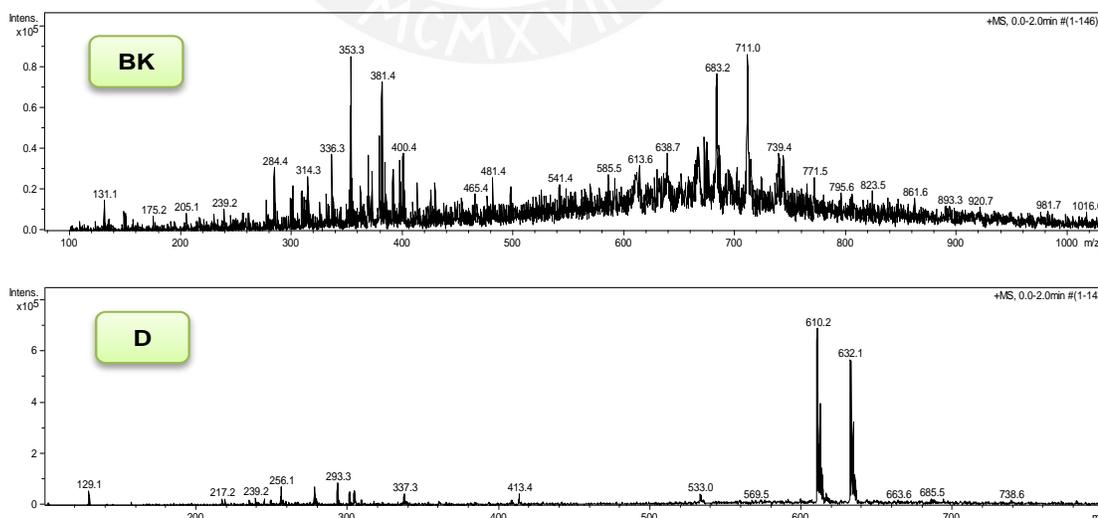


Figura 36: Espectro ESI-MS del complejo quelato [2,2'-{propano-1,3-diilbis[nitrilo(*E*)metililideno]}bis[6-(1,3-benzotiazol-2-il)fenolato]- κ^4 -*N,N',O,O'*]cobre(II) (**D**).

8.2.4.3. Espectroscopía Ultravioleta-Visible

La caracterización de la naturaleza electrónica-molecular se llevó a cabo registrando el respectivo espectro de absorción UV-VIS del nuevo complejo quelato **(D)** en acetonitrilo (MeCN). Particularmente, se usó acetonitrilo como solvente porque presenta una alta transmitancia (aprox. 100 % a partir de 190 nm) (49). Como referencia se preparó una solución patrón de 250 ppm la cual fue diluida convenientemente durante la prueba para no saturar al detector. De esta manera, por medio de un barrido continuo en un rango de 190 a 1100 nm, se registró el espectro UV-VIS del nuevo complejo quelato **(D)** que es mostrado en la **Figura 37**. Asimismo, la **Tabla 18** presenta las longitudes de onda de los máximos de absorción (λ_{\max} , nm) con sus respectivos grupos cromóforos (transiciones electrónicas) pertenecientes a la nueva molécula sintetizada **(D)**.

Tabla 18: Asignaciones de las principales bandas de absorción UV-VIS (nm) con sus respectivas transiciones electrónicas del complejo quelato [2,2'-{propano-1,3-diilbis[nitrilo(*E*)metililideno]}bis[6-(1,3-benzotiazol-2-il)fenolato]- κ^4 -*N,N',O,O'*]cobre(II) **(D)** en acetonitrilo.

[2,2'-{propano-1,3-diilbis[nitrilo(<i>E</i>)metililideno]}bis[6-(1,3-benzotiazol-2-il)fenolato]- κ^4 - <i>N,N',O,O'</i>]cobre(II) (D)	
Tipos de transiciones electrónicas (grupos cromóforos)	Longitudes de onda de los máximos de absorción UV-VIS (λ_{\max} , nm)
$\pi \rightarrow \pi^*$ (grupo fenilbenzotiazol)	203, 227, 264
$n \rightarrow \pi^*$ (grupo imina C=N del ligando)	-
$L(\pi) \rightarrow M(d\pi)$ (transiciones TCLM)	393

El espectro UV-VIS del complejo quelato propuesto **(D)** muestra cuatro bandas de absorción (**Figura 37**). En primer lugar, dentro del rango ultravioleta (UV) destacan las bandas de absorción a 203, 227 y 264 nm que corresponderían a las transiciones electrónicas $\pi \rightarrow \pi^*$ de los *sistemas aromáticos* de los *grupos fenilbenzotiazol* (2,50,51). Las señales de dichos grupos orgánicos, dentro del complejo, parecen no alterarse con respecto al ligando **(C)** ya que se observa una similitud de dicha zona al comparar ambos espectros (**Figura 38**). En segundo lugar, en la frontera UV-VIS, la cuarta banda de absorción a 393 nm puede sugerir una transición del tipo $L(\pi) \rightarrow M(d\pi)$ como una *transferencia de carga del ligando al metal* (transiciones TCLM) (21,40,49). Asimismo, al realizar una comparación con el espectro correspondiente al ligando **C** se observa un *desplazamiento hipsocrómico* de la banda que aparecía inicialmente a 449 nm (**Figura 38**). Estas evidencias explicarían la formación de enlaces

por coordinación más energéticos. Por otro lado, las *transiciones electrónicas d—d* características de los complejos de cobre(II), incluso a altas concentraciones del compuesto, no se observan; por tal motivo, el color del mencionado complejo quelato **(D)** se podría deber principalmente a la banda espectral por transferencia de carga (393 nm).

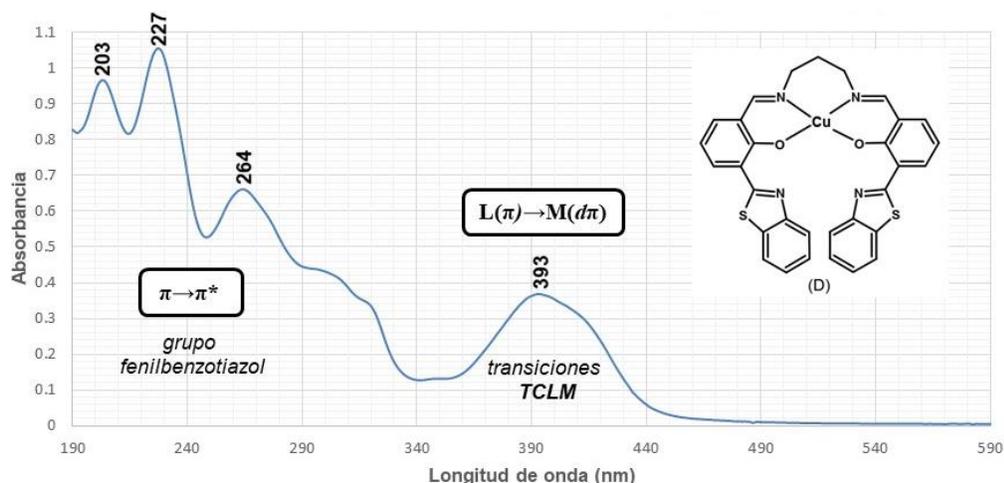


Figura 37: Espectro UV-VIS del complejo quelato [2,2'-{propano-1,3-diolbis[nitrilo(*E*)metililideno]}bis[6-(1,3-benzotiazol-2-il)fenolato]-κ⁴-*N,N',O,O'*]cobre(II) **(D)**.

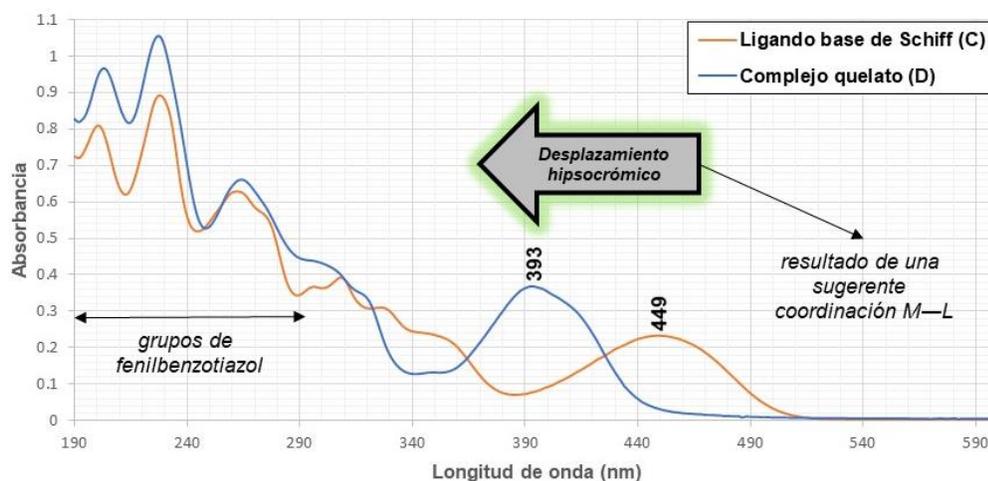


Figura 38: Contraste entre los espectros UV-VIS del complejo quelato **(D)** y su respectivo ligando **(C)**.

8.2.4.4. Espectroscopía de fluorescencia

Para la interpretación y caracterización de la naturaleza de emisión radiativa del presente sistema electrónico-molecular (complejo **D**) se registró el respectivo espectro de fluorescencia (**Figura 39**) en un rango de 337 a 622 nm. Para la determinación se utilizaron idénticos *slits* de 10 nm, y un haz de excitación de 320 nm sobre una establecida muestra de complejo (**D**) disuelta en acetonitrilo. La **Tabla 19** presenta los datos espectrales de interés que se obtienen de la técnica instrumental empleada. Finalmente, la medición de la intensidad fotoluminiscente a una determinada longitud de onda de máxima emisión ha permitido caracterizar al complejo quelato (**D**).

Tabla 19: Datos de la espectroscopía de fluorescencia del complejo quelato [2,2'-{propano-1,3-diilbis[nitrilo(*E*)metililideno]}bis[6-(1,3-benzotiazol-2-il)fenolato]- κ^4 -*N,N',O,O'*]cobre(II) (**D**) en acetonitrilo ($\lambda_{\text{ex}} = 320 \text{ nm}$).

Compuesto	Longitud de onda (λ_{em} , nm)	Intensidad relativa de fluorescencia
Complejo quelato (D)	453	686

En el espectro de emisión fotoluminiscente mostrado en la **Figura 39** se aprecia que el nuevo complejo quelato (**D**) emite a 453 nm cuando el sistema es excitado con un haz cuya longitud de onda es de 320 nm. Dicha excitación se establece convenientemente a partir del espectro de absorción UV-VIS (**Figura 37**) del correspondiente complejo **D**. Por tal, con una excitación a 320 nm se producirían transiciones de emisión con mayor eficacia cuántica y por ende un efecto fluorescente más intenso y aprovechable.

La fluorescencia en la molécula del nuevo complejo quelato (**D**) se podría deber, en principio, a las transiciones de emisión $\pi^* \rightarrow \pi$ de los *grupos fenilbenzotiazol* (fluoróforos) los cuales no experimentarían *transferencias electrónicas fotoinducidas* (TEP) por parte de los pares electrónicos del nitrógeno *imino*, pues según la propuesta estructural actual, éstos estarían formando enlaces por coordinación con el centro metálico de cobre(II) tal como se muestra en la **Figura 39**. Este enunciado que destaca la inhibición del mecanismo TEP como una posible causa de la fluorescencia se basa en estudios teóricos previos con complejos similares (49,52–54). A pesar de la coordinación a una especie paramagnética (Cu^{2+} , d^9), se puede probar la formación de un nuevo complejo quelato (**D**) cuyo perfil espectral de emisión es diferente al respectivo ligando base de Schiff (**C**), los cuales se comparan convenientemente en la **Figura 40**.

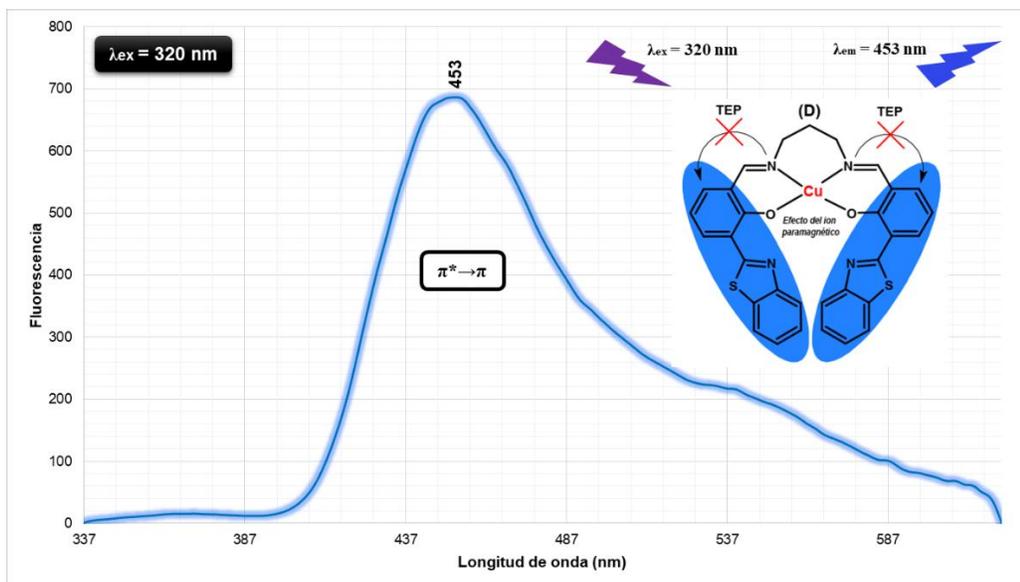


Figura 39: Espectro de fluorescencia del complejo quelato [2,2'-{propano-1,3-diilbis[nitrilo(*E*)metililideno]}bis[6-(1,3-benzotiazol-2-il)fenolato]-κ⁴-*N,N',O,O'*]cobre(II) (**D**) en acetonitrilo.

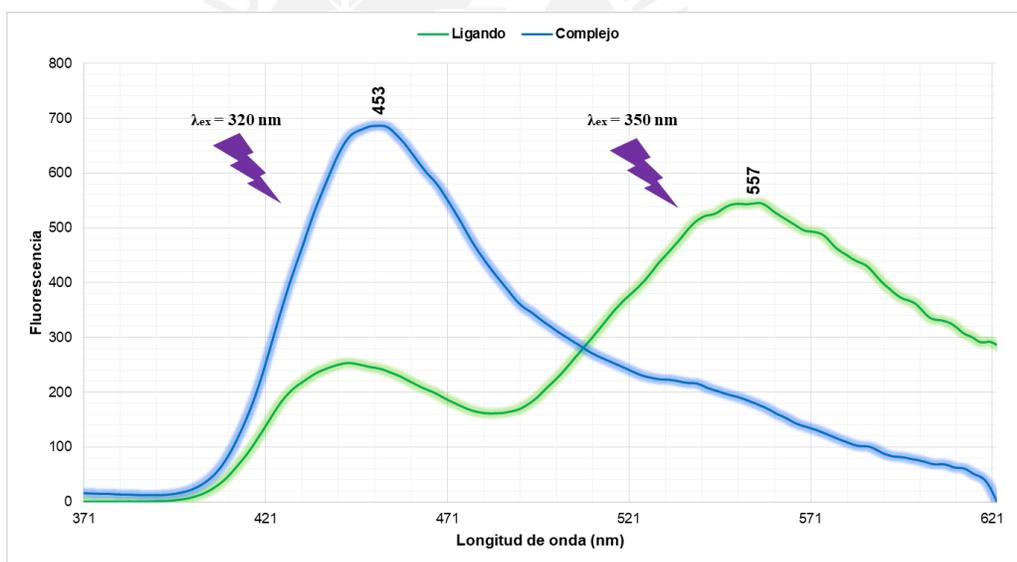


Figura 40: Comparación entre los espectros de fluorescencia del complejo quelato (**D**) y su respectivo ligando (**C**).

9. CONCLUSIONES

- A partir de una ruta metodológica de tres etapas sintéticas se logró producir, con un rendimiento de 58 % y pureza aproximada de 80 %, un nuevo ligando tetradentado del tipo base de Schiff simétrico derivatizado con dos unidades de benzotiazol.
- Para la primera etapa sintética se estableció una reacción de cicloadición muy conveniente con lo cual se logró producir eficientemente (72 %) al precursor 2-(1,3-benzotiazol-2-il)fenol **(A)**.
- Para la segunda etapa sintética se desarrolló una reacción de formilación (reacción de Duff) poco selectiva que solamente logró producir con un rendimiento de 20 % al precursor de interés 3-(1,3-benzotiazol-2-il)-2-hidroxibenzaldehído **(B)**.
- Para la síntesis del propuesto complejo de cobre(II) **(D)** se estableció y desarrolló un método de síntesis de alta selectividad basado en una reacción por efecto *template* del metal, en donde se logró además la formación *in situ* del ligando de interés **(C)**. De este modo y en un solo paso, se logró obtener un producto de alta pureza **(D)** con un rendimiento de 92 %.
- En base al análisis instrumental pertinente (FT-IR, ESI-MS, UV-VIS y de fluorescencia) se logró proponer para el nuevo complejo de cobre(II) **(D)** una estructura del tipo quelato cuyo centro metálico es probablemente tetracoordinado dentro de una geometría cuadrada plana por los átomos dadores (N,N,O,O) del ligando tipo base de Schiff simétrico derivatizado con restos de benzotiazol **(C)**.
- Mediante el método de difusión de vapor, durante los ensayos de cristalización, se logró obtener monocristales marrones bien definidos para el nuevo complejo quelato de cobre(II). De esta manera, se podría complementar y enriquecer la propuesta estructural usando en futuras instancias difracción de rayos X (DRX).

10. RECOMENDACIONES

- Se recomienda optimizar la síntesis del precursor **B** para mejorar la regioselectividad de la misma. Una forma sería bloqueando estratégicamente la posición *para* del sustrato (**A**) con grupos alquilo (R) para evitar la formilación de Duff *para-dirigida*. Otra opción sería explorar nuevas alternativas de formilación más eficientes a nivel de síntesis y purificación.
- En futuras experiencias, y para optimizar la síntesis del ligando tipo base de Schiff (**C**), se recomienda explorar nuevas formas de purificación que permitan separar eficientemente la mezcla de isómeros producidos durante la reacción de condensación, y de esta manera, obtener un producto (**C**) mucho más puro.
- Para extender el trabajo experimental y el conocimiento al respecto, se sugiere llevar a cabo en futuras experiencias la síntesis del complejo quelato (**D**) de la forma tradicional o convencional; es decir, conducir una reacción de metátesis entre el ligando base de Schiff (**C**) previamente sintetizado con la sal de cobre(II) pertinente. Este procedimiento contemplaría obviamente un paso adicional y ayudaría a tener una mejor perspectiva de lo hecho.
- En base a los resultados de los ensayos de cristalización para el nuevo complejo quelato de cobre(II) se recomienda llevar a cabo la correspondiente caracterización por difracción de rayos X (DRX).
- Se recomienda evaluar en próximas instancias la participación del nuevo complejo quelato (**D**) como un posible radiomarcador PET sobre las placas A β -amiloides en el diagnóstico del Alzheimer.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Perrin R, Fagan A, Holtzman D. Multimodal techniques for diagnosis and prognosis of Alzheimer's disease. *Nature*. 2009;461(7266):916–22.
2. Mirica L, Bandara N, Sharma A, Krieger S, Schultz J, Han BH, et al. Evaluation of ^{64}Cu -based radiopharmaceuticals that target A β peptide aggregates as diagnostic tools for Alzheimer's disease. *J Am Chem Soc*. 2017;139(1021):12550–8.
3. Vallabhajosula S. Positron emission tomography radiopharmaceuticals for imaging brain beta-amyloid. *J Semin Nucl Med*. 2011;41(4):283–99.
4. Dupont AC, Santiago Ribeiro MJ, Guilloteau D, Arlicot N. β -amyloid PET neuroimaging: A review of radiopharmaceutical development. *Médecine Nucléaire*. 2017;41(1):27–35.
5. Wadas T, Wong E, Weisman G, Anderson C. Coordinating radiometals of copper, gallium, indium, yttrium, and zirconium for PET and SPECT imaging of disease. *J Am Chem Soc*. 2010;110(5):2858–902.
6. Santini C, Pellei M, Gandin V, Porchia M, Tisato F, Marzano C. Advances in copper complexes as anticancer agents. *J Am Chem Soc*. 2013;114(521):815–62.
7. Donnelly P, Lim S, Hayne D. Metal complexes designed to bind to amyloid- β for the diagnosis and treatment of Alzheimer's disease. *J Chem Soc Rev*. 2014;43(19):6661–872.
8. Watanabe H, Kawasaki A, Sano K, Ono M, Saji H. Synthesis and evaluation of copper-64 labeled benzofuran derivatives targeting β -amyloid aggregates. *J Bioorg Med Chem*. 2016;23(125):312–17
9. Donnelly P, Hickey J, Lim S, Hayne D, Paterson B, White M, Villemagne V, et al. Diagnostic imaging agents for Alzheimer's disease: Copper radiopharmaceuticals that target A β plaques. *J Am Chem Soc*. 2013;135(21):16120–32.
10. Någren K, Halldin C, Rinne JO. Radiopharmaceuticals for positron emission tomography investigations of Alzheimer's disease. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2010;37(8):1575–93.
11. Williams DR. Metals, ligands, and cancer. *J Chem Rev*. 1972;72(3):203–13.

12. Wang X, Qu Y, Liu H. Amyloid β -targeted metal complexes for potential applications in Alzheimer's disease. *J Future Med Chem.* 2018;10(6):679–701.
13. Kung HF. The β -amyloid hypothesis in Alzheimer's disease: Seeing is believing. *J ACS Med Chem Lett.* 2012;3(52):265–7.
14. Kung HF, Choi SR, Qu W, Zhang W, Skovronsky D. ^{18}F stilbenes and styrylpyridines for PET imaging of $\text{A}\beta$ plaques in Alzheimer's disease: A miniperspective. *J Med Chem.* 2010;53(15):933–41.
15. Barrios Lopez B, Raki M, Bergstrom K. Radiolabeled peptides for Alzheimer's diagnostic imaging: Mini review. *J Curr Radiopharm.* 2013;6(4):181–91.
16. Kataoka Y. Molecular imaging opens up a vast new world for neuroscience. *Medical Xpress*; 2010 p. 1–6. [Consultado 28 Jun 2019]. Disponible en: <https://medicalxpress.com/news/2010-09-molecular-imaging-vast-world-neuroscience.html>
17. Schilling LP, Zimmer ER, Shin M, Leuzy A, Pascoal TA, Benedet AL, et al. Imaging Alzheimer's disease pathophysiology with PET. *J Dement Neuropsychol.* 2016;10(2):79–90.
18. Rosa-neto P, Leuzy A. Molecular imaging of Alzheimer's disease using PET. *J Can Rev Alzheimer's Dis Other Dementias.* 2008;20(7):18–25.
19. Esmadi F, Abbas K, Irshaidat T, Dawha A, Al-Duleimy M, Ismail L. Synthesis and characterization of some unsymmetrical Schiff bases and their copper(II) and nickel(II) complexes. *Jordan J Chem.* 2015;10(1):69–85.
20. Kolawole GA, Osowole AA. Synthesis and characterization of some metal(II) complexes of isomeric unsymmetrical Schiff bases and their adducts with triphenylphosphine. *J Coord Chem.* 2009;62(9):1437–48.
21. Asadi M, Khah MS. Some new unsymmetrical diimino tetradentate Schiff base derived from 3,4-diaminobenzophenone: Synthesis, characterization and the formation constant of Ni(II) and Cu(II) complexes. *J Iran Chem Soc.* 2010;7(4):875–82.
22. Chang C, Wang F, Wei T, Chen X. Benzothiazole-based fluorescent sensor for ratiometric detection of Zn(II) ions and secondary sensing PPI and its applications for biological imaging and PPase catalysis assays. *J ACS Ind Eng Chem Res.* 2017;56(6):8797–805.

23. Khan KM, MESAİK MA. The immunomodulation potential of the synthetic derivatives of benzothiazoles: Implications in immune system disorders through in vitro and in silico studies. *J Bioorg Chem.* 2015;64(2016):21–8.
24. Duff JC, Bills EJ. Reactions between hexamethylenetetramine and phenolic compounds. Part I. A new method for the preparation of 3- and 5-aldehydosalicylic acids. *Tech Coll Birmingham.* 1932;273(3):1987–8.
25. Duff JC, Bills EJ. Reactions between hexamethylenetetramine and phenolic compounds. Part II. Formation of phenolic aldehydes. Distinctive behaviour of p-nitrophenol. *Tech Coll Birmingham.* 1932;282(2):1305–8.
26. Duff JC. A new general method for the preparation of o-hydroxyaldehydes from phenols and hexamethylenetetramine. *Tech Coll Birmingham.* 1941;96(1):547–50.
27. Ferguson LN. The synthesis of aromatic aldehydes. *Tech Coll Birmingham.* 1945;48(9):227–54.
28. Grimblat N, Sarotti AM, Kaufman TS, Simonetti SO. A theoretical study of the Duff reaction: insights into its selectivity. *J Org Biomol Chem.* 2016;14(7):10496–501.
29. Chang IJ, Hwang KS, Chang S. Selective Hg²⁺ signaling via dithiane to aldehyde conversion of an ESIPT fluorophore. *J Dye Pigment.* 2016;1–25.
30. Xu P, Gao T, Liu M, Zhang H, Zeng W. A novel excited-state intramolecular proton transfer (ESIPT) dye with unique near-infrared keto emission and its application in detection of hydrogen sulfide. *J R Soc Chem Anal.* 2015;(86):1–3.
31. Wade LG. Ketones and Aldehydes. Jaworski A, editor. *Organic Chemistry.* 8th ed. USA: Pearson; 2013. p. 816–78.
32. Ashraf MA, Mahmood K, Wajid A. Synthesis, characterization and biological activity of Schiff bases. *J Bioorg Med Chem.* 2011;10(15):10–50.
33. Atkins R, Brewer G, Kokot E, Mockler G, Sinn E. Copper(II) and nickel(II) complexes of unsymmetrical tetradentate Schiff base ligands. *J Inorg Chem.* 1985;24(2):127–34.
34. Barwiolek M, Szlyk E, Surdykowski A, Wojtczak A. New nickel(II) and copper(II) complexes with unsymmetrical Schiff bases derived from (1R,2R)(-)-cyclohexanediamine and the application of Cu(II) complexes for hybrid thin layers deposition. *J Dalt Trans.* 2013;58(24):1–12.
35. Bhagat S, Sharma N, Chundawat TS. Synthesis of some salicylaldehyde-

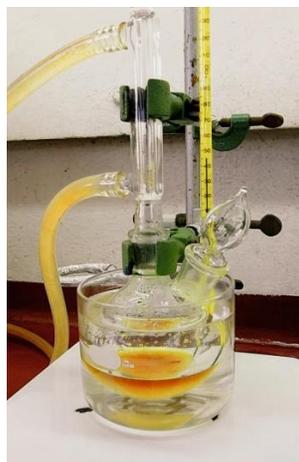
- based Schiff bases in aqueous media. *Hindawi J Chem.* 2012;2013(909217):1–4.
36. Muthuraj B, Layek S, Balaji SN, Trivedi V, Iyer PK. Multiple function fluorescein probe performs metal chelation, disaggregation, and modulation of aggregated A β and A β -Cu complex. *J ACS Chem Neurosci.* 2015;6(11):1880–91.
 37. Busch D, Thompson M. Metal ion control in the synthesis of planar nickel(II) complexes of α -diketo-bis-mercaptoimines. *J Inorg Chem.* 1964;86(4):213–7.
 38. Edwards PG, Haigh R, Li D, Newman PD. Template synthesis of 1,4,7-triphosphacyclononanes. *J Am Chem Soc.* 2006;128(5):3818–30.
 39. Lashanizadegan M, Boghaei DM. Template synthesis and x-ray structure determination of unsymmetrical tetradentate Schiff base complexes of nickel(II) and copper (II). *J Synth React Inorg Met Chem.* 2011;31(8):1519–29.
 40. Mobinikhaledi A, Jabbarpour M. Preparation, characterization, and biological activity of some new Schiff bases derived from aminophenoxy alkyloxy benzenamines and salicylaldehyde in the presence of p-TSA, and their Zn(II) and Cu(II) complexes. *J Res Chem Intermed [Internet].* 2013 [Consultado 28 Jun 2019]; 203(5). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/s11164-013-1205-1>
 41. Salata C, Youinou M-T, Burrows C. Preparation and structural characterization of dicopper(II) and dinickel(II) imidazolate-bridged macrocyclic Schiff base complexes. *J Inorg Chem.* 1991;30(18):3454–61.
 42. Charcosset C, Kieffer R, Mangin D. Coupling between membrane processes and crystallization operations. *J Ind Eng Chem Res.* 2010;49(12):5489–95.
 43. Horak V, Crist D. Small scale organic techniques filtration and crystallization. *J Chem Educ.* 1975;52(10):664–5.
 44. Colaboradores de Wikipedia. Disulfito de sodio [Internet]. Wikipedia, La enciclopedia libre, 2019. [Consultado 28 Jun 2019]. Disponible en: https://es.wikipedia.org/w/index.php?title=Disulfito_de_sodio&oldid=116600768
 45. Badui Dergal S. Química de los alimentos. 4th ed. Quintanar Duarte E, editor. México: Pearson Educación; 2006. 61-71 p.
 46. March J, Smith MB. Advanced organic chemistry. 6th ed. Wiley J, editor.

New Jersey: WILEY; 2007. 2374 p.

47. Silverstein RM, Webster FX, Kiemle DJ. Spectrometric identification of organic compounds. 7th ed. Brennan D, editor. New York: JOHN WILEY & SONS, INC.; 2005. 550 p.
48. Nakamoto K. Infrared and raman spectra of inorganic and coordination compounds. 6th ed. New Jersey: WILEY; 2009. 416 p.
49. Skoog DA, Holler FJ, Crouch SR. Principios de análisis instrumental. 6th ed. Cervantes González S, editor. México, D.F.: CENGAGE Learning; 2008. 336-398 p.
50. Sharma AK, Pavlova ST, Kim J, Finkelstein D, Hawco NJ, Rath NP, et al. Bifunctional compounds for controlling metal-mediated aggregation of the A β ₄₂ peptide. *J Am Chem Soc.* 2012;134(3):6625–36.
51. Sharma AK, Schultz JW, Prior JT, Rath NP, Mirica LM. Coordination chemistry of bifunctional chemical agents designed for applications in ⁶⁴Cu PET imaging for Alzheimer's disease. *J Inorg Chem.* 2017;56(4):13801–14.
52. Prasanna de Silva A, Moody T, Wright G. Fluorescent PET (Photoinduced Electron Transfer) sensors as potent analytical tools. *Analyst.* 2009;134(9):2385–93.
53. Escudero D. Revising intramolecular photoinduced electron transfer (PET) from first-principles. *J Acc Chem Res.* 2016;49(3):1816–24.
54. Ganguly A, Ghosh S, Kar S, Guchhait N. Selective fluorescence sensing of Cu(II) and Zn(II) using a simple Schiff base ligand: Naked eye detection and elucidation of photoinduced electron transfer (PET) mechanism. *J Spectrochim Acta Part A Mol Biomol Spectrosc.* 2015;23(36):1–35.

12. ANEXOS

Anexo 12.1: secuencia ilustrativa de la síntesis y purificación del intermediario 2-(1,3-benzotiazol-2-il)fenol (A)



(a)



(b)



(c)



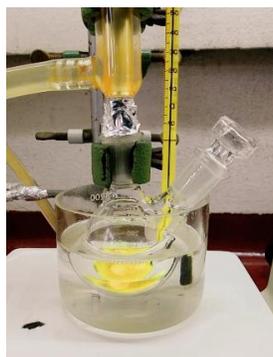
(d)



(e)

- a. Síntesis
- b. Extracción por precipitación
- c. Producto crudo
- d. Purificación por recristalización
- e. Producto puro (recristalizado)

Anexo 12.2: secuencia ilustrativa de la síntesis y purificación del intermediario 3-(1,3-benzotiazol-2-il)-2-hidroxibenzaldehído (B)



(a)



(b)



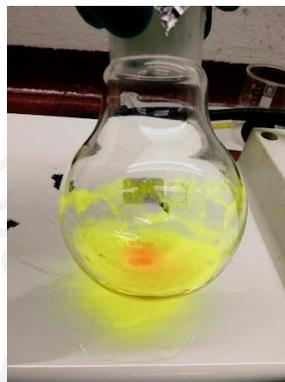
(c)



(d)



(e)



(f)



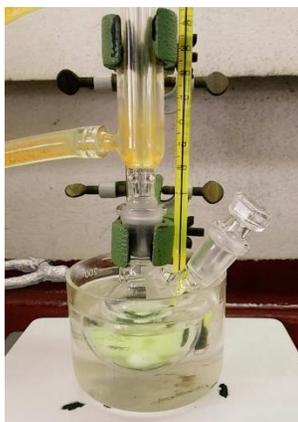
(g)



(h)

- a. Síntesis (reacción de Duff – primera parte)
- b. Hidrólisis ácida (reacción de Duff – segunda parte)
- c. Extracción líquido-líquido
- d. Fase orgánica
- e. Rotaevaporación
- f. Producto crudo viscoso
- g. Purificación por cromatografía en columna
- h. Producto de interés (**B**) en solución bajo luz UV

Anexo 12.3: secuencia ilustrativa de la síntesis y purificación del ligando tipo base de Schiff 2,2'-{propano-1,3-diilbis[nitrilo(*E*)metililideno]}bis[6-(1,3-benzotiazol-2-il)fenol] (C)



(a)



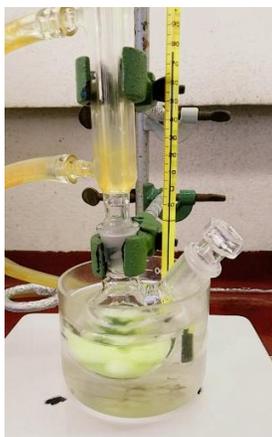
(b)



(c)

- a. *Disolución del intermediario (B)*
- b. *Formación inmediata de la carbinolamina*
- c. *Formación del ligando base de Schiff (C) catalizada por CH₃COOH*

Anexo 12.4: Secuencia ilustrativa de la síntesis *template* del nuevo complejo quelato [2,2'-{propano-1,3-diilbis[nitrilo(*E*)metililideno]}bis[6-(1,3-benzotiazol-2-il)fenolato]- κ^4 -*N,N',O,O'*]cobre(II) (**D**)



(a)



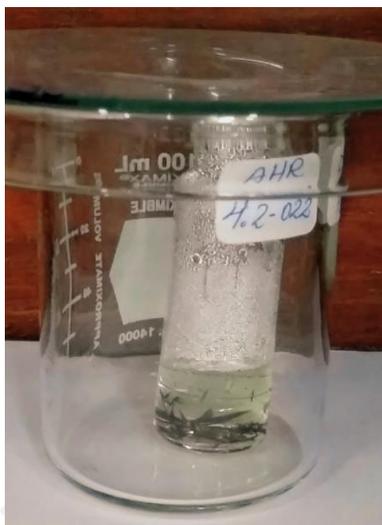
(b)



(c)

- a. *Disolución del intermediario (B)*
- b. *Formación instantánea del ligando tipo base de Schiff (C)*
- c. *Síntesis del complejo quelato (D) por efecto **template***

Anexo 12.5: Resultados de los ensayos de cristalización del nuevo complejo quelato [2,2'-{propano-1,3-diilbis[nitrilo(*E*)metililideno]}bis[6-(1,3-benzotiazol-2-il)fenolato]- κ^4 -*N,N',O,O'*]cobre(II) (D)



(a)



(b)

- a. *Ensayo de cristalización por difusión de vapor*
- b. *Microfotografía de un monocristal obtenido por un microscopio electrónico de objetivo 10x*