

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL PERÚ
ESCUELA DE POSGRADO



**Síntesis, caracterización y evaluación de sensores
fluorescentes del tipo "turn on", para su posible uso como
biosensores de Zn(II).**

TESIS PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE MAGISTER EN QUÍMICA

AUTOR

SAID NEME SANCHEZ

ASESOR

CARLA XIMENA MARÍA GALLI RIGO-RIGHI

San Miguel, 2017

RESUMEN

El interés por desarrollar sensores selectivos para el Zn(II) responde a la necesidad de poder detectar y rastrear este metal a nivel biológico dado el poco conocimiento que se tiene sobre sus mecanismos de acción fisiológicos y terapéuticos. En este contexto, el desarrollo de sensores fluorescentes, en particular, constituye un campo de investigación muy activo, puesto que la fluorescencia como técnica de señalización aventaja a otras en cuanto a la sensibilidad, selectividad y simplicidad de los análisis. Respecto a las propiedades espectrales deseables del fluorosensor para su aplicación a nivel biológico, estas incluyen: una alta intensidad de la señal fluorescente, longitudes de onda de excitación y emisión dentro del rango visible y una buena diferenciación entre los máximos de excitación y emisión. En este sentido, las cumarinas representan una opción atractiva como componente fluoróforo del sensor, no solo porque reúnen las características requeridas para fungir como tal, sino también porque la accesibilidad y versatilidad de su síntesis permite la introducción de sustituyentes capaces de modular las propiedades fotométricas del fluoróforo.

En el presente trabajo se plantea la síntesis y caracterización de tres ligandos cumarínicos que incorporen en su estructura un componente receptor derivado del salicilaldehído, el cual se acopla al fluoróforo cumarínico mediante un enlace C=N dando lugar a un sensor fluorescente del tipo base de Schiff. Asimismo, este diseño presenta el mecanismo de señalización fluorescente **turn on**, el cual se caracteriza por un aumento dramático en la intensidad fluorescente por complejación al metal. El diseño planteado del sensor ofrece tres posibles sitios de coordinación afines al Zn(II), N-imino, O-fenólico y C=O lactónico, lo que da lugar a que este compuesto se comporte como un ligando bidentado o tridentado. En ambos casos, se generaría un bloqueo de los mecanismos de desactivación no radiante presentes en los ligandos libres. Los resultados de las mediciones UV-Vis muestran una complejación efectiva al Zn(II) por parte de las tres bases de Schiff. Por otro lado, las mediciones fluorescentes, en un medio predominantemente acuoso, muestran el esperado efecto **turn on** por complejación al Zn(II) para dos de los tres ligandos sintetizados. Este efecto **turn on** no se observa en presencia de otros cationes metálicos presentes en el organismo. Asimismo, las propiedades fluorescentes de estos sensores, longitudes de excitación en el rango visible, longitudes de emisión cercanas al rojo y un considerable desplazamiento de Stokes resultan convenientes para una posible aplicación posterior a nivel biológico.

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	1
2. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	3
3. OBJETIVOS	4
3.1. Objetivo general	
3.2. Objetivos específicos	
4. MARCO TEÓRICO	5
4.1. Cinc.....	5
4.1.1. Cinc a nivel biológico	
4.1.2. Efectos terapéuticos	
4.1.3. Dificultades en la detección de cinc a nivel biológico	
4.2. Fluorescencia	8
4.2.1. Definición	
4.2.2. Factores que afectan la fluorescencia	
4.2.3. Mecanismos de transferencia de señal	
4.2.3.1. Transferencia electrónica fotoinducida (PET)	
4.2.3.2. Transferencia de carga fotoinducida (PCT)	
4.2.3.3. Transferencia de energía (ET)	
4.3. Sensores moleculares fluorescentes	14
4.4. Cumarinas	16
4.4.1. Cumarinas como fluoróforos	
4.4.2. Sensores fluorescente cumarínicos	
4.5. Estequiometría de los complejos en solución. Método de Job.....	22
5. HIPÓTESIS	25
6. METODOLOGÍA	27
6.1. Equipos, reactivos y solventes	27

6.2. Síntesis y caracterización de los ligandos	28
6.2.1. Síntesis del precursor 7-metoxi-3-acetoamidocumarina	
6.2.2. Síntesis del precursor 7-metoxi-3-aminocumarina	
6.2.3. Síntesis de los ligandos bases de Schiff cumarínicos	
6.3. Análisis Espectrofotométrico de los ligandos	30
6.3.1. Mediciones de absorción UV-Vis	
6.3.1.1. Mediciones de los ligandos y complejos de Zn(II)	
6.3.1.2. Mediciones de los ligandos en presencia de otros iones metálicos	
6.3.2. Mediciones de emisión fluorescente	
6.3.2.1. Mediciones de los ligandos y complejos de Zn(II)	
6.3.2.2. Mediciones de los ligandos en presencia de otros iones metálicos	
6.3.2.3. Mediciones del precursor 7-metoxi-3-aminocumarina	
6.3.3. Determinación de la estequiometría de los complejos en solución	
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
7.1. Procesos de síntesis	35
7.1.1. Síntesis del precursor 7-metoxi-acetoamidocumarina	
7.1.2. Síntesis del precursor 7-metoxi-aminocumarina	
7.1.3. Síntesis de los ligandos	
7.2. Caracterización	41
7.2.1. Precursor 7-metoxi-3-acetoamidocumarina	
7.2.2. Precursor 7-metoxi-3-aminocumarina	
7.2.3. Bases de Schiff derivadas de la 7-metoxi-3-aminocumarina	
7.3. Análisis Espectrofotométrico de los ligandos	60
7.3.1. Análisis Ultravioleta Visible	
7.3.1.1. Ligando 7-metoxi-3-(salicildeneamino)cumarina	
7.3.1.2. Ligando 7-metoxi-3-(4-metoxi-salicildeneamino)cumarina	
7.3.1.3. Ligando 7-metoxi-3-(5-metoxi-salicildeneamino)cumarina	

7.3.2. Análisis Fluorescente

7.3.2.1. Ligando 7-metoxi-3-(salicildeneamino)cumarina

7.3.2.2. Ligando 7-metoxi-3-(4-metoxi-salicildeneamino)cumarina

7.3.2.3. Ligando 7-metoxi-3-(5-metoxi-salicildeneamino)cumarina

7.3.2.4. Precursor 7-metoxi-3-aminocumarina

7.3.3. Determinación de la Estequiometría de los complejos

8. PROPUESTA ESTRUCTURAL	83
9. CONCLUSIONES	85
10. RECOMENDACIONES	86
11. BIBLIOGRAFÍA	
12. ANEXOS	



INDICE DE ABREVIATURAS

Ac₂O	Anhidrido Acético
AcONa	Acetato de sodio
ADN	Acido desoxirribonucleico
CEF	Fluorescencia intensificada por quelación (<i>Chelation enhanced fluorescence</i>)
CEQ	Atenuación de fluorescencia por quelación (Chelation enhanced quenching)
¹³C-RMN	Espectroscopía de resonancia Magnética Nuclear de carbono
DPA	Di(2-picolil)amina
EPR	Resonancia Paramagnética Electrónica
ET	Transferencia de energía
FTIR	Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier
HEPES	Acido 4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazina-etanosulfónico
¹H-RMN	Espectroscopía de resonancia Magnética Nuclear de hidrógeno
LIM	Dominio Lin-11, Isl-1, Mec-3
NADH	Dinucleótido de nicotinamida y adenina
PCT	Transferencia electrónica fotoinducida
PET	Transferencia de energía fotoinducida
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
UV-Vis	Espectroscopía Ultravioleta Visible
BS-L1	Ligando 7-metoxi-3-(salicildeneamino) cumarina
BS-L2	Ligando 7-metoxi-3-(4-metoxi-salicildeneamino)-cumarina
BS-L3	Ligando 7-metoxi-3-(5-metoxi-salicildeneamino)-cumarina

- Zn-BS-L1** Complejo del Ligando 7-metoxi-3-(salicildeneamino)-cumarina con Zn(II)
- Zn-BS-L2** Complejo del Ligando 7-metoxi-3-(4-metoxi-salicildeneamino)-cumarina con Zn(II)
- Zn-BS-L3** Complejo del Ligando 7-metoxi-3-(5-metoxi-salicildeneamino)-cumarina con Zn(II)



INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Diagrama parcial de energía para un sistema fotoluminiscente	8
Figura 2.	Efecto de la polaridad del solvente sobre la energía de las transiciones	11
Figura 3.	Transferencia electrónica reductiva	12
Figura 4.	Transferencia electrónica oxidativa.....	13
Figura 5.	Mecanismo de transferencia de carga fotoinducida (PCT)	13
Figura 6.	Mecanismo de transferencia de energía para un metal d^9	14
Figura 7.	Sensor fluorescente clase 1	15
Figura 8.	Sensor fluorescente clase 2	15
Figura 9.	Sensor fluorescente clase 3	16
Figura 10.	Estructura y numeración de la cumarina.....	17
Figura 11.	Sensor fluorescente cumarínico, la coordinación al Zn^{2+} ocurre vía DPA.....	19
Figura 12.	Sensor fluorescente cumarínico con receptor DPA en la posición 4 de la cumarina.....	19
Figura 13.	Sensor cumarínico tipo base de Schiff.....	20
Figura 14.	Mecanismo propuesto de la inhibición de la isomerización del enlace $C=N$ por coordinación al Zn^{2+}	20
Figura 15.	Sensor base de Schiff para $Zn(II)$ con receptor quinolina	21
Figura 16.	Fluorescencia por restricción conformacional en un complejo de $Zn(II)$	21
Figura 17.	Sensor base de Schiff cumarínico derivado de la 7-metoxi-3-aminocumarina.....	22
Figura 18.	Sensor cumarínico que incorpora una quinolina en la posición 3.....	22
Figura 19.	Mecanismo propuesto para la isomerización del enlace $C=N$	22

Figura 20.	Mecanismo de isomerización del enlace C=N que involucra un equilibrio ceto-enólico.....	23
Figura 21.	Método de Job para un complejo Zn(II) 1:1	24
Figura 22.	Esquema de síntesis del precursor 7-metoxi-3-acetoamidocumarina	29
Figura 23.	Esquema de síntesis del precursor 7-metoxi-3-aminocumarina.....	29
Figura 24.	Esquema de síntesis de los ligandos.....	30
Figura 25.	Espectro IR del precursor 7-metoxi-3-acetoamido-cumarina	41
Figura 26.	Espectro ¹ H-RMN del precursor 7-metoxi-3-acetamidocumarina	42
Figura 27.	Espectro ¹ H- ¹³ C HSQC-DEPT del precursor 7-metoxi-3-acetoamidocumarina	43
Figura 28.	Espectro ¹ H- ¹³ C HMBC del precursor 7-metoxi-3-acetomidocumarina	44
Figura 29.	Espectro IR del precursor 7-metoxi-3-aminocumarina	45
Figura 30.	Espectro IR comparativo del precursor 7-metoxi-3-acetoamidocumarina y 7-metoxi-3-aminocumarina	45
Figura 31.	Espectro ¹ H-RMN del precursor 7-metoxi-3-aminocumarina.....	46
Figura 32.	Espectro ¹ H- ¹³ C HSQC-DEPT del precursor 7-metoxi-3-aminocumarina	47
Figura 33.	Espectro ¹ H- ¹³ C HMBC del precursor 7-metoxi-3-aminocumarina ...	48
Figura 34.	Espectro IR de los tres ligandos bases de Schiff cumarinícos(BS-L1, BS-L2, BS-L3); banda correspondiente a νC=O lactónico (verde); banda correspondiente a νC=N imino (rojo).....	50
Figura 35.	Espectro ¹ H-RMN del ligando BS-L2	51
Figura 36.	Espectro ¹ H- ¹³ C HSQC-DEPT del ligando BS-L2	52
Figura 37.	Espectro ¹ H-TOCSY del ligando BS-L2	54

Figura 38.	Espectro ^1H -RMN del ligando BS-L3	55
Figura 39.	Espectro ^1H -RMN del ligando BS-L1	56
Figura 40.	Espectros ESI-MS de los tres ligandos bases de Schiff.....	59
Figura 41.	Espectros de absorbanca del BS-L1 a diferentes concentraciones	61
Figura 42.	Espectro de absorbanca del complejo Zn-BS-L1 a diferentes concentraciones y con una relación ligando/metal 2:1	61
Figura 43.	Espectro de absorbanca del complejo Zn-BS-L1 a diferentes concentraciones y con una relación ligando/metal 2:1	62
Figura 44.	Espectros de absorbanca del BS-L1 en presencia de otros metales divalentes	64
Figura 45.	Espectros de absorbanca del BS-L2 a diferentes concentraciones	65
Figura 46.	Espectros de absorbanca del Zn-BS-L2 a diferentes concentraciones y con una relación ligando/metal 2:1	65
Figura 47.	Espectros de absorbanca del BS-L2 en presencia de otros metales	67
Figura 48.	Espectros de absorbanca del BS-L3 a diferentes concentraciones	68
Figura 49.	Espectros de absorbanca del Zn-BS-L3 a diferentes concentraciones y con una relación ligando/metal 2:1	68
Figura 50.	Espectros de absorbanca del BS-L3 en presencia de otros metales	70
Figura 51.	Espectros de emisión de BS-L1 a diferentes longitudes de onda de excitación	72
Figura 52.	Espectros de emisión de Zn-BS-L1 a diferentes longitudes de onda de excitación.....	72
Figura 53.	(A) Mecanismo PET para bases de Schiff; (B) Mecanismo CEF.....	73
Figura 54.	Efecto <i>Turn On</i> del BS-L1 (6 μM) en presencia de Zn^{2+} (3 μM); espectro emisión BS-L1 (azul); espectro de emisión Zn-BS-L1 (rojo)	73

Figura 55.	Desplazamiento de Stokes para Zn-BS-L1	74
Figura 56.	Gráfica comparativa del efecto <i>turn on</i> del BS-L1 en presencia de iones metálicos.....	74
Figura 57.	Gráfica comparativa del efecto <i>turn on</i> del Zn-BS-L1 en presencia de otros iones metálicos	75
Figura 58.	Espectros de emisión de BS-L2 a diferentes longitudes de onda de excitación	76
Figura 59.	Espectros de emisión de Zn-BS-L2 a diferentes longitudes de onda de excitación.....	76
Figura 60.	Efecto <i>turn on</i> del BS-L2 en presencia de Zn^{2+}	77
Figura 61.	Desplazamiento de Stokes para Zn-BS-L2	77
Figura 62.	Gráfica comparativa del efecto <i>turn on</i> del BS-L2 en presencia de iones metálicos.....	78
Figura 63.	Gráfica comparativa del efecto <i>turn on</i> del Zn-BS-L2 en presencia de otros iones metálicos	78
Figura 64.	Espectros de emisión de BS-L3 a diferentes longitudes de onda de excitación	79
Figura 65.	Espectros de emisión de Zn-BS-L3 a diferentes longitudes de onda de excitación.....	79
Figura 66.	Gráfica comparativa del efecto <i>turn on</i> de los tres sensores sintetizados	80
Figura 67.	Espectro comparativo de la 7-metoxi-3-aminocumarina	80
Figura 68.	Gráfica de Job de intensidad fluorescente vs fracción molar [Ligando]/[Ligando+Metal] del complejo Zn-BS-L1	81
Figura 69.	Gráfica de Job de intensidad fluorescente vs fracción molar [Ligando]/[Ligando+Metal] del complejo Zn-BS-L2	82
Figura 70.	(A) Complejo tetraédrico de Zn(II). (B) Complejo octaédrico de Zn(II)	83

Figura 71. Complejo octaédrico de Zn(II) con ligando tridentado 84



INDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Volúmenes utilizados para determinar los valores de I	33
Tabla 2.	Volúmenes utilizados para determinar los valores de I_0	34
Tabla 3.	Procedimientos de síntesis para el precursor Prec-3AA	35
Tabla 4.	Ensayos de síntesis realizados para el precursor Prec-3AA	36
Tabla 5.	Procedimientos de síntesis para el precursor Prec-3A	37
Tabla 6.	Ensayos de síntesis realizados para el precursor Prec-3A	38
Tabla 7.	Procedimientos de síntesis para el ligando BS-L1	40
Tabla 8.	Procedimientos de síntesis para el ligando BS-L1	40
Tabla 9.	Datos ^1H -RMN para los precursores en d^6 -DMSO.....	47
Tabla 10.	Desplazamientos químicos en los espectros ^{13}C -RMN para los precursores acetoamido y amino.....	49
Tabla 11.	Bandas del infrarrojo (cm^{-1}) de los ligandos sintetizados	49
Tabla 12.	Correlaciones ^1H - ^{13}C en los espectros HSQC-DEPT y HMBC del ligando BS-L2	53
Tabla 13.	Desplazamientos ^1H -RMN para los ligandos en d^6 -DMSO	57
Tabla 14.	Señales m/z de los espectros MS de cada ligando.....	58
Tabla 15.	Longitudes de onda de absorción en el UV-Vis del ligando BS-L1 en estado libre y en presencia de metales de transición propuestos	63
Tabla 16.	Longitudes de onda de absorción en el UV-Vis del ligando BS-L2 en estado libre y en presencia de metales de transición propuestos	66
Tabla 17.	Longitudes de onda de absorción en el UV-Vis del ligando BS-L3 en estado libre y en presencia de metales de transición propuestos	70

INDICE DE ANEXOS

- Anexo 12.1** Espectros FTIR de los precursores cumarínicos
- Anexo 12.2** Espectros FTIR de los ligandos bases de Schiff
- Anexo 12.3** Espectros RMN de los precursores cumarínicos
- Anexo 12.4** Espectros RMN de los ligandos bases de Schiff
- Anexo 12.5** Espectros UV-Vis y valores de ϵ ($M^{-1}cm^{-1}$) de los ligandos bases de Schiff
- Anexo 12.6** Espectros UV-Vis y valores de ϵ ($M^{-1}cm^{-1}$) de los complejos con $ZnCl_2$
- Anexo 12.7** Espectros UV-Vis y valores de ϵ ($M^{-1}cm^{-1}$) de los complejos con $Zn(OAc)_2$
- Anexo 12.8** Espectros de emisión fluorescente de los ligandos bases de Schiff

1. INTRODUCCIÓN

El cinc es un conocido elemento traza presente en humanos, el segundo en abundancia después del hierro, y cofactor de más de 300 metaloenzimas implicadas en muchos procesos fisiológicos tales como secreción de insulina, apoptosis celular, biosíntesis de ácidos nucleicos, entre otros. Por otra parte, es muy reconocida su actividad terapéutica para el tratamiento de diversas enfermedades como lo son la diabetes, acrodermatitis, neumonía, enfermedad de Wilson, algunos tipos de cáncer, entre otras.^{1,2}

Sin embargo, muchos mecanismos de acción fisiológicos y terapéuticos del cinc no se encuentran aún bien esclarecidos, pues la configuración d^{10} del Zn(II) dificulta su detección por técnicas espectroscópicas usuales.^{3,4} La ausencia de transiciones d-d en el ion libre y en los complejos de este metal hace que la espectroscopía UV-Vis resulte de poca utilidad, salvo que se presenten bandas de transferencia de carga ligando-metal. Además, el Zn(II) es diamagnético en todos sus compuestos, lo que excluye el uso de la técnica de espectroscopia EPR o medidas magnetométricas. Por último, sus isótopos naturales más comunes poseen un espín nuclear de cero, lo que los hace silenciosos a la resonancia magnética nuclear (RMN).¹

En este sentido, una técnica útil para visualizar al Zn(II) es mediante el uso de sensores moleculares específicos para este metal. El desarrollo de sensores fluorescentes, en particular, constituye un campo de investigación muy activo debido a su potencial aplicación en diversas áreas como la bioquímica clínica, la química analítica y la ambiental.³ Además, la fluorescencia como técnica de señalización aventaja a otras técnicas en cuanto a la sensibilidad, selectividad y simplicidad de los análisis.

En general, un sensor fluorescente típico contiene un receptor (sitio de reconocimiento) unido a un fluoróforo (fuente de la señal) que convierte el reconocimiento del analito en una señal fluorescente.⁵ Respecto a las propiedades espectrales deseables del fluorosensor para su aplicación a nivel biológico, estas incluyen: una alta intensidad de la señal fluorescente, longitudes de onda de excitación y emisión dentro del rango visible y una buena diferenciación entre los máximos de excitación y emisión.⁶

En este sentido, las cumarinas representan una opción atractiva como componente fluoróforo para el diseño de sensores fluorescentes de uso biológico, no solo porque reúnen las características requeridas para fungir como tal, sino también porque la

accesibilidad y versatilidad de su síntesis permite la introducción de sustituyentes capaces de modular las propiedades ópticas del fluoróforo.⁷ Se han diseñado sensores fluorescentes cumarínicos de cinc, en los cuales mediante una sustitución adecuada del anillo aromático se acopla diversos componentes receptores del tipo base de Schiff; estos últimos presentan una especial afinidad por este metal.⁵

En lo que se refiere a mecanismos de señalización fluorescente en este tipo de sensores, destacan los que presentan un efecto denominado **“turn on”** o **“switching on”**. Este consiste en un aumento dramático de la intensidad fluorescente por complejación al metal, el cual bloquea los mecanismos de desactivación no radiantes del sensor al estado libre, entre los cuales destacan el mecanismo de transferencia electrónica fotoinducida (PET) por parte del par libre del N imino y la isomerización del enlace C=N o eventualmente una combinación de ambos.^{5, 8}

En la presente investigación se propone la síntesis y caracterización de ligandos bases de Schiff cumarínicos para su aplicación como sensores fluorescentes específicos de Zn(II). Dichos sensores incorporarán en su estructura como componente fluoróforo un derivado de la 3-aminocumarina con un sustituyente metoxi en la posición 7. El sustituyente amino en la posición 3 del fluoróforo permitirá formar, con derivados del salicilaldehído, sensores tipo base de Schiff con receptor fenólico.

El diseño planteado del sensor ofrece tres posibles sitios de coordinación afines al Zn(II), N-imino, O-fenólico y C=O lactónico, lo que da lugar a que este compuesto se comporte como un ligando bidentado o tridentado. En ambos casos, la complejación al cinc generaría una estructura rígida lo que bloquearía los mecanismos de desactivación no radiantes, isomerización del enlace C=N y PET, y daría origen al tipo de señalización **turn on** esperado. Asimismo, este diseño incluye un sustituyente donador en la posición 7 del anillo cumarínico, lo que favorece un incremento en la intensidad de la emisión fluorescente; además, la extensión del sistema aromático por efecto del receptor fenólico acoplado desplazaría las bandas de excitación/emisión hacia longitudes de onda más largas.

Esta investigación constituye un aporte al desarrollo de sensores fluorescentes selectivos hacia un metal de interés farmacológico, el Zn(II), pero, cuyos mecanismos de acción aún no están bien esclarecidos por las dificultades en su detección a nivel biológico. El diseño propuesto de estos sensores conduciría a características fotométricas deseables para su posible aplicación a nivel biológico.

2. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

El desarrollo de sensores fluorescentes de cinc con potencial aplicación a nivel biológico responde a la necesidad de detectar y rastrear este metal a las bajas concentraciones presentes en el organismo, para lo cual se aprovecha la sensibilidad y bajos límites de detección que caracterizan a la técnica de fluorescencia. En este sentido, el diseño de sensores basados en cumarinas como componente fluoróforo se basa en que esta molécula presenta propiedades espectroscópicas muy atractivas para su utilización como biosensor y,⁷ además, el acoplar un componente receptor que presente una reconocida afinidad por el Zn^{2+} no solo permitiría modular estas propiedades, sino también, obtener un sensor fluorescente selectivo para este metal. Asimismo, el acoplar el receptor base de Schiff al anillo cumarínico, permite que el sensor exhiba el efecto de señalización **turn on**, el cual consiste en la inhibición del mecanismo de desactivación no radiante producido por una combinación de la isomerización del enlace C=N y un mecanismo PET, propios de la base de Schiff.

Si bien ya existen varios tipos de sensores cumarínicos del tipo **turn on** para Zn^{2+} , la mayoría de estos han presentado longitudes de onda de excitación en el rango UV, lo que podría ocasionar cierto grado de daño celular y dificultar el estudio de las rutas biológicas del cinc.^{9,10,11,12,13} Por otro lado, algunos sensores que sí han presentado bandas de excitación dentro del rango visible, son producto de síntesis relativamente largas y complicadas, que además suelen utilizar reactivos tóxicos y de difícil manejo como el ácido trifluoroacético, $POCl_3$, entre otros.^{14,15} Otro problema observado, es que muchos de estos sensores, por su limitada solubilidad, son analizados en solventes orgánicos como acetonitrilo, THF, DMF o DMSO, lo que dificultaría las mediciones a nivel biológico, ya que estas se realizan en medios acuosos.^{14,15}

En el presente trabajo de investigación se propone la síntesis de ligandos bases de Schiff derivados de la 7-metoxi-3-aminocumarina. El grupo 3-amino ofrece la posibilidad de acoplar un componente receptor derivado del salicilaldehído para formar un ligando tipo base de Schiff. El N imínico y el OH desprotonado del receptor, en posición orto al enlace C=N, serían posibles sitios de coordinación dado que estos grupos en particular han mostrado afinidad por el Zn^{2+} .^{14,15,16} De esta manera, se tendría un ligando bidentado el cual por coordinación al Zn^{2+} introduciría una restricción de los dos mecanismos de desactivación no radiante antes mencionados lo que conduciría al efecto fluorescente **turn on**. Por otro lado, la presencia de la base de Schiff en la posición 3, convertiría al C=O lactónico adyacente en un potencial sitio de coordinación adicional, lo que podría dar lugar a un ligando tridentado.⁹

3. OBJETIVOS

Objetivo general

- Sintetizar y caracterizar ligandos bases de Schiff cumarínicos y evaluar su capacidad como sensores fluorescentes selectivos de Zn(II) de interés a nivel biológico.

Objetivos específicos

- Sintetizar, por un procedimiento optimizado, las siguientes bases de Schiff:
 - ✓ 7-metoxi-3-(salicildeneamino)-cumarina
 - ✓ 7-metoxi-3-(4-metoxi-salicildeneamino)-cumarina
 - ✓ 7-metoxi-3-(5-metoxi-salicildeneamino)-cumarina
- Comprobar la complejación de estas bases de Schiff al Zn(II) mediante la comparación de los espectros UV-Vis de los ligandos en estado libre y en presencia de este metal.
- Comprobar la existencia del efecto **turn on** mediante una comparación de los espectros de emisión fluorescente de los ligandos en ausencia y presencia de Zn²⁺.
- Comprobar la ausencia de emisión fluorescente de los ligandos en presencia de otros iones metálicos: Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Fe²⁺, Co²⁺, Ni²⁺, Cu²⁺ y Cd²⁺.
- Analizar la selectividad del ligando por el Zn(II) mediante la medición de los espectros fluorescentes de los ligandos en presencia de pares Zn²⁺-Mⁿ⁺.

4. MARCO TEÓRICO

4.1. CINC

4.1.1. Cinc a Nivel biológico

El cinc es un elemento traza presente en animales y humanos, segundo en abundancia después del hierro, pero a diferencia de este, posee un único estado de oxidación estable (Zn^{2+}). En consecuencia, no participa en reacciones redox, sino que más bien su actividad biológica se relaciona con su comportamiento de ácido de Lewis.^{2,17}

Es un metal de amplia actividad biológica y fisiológica, debido a que desempeña diversas funciones en el organismo. Una de las principales es su función catalítica, que juega un papel clave en el funcionamiento de más de 300 metaloenzimas.¹ En la mayoría de ellas, el cinc forma parte del sitio activo y participa directamente en el mecanismo catalítico. Entre las más representativas se encuentran la anhidrasa carbónica, la alcohol deshidrogenasa y la carboxipeptidasa A.^{2,18}

Una segunda función importante del cinc es la estructural, en la que el metal estabiliza la estructura terciaria de las proteínas. La complejación de estas últimas al cinc, le confieren la estabilidad estructural local y global requerida para realizar una amplia gama de funciones. Así, por ejemplo, en los dedos de cinc, el ion metálico se coordina a cuatro cadenas laterales de una proteína en una estructura tetraédrica tomando una forma similar a un dedo. Sus funciones se encuentran relacionadas con el proceso de unión del ADN con los factores de transcripción involucrados en el proceso de expresión genética.¹ Sin embargo, algunas proteínas con este tipo de motivo estructural no poseen esta función, sino, como es el caso de las proteínas LIM, están más bien encargadas de la migración neuronal y celular, diferenciación y proliferación celular, entre otras.² Además, se ha identificado este motivo estructural en receptores nucleares hormonales, como los de estrógeno, testosterona y vitamina D.^{2,18}

La tercera función del cinc es la regulatoria; así tenemos que, por ejemplo, actúa como ion regulador intracelular que activa o inhibe los factores de transcripción genética. De este modo regula la expresión de las metioninas, cuya función es secuestrar metales pesados para la desintoxicación de la célula.^{2,19}

Por otro lado, también juega un papel muy importante la acción antioxidante del cinc, que incluye entre otras, la protección de los grupos sulfhidrilo de las proteínas y las

enzimas contra el ataque de especies reactivas de oxígeno, así como la reducción de la formación de radicales hidroxilos a partir de peróxido de hidrógeno.^{2,18}

Actualmente se conoce que el cinc participa en la apoptosis (muerte celular coordinada genéticamente), un proceso de regulación celular fundamental el cual erradica las células defectuosas o mutadas antes de que tengan ocasión de multiplicarse. Este efecto resulta relevante en su posible actividad antitumoral.^{18,20}

Por otra parte, es muy conocida la relación que existe entre el cinc y la insulina, ya que este metal cumple funciones fundamentales en la síntesis, estructura, estabilidad conformacional y secreción de la insulina en el organismo. Una deficiencia de cinc provoca una disminución en la producción y secreción de insulina en el páncreas, lo que afecta al mecanismo regulador de la glucosa que ejerce esta hormona y ocasiona hiperglicemia.²¹

4.1.2. Efectos terapéuticos

A partir del descubrimiento de la acción antidiabética de las sales de cinc en 1980, se han sintetizado y evaluado en su acción insulinomimética, diversos complejos de cinc con ligandos orgánicos. Se encontró que, en general, la complejación del cinc tiene muchos efectos ventajosos respecto a las sales, puesto que promueve su efecto insulinomimético, al mejorar la hiperglicemia y la resistencia a la insulina, aumentar la absorción gastrointestinal y reducir la toxicidad del Zn(II) al estado libre. Además, estos complejos presentan la ventaja adicional de ser efectivos a menores dosis y con períodos de administración más cortos.²²

La acción insulinomimética del cinc está relacionada a su importante participación a nivel post-receptor en la cascada enzimática de la insulina. Además, el cinc ejerce una función protectora sobre las células β del páncreas, responsables de la producción de insulina, lo que ejerce un efecto favorable en la regulación del nivel de glucosa.²³

Por otro lado, se ha comprobado el efecto terapéutico de una sal de cinc (ZnCl_2) en el tratamiento del cáncer a la piel. En 1930, F. Mohs descubrió que al inyectar una solución de esta sal se lograba la necrosis de tejido epitelial canceroso; a partir de lo cual desarrolló una técnica, que lleva su nombre, para poder extirpar el tejido canceroso.²⁴ Asimismo, se ha observado que los niveles de cinc en el suero y los tejidos malignos de los pacientes con diversos tipos de cáncer se encuentran disminuidos, lo que apoya la hipótesis de que una deficiencia del mismo contribuye directamente en el desarrollo de la enfermedad.¹⁷

En un estudio realizado en algunos países en vías de desarrollo, se pudo observar que en infantes que padecían diarreas agudas o neumonía, la administración de dosis de cinc disminuía la duración y gravedad de estas enfermedades. Además, una suplementación de cinc disminuía su incidencia en un 18% y 41% respectivamente.²

Por otra parte, se han observado respuestas terapéuticas beneficiosas frente a la suplementación de cinc en pacientes con acrodermatitis enteropática y enfermedad de Wilson. La suplementación de este metal también ha generado un efecto positivo en pacientes con enfermedades cardiovasculares y, por lo contrario, una deficiencia del mismo puede tener efectos adversos en pacientes con insuficiencia cardíaca.^{15,16} Asimismo, algunos estudios clínicos demostraron el efecto beneficioso del cinc en la terapia antidepresiva; pacientes a quienes no se les administraba dosis de cinc presentaban bajas concentraciones séricas de este metal. Se han propuesto varios mecanismos para explicar la relación entre la deficiencia de cinc y los síntomas de la depresión, sin embargo, aún se desconoce la relación precisa.¹⁷

4.1.3. Dificultades en la detección de cinc a nivel biológico

La gran mayoría de los mecanismos de acción involucrados en las múltiples funciones fisiológicas y terapéuticas del cinc, no están aún bien esclarecidos y se necesita desarrollar nuevas técnicas de estudio a nivel intracelular.² Esto se debe, en parte, a la ausencia de propiedades espectroscópicamente detectables del cinc, propias de su configuración electrónica d^{10} .^{3,4}

La ausencia de transiciones d-d en el ion libre y en sus complejos hace que la espectroscopía UV-Vis resulte de poca utilidad, salvo que se presenten bandas de transferencia de carga ligando-metal. Además, el Zn(II) es diamagnético en todos sus compuestos, lo que excluye el uso de la técnica de espectroscopia EPR o medidas magnetométricas. Por último, sus isótopos naturales más comunes poseen un espín nuclear de cero, lo que los hace silenciosos a la resonancia magnética nuclear (RMN).¹ En este sentido, una técnica para visualizar espectroscópicamente al Zn(II) es a través del uso de sensores moleculares fluorescentes específicos para este metal. La posibilidad de desarrollar sensores de cinc que permitan el estudio de sus funciones a nivel intracelular ha despertado gran interés debido a la importancia biológica de este metal de transición.

Un sensor molecular (quimiosensor) es una molécula capaz de transformar información química, tal como presencia de un analito específico en una muestra, en una señal analítica útil.¹ El desarrollo de sensores fluorescentes, en particular,

constituye un campo de investigación muy activo debido a su potencial aplicación en diversas áreas como la bioquímica clínica, la química analítica y la ambiental.³ La ventaja de emplear la fluorescencia como técnica de señalización radica en su alta sensibilidad, con límites de detección del rango de partes por billón; en este sentido, es superior a la técnica de absorción UV-Vis, cuyos límites de detección son dos órdenes de magnitud más grandes. Además, posee un amplio rango de variación lineal con la concentración del analito y es una técnica muy selectiva, ya que no todas las moléculas que absorben luz son fluorescentes.^{25,26}

4.2. FLUORESCENCIA

4.2.1. Definición

Se define como el proceso de desactivación con emisión de luz, que sufre una molécula cuando pasa de un estado excitado a su estado fundamental o basal.²⁵ La fluorescencia puede ocurrir en cualquier sistema químico, sea sólido, líquido o gaseoso.

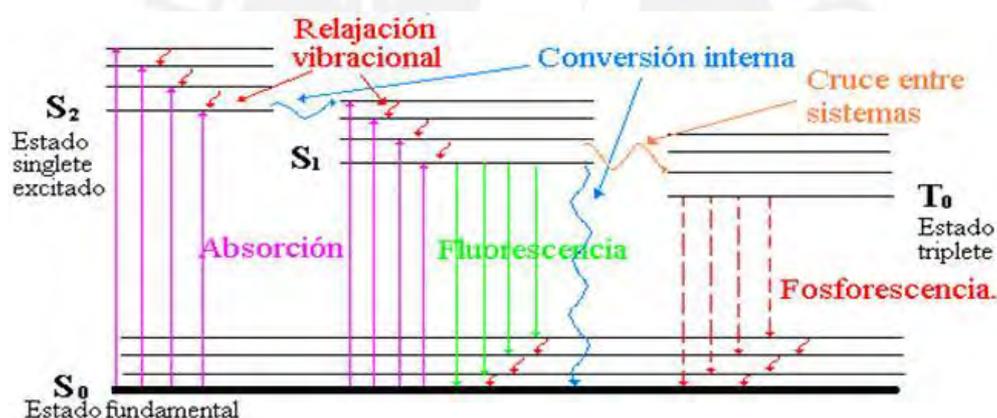


Figura 1. Diagrama parcial de energía para un sistema fotoluminiscente.²⁵

Cuando una molécula absorbe energía de una determinada longitud de onda (λ), pasa de un estado S₀ (estado *singlete* fundamental) a un estado excitado *singlete*, (S₁). Esta transición electrónica, sin cambio de spin, se da desde el nivel vibracional más bajo del estado fundamental a cualquier nivel vibracional del estado excitado. Por otro lado, al estar la molécula en el estado S₁ podría pasar a un estado excitado *triplete* (T₀) por un proceso denominado entrecruce de sistemas, el cual consiste en una transición entre dos estados vibracionales isoenergéticos de diferente multiplicidad, lo que quiere decir que al pasar del estado S₁ al T₀ se da un cambio en el spin. Esta transición es muy rápida (10^{-10} - 10^{-8} s) y favorecida por átomos pesados (I⁻ o Br⁻) o la presencia de

especies paramagnéticas (O_2). Sin embargo, el tiempo de vida media del estado T_0 es de 10^{-4} - 10 s, mucho más largo que aquel del estado S_1 (10^{-9} – 10^{-7} s).^{25,26}

En general, una molécula excitada puede regresar a su estado fundamental por una combinación de diversos mecanismos. Esta relajación ocurre siempre desde el nivel vibracional más bajo del estado excitado (S_1 o T_0) a cualquier nivel vibracional del estado fundamental. Esto se debe a que el tiempo de vida media de un estado vibracional es muy corto (10^{-12} s) en comparación al tiempo de vida media del estado excitado S_1 (10^{-9} s); el exceso de energía vibracional es perdido rápidamente por colisiones de las moléculas excitadas con las moléculas de solvente.^{25,26}

Asimismo, podría existir una transición entre dos estados electrónicos de la misma multiplicidad de spin y cercanos en energía (*conversión interna*), lo que permitiría un solapamiento entre sus niveles vibracionales. En la **Figura 1** se observa el solapamiento entre el estado excitado S_1 y un estado excitado de mayor energía, el S_2 ; así este último disminuye su energía por conversión interna a S_1 . El proceso de conversión interna de S_1 a S_0 es menos probable que de S_2 a S_1 debido a que la brecha energética entre S_1 y S_0 es mayor, en este caso el proceso de conversión interna puede competir con los procesos radiantes. En general, el tiempo promedio del proceso de conversión interna es de 10^{-13} - 10^{-10} s.^{25,26}

Si el proceso de relajación no viene acompañado de una emisión de fotones se denominaría proceso no radiante, los cuales pueden ser causados por una interacción con transferencia de energía entre la molécula y el solvente (*conversión externa*).^{25,26}

Por otro lado, si el proceso de relajación viene acompañado de una emisión de luz se denomina proceso radiante, el cual puede ser de dos tipos: fluorescencia y fosforescencia. La fluorescencia es la desactivación de la molécula desde el estado S_1 al S_0 , si la emisión se da a la misma longitud de onda de la absorción se denomina *fluorescencia de resonancia*, la cual es más común en átomos metálicos como, por ejemplo, el sodio. En moléculas, debido a la posibilidad de transiciones desde niveles vibracionales altos hacia el nivel vibracional de mínima energía del estado S_1 , la banda de emisión fluorescente sufrirá un desplazamiento hacia longitudes de onda mayores; este corrimiento es denominado *desplazamiento de Stokes*. Por otro lado, si la desactivación ocurre desde el estado T_0 este fenómeno será denominado fosforescencia. En este caso el *desplazamiento de Stokes* será mucho mayor que en la fluorescencia.^{25,26}

4.2.2. Factores que afectan la fluorescencia

En general, la fluorescencia molecular suele ocurrir a longitudes de onda mayores a 250 nm y se restringe a transiciones $\pi^* \rightarrow \pi$ o $\pi^* \rightarrow n$, y rara vez a transiciones tipo $\sigma^* \rightarrow \sigma$. Esto es debido a que, las transiciones $\sigma \rightarrow \sigma^*$ requieren demasiada energía y la mayoría de moléculas poseen al menos un enlace que se rompería debido a la magnitud de la energía absorbida. Es por esta razón que la fluorescencia se restringe a moléculas que presentan enlaces dobles conjugados como ocurre en los sistemas aromáticos.²⁵

En sistemas aromáticos fluorescentes el estado excitado S_1 producido por las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ presenta un tiempo de vida de 10^{-7} a 10^{-9} s, mucho menor que el producido por transiciones $n \rightarrow \pi^*$, que es de 10^{-5} a 10^{-7} s. El tiempo de vida de S_1 (τ_s) viene dado por la siguiente relación.²⁶

$$\tau_s = \frac{1}{k_r^S + k_{nr}^S}$$

donde k_r^S y k_{nr}^S son las constantes de velocidad para procesos de desactivación radiantes y no radiantes respectivamente. En moléculas donde se favorecen las transiciones $n \rightarrow \pi^*$, la disminución de k_r^S influye más que el aumento de k_{nr}^S , lo que se traduce en el aumento del tiempo de vida del estado excitado. En cambio, en las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ la mayor contribución de k_r^S en detrimento de la k_{nr}^S es responsable del menor tiempo de vida del estado S_1 .

$$\Phi = k_r^S \tau_s = \frac{k_r^S}{k_r^S + k_{nr}^S}$$

Asimismo, esta disminución en el tiempo de vida provoca el aumento de la eficiencia cuántica o rendimiento cuántico.²⁶ Este incremento en el rendimiento cuántico se explica de dos maneras. En primer lugar, en moléculas que presentan mayor número de transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ el valor de k_{nr}^S será muy pequeño y el valor de Φ se aproximará a la unidad, por ejemplo, el perileno ($\Phi = 0.98$). Segundo, las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ poseen de 100-1000 veces mayor absorptividad molar que las transiciones $n \rightarrow \pi^*$, como consecuencia de su menor tiempo de vida (τ_s), tal como se muestra en la ecuación siguiente donde A^* es la especie excitada y t es el tiempo transcurrido.²⁶

$$[A^*] = [A^*]_0 \exp\left(\frac{-t}{\tau_s}\right)$$

En general, en moléculas que presenten un sistema de enlaces dobles conjugados extendido y que no posean átomos con pares libres, como es el caso de estructuras aromáticas sin heteroátomos, las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ serán las de menor energía y exhibirán mayor intensidad fluorescente. Asimismo, un aumento en el número de anillos aromáticos y el grado de condensación de estos disminuirá la energía de la transición e incrementará la intensidad de la emisión.²⁵

Sin embargo, si la estructura del fluoróforo incorpora heteroátomos o grupos funcionales con pares electrónicos libres, las transiciones $n \rightarrow \pi^*$ serán ahora las de menor energía lo que conlleva una disminución en la intensidad fluorescente. Este efecto se verá disminuido en solventes polares los cuales causan una inversión en las energías de transición, tal como se observa en la **Figura 2.**^{25,26}

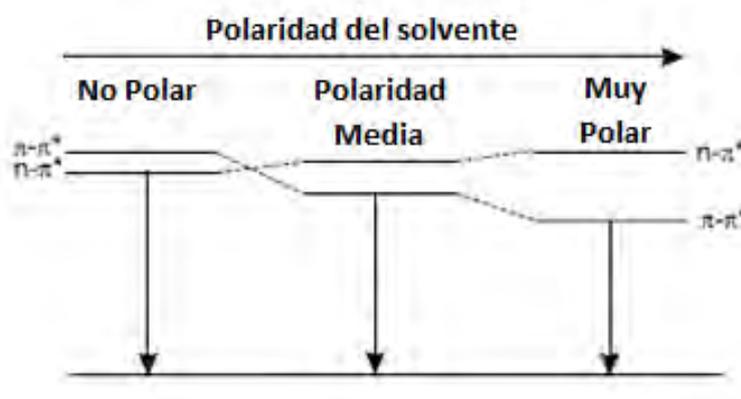


Figura 2. Efecto de la polaridad del solvente sobre la energía de las transiciones (Adaptado de referencia 26).

En las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$, el orbital π es menos polar que π^* , por lo que, al aumentar la polaridad del solvente, este último, será estabilizado en mayor medida lo que ocasionará una disminución de la energía de transición $\pi \rightarrow \pi^*$; de esta manera aumenta la intensidad de la fluorescencia y la banda de absorción se desplaza hacia longitudes de onda más largas. En cambio, en una transición $n \rightarrow \pi^*$ el orbital n será estabilizado en mucha mayor medida que el π^* debido a que presenta un par no enlazante. Esto último se traduce en una disminución de la emisión fluorescente y por consiguiente del rendimiento cuántico, así como en un desplazamiento de la banda de absorción hacia longitudes de onda más cortas.^{25,26}

Por otro lado, la temperatura también juega un papel muy importante en el aumento del rendimiento cuántico. Un incremento de la temperatura disminuye la emisión fluorescente ya que se favorecen los procesos de desactivación no radiantes

relacionados con la agitación térmica, como por ejemplo colisiones con moléculas de disolvente, vibraciones y rotaciones intramoleculares, entre otros.²⁶

4.2.3. Mecanismos de transferencia de señal

Existen mecanismos por los cuales las moléculas pueden disminuir su fluorescencia (*quenching*), sufrir un incremento de la misma o sufrir un desplazamiento en sus longitudes de onda de emisión. Entre estos mecanismos tenemos la transferencia electrónica fotoinducida (PET) y la transferencia de carga fotoinducida (PCT).

4.2.3.1. Transferencia electrónica fotoinducida (PET)²⁶

El mecanismo PET consiste en la desactivación no radiante del fluoróforo por una interacción de este con un sustituyente donador (-NH₂, -OH, -OMe, etc), o aceptor (-COR, -NO₂, -CN, etc); dependiendo del tipo de sustituyente que esté presente en el fluoróforo el mecanismo se desarrollará de diferente manera.

Reductiva: El fluoróforo, especie aceptora, es excitado y promueve un electrón del HOMO al LUMO. Como se observa en la **Figura 3** el par libre del grupo donador, que se encuentra a mayor energía que el HOMO del fluoróforo, transfiere un electrón a este último. El fluoróforo excitado y reducido transfiere el electrón del LUMO al grupo donador oxidado, lo que conduce a la desactivación no radiante.

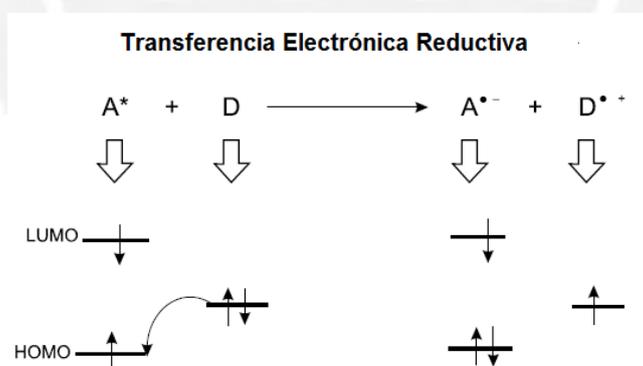


Figura 3. Transferencia electrónica reductiva (adaptado de referencia 26).

Oxidativa: En la **Figura 4** se observa que, en este caso, el fluoróforo es la especie donadora y que al ser excitado, promueve un electrón del HOMO al LUMO. Luego, este electrón es transferido al grupo aceptor lo que conduce a la desactivación del fluoróforo acompañado de un cambio en el estado de oxidación de cada uno. Finalmente, el grupo aceptor transfiere el electrón al fluoróforo y vuelve a su estado basal de menor energía.

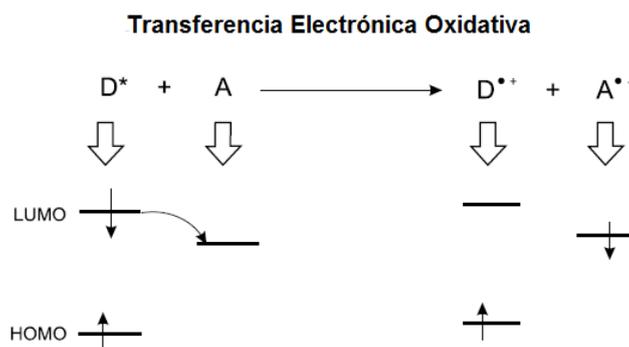


Figura 4. Transferencia electrónica oxidativa (adaptado de referencia 26).

4.2.3.2. Transferencia de carga fotoinducida (PCT)²⁶

Un fluoróforo que contiene un grupo donador conjugado con un grupo aceptor, experimentará una transferencia de carga intramolecular, desde el donante al aceptor, tras la excitación por luz. Cuando un catión interactúa con el grupo donador reducirá el carácter donador de este último, lo cual provocará una desestabilización del momento dipolar en el estado excitado, lo que desplazará a la banda de absorción hacia el azul, acompañado con una disminución en el coeficiente de absorción molar, tal como se observa en la **Figura 5**.

En cambio, si el catión interactúa con un grupo aceptor aumentará el carácter atractor estabilizando el estado excitado, lo que conduce a un desplazamiento del espectro absorción hacia el rojo con el consiguiente aumento en el coeficiente de absorción molar.

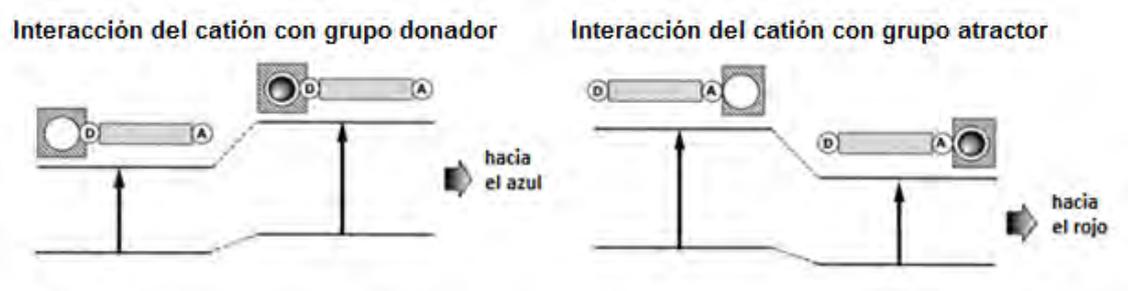


Figura 5. Mecanismo de transferencia de carga fotoinducida (PCT).²⁶

4.2.3.3. Transferencia de energía (ET)²⁷

Consiste en la desactivación no radiante del fluoróforo por transferencia de electrones entre este e iones de metales de transición. En la **Figura 6**, se muestra el mecanismo de desactivación antes mencionado para el caso del Cu^{2+} . El fluoróforo excitado

transfiere el electrón promovido al d semilleno del metal y este, a su vez, transfiere uno de los electrones de su nivel completo a menor energía hacia el HOMO del fluoróforo lo cual conduce a una desactivación no radiante del fluoróforo. Por último, ocurre una estabilización del metal excitado. Este proceso de transferencia de energía es uno de los mecanismos responsables de la ausencia de emisión fluorescente por metales de transición con orbitales d parcialmente llenos.²⁷

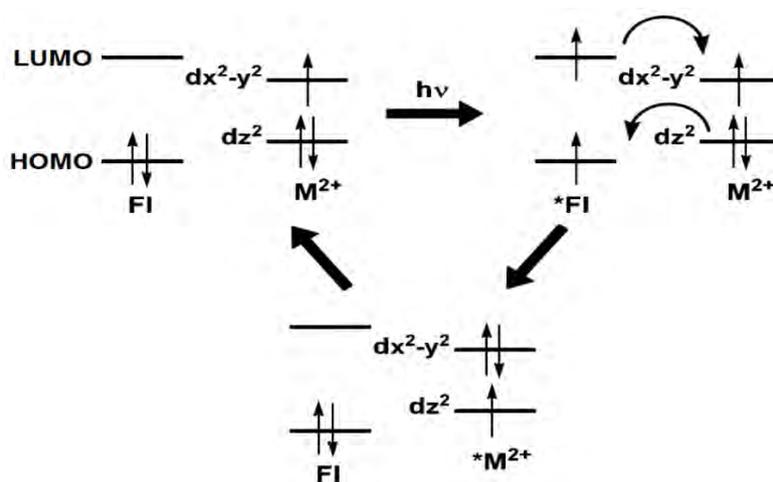


Figura 6. Mecanismo de transferencia de energía para un metal d^9 .²⁷

4.3. SENSORES MOLECULARES FLUORESCENTES

En general, un sensor fluorescente típico contiene un receptor (sitio de reconocimiento) unido a un fluoróforo (fuente de la señal) que permite el reconocimiento del analito mediante una señal fluorescente.⁵ En cuanto a las características de estructura química del componente fluoróforo de un sensor fluorescente, este debe presentar anillos aromáticos condensados que se caracterizan por una baja energía de transición $\pi \rightarrow \pi^*$ y, además, una estructura rígida que disminuye la posibilidad de desactivaciones no radiantes. Asimismo, las características de la señal fluorescente se pueden modular mediante la introducción de sustituyentes apropiados.^{25,26} Entre los diversos sensores fluorescentes que existen, se pueden distinguir tres clases principales de sensores según su mecanismo de respuesta ante la interacción con los analitos de interés.

Clase 1: La intensidad de la emisión fluorescente disminuye y en ciertos casos es totalmente atenuada por choques con el analito (O_2 , Cl^-). En la **Figura 7** se presenta un ejemplo para gases paramagnéticos como el oxígeno, en este caso la colisión provoca un cambio en la multiplicidad de la molécula excitada provocando un entrecruzamiento de sistemas. De esta manera, la especie excitada que se encuentra

en estado *singlete* (S_1) pasa al estado *triplete* (T_1), lo que disminuye la población del S_1 y, por ende, la posibilidad de emisión fluorescente. La disminución en la intensidad de la emisión es un indicativo del contenido de gases paramagnéticos en la muestra.²⁶

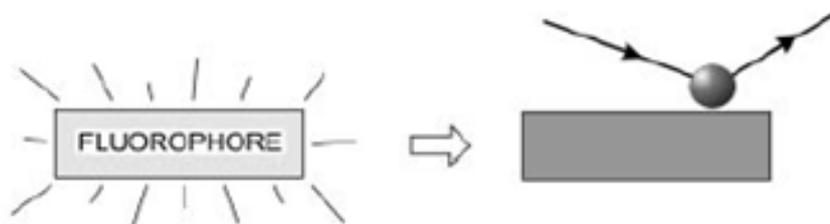
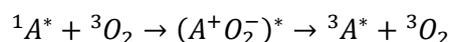


Figura 7. Sensor fluorescente clase 1.²⁶

Clase 2: Los fluoróforos pueden unirse reversiblemente a un analito; si el analito es un protón se denomina indicador fluorescente de pH, en cambio si el analito es un ion se denomina agente quelante fluorescente. En la **Figura 8** se observa que en este tipo de sensores la detección del analito puede ocurrir de dos maneras, por inhibición de la fluorescencia (CEQ) o por inducción de la misma (CEF).²⁶

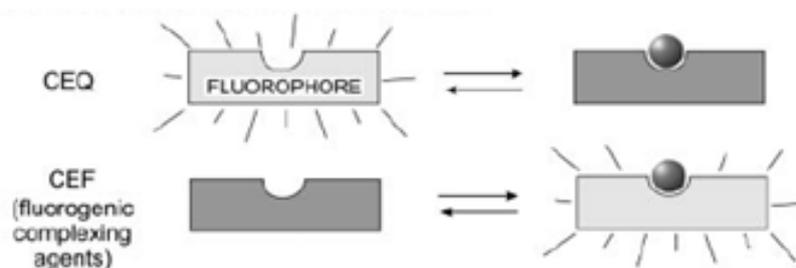


Figura 8. Sensor fluorescente clase 2.²⁶

Clase 3: El fluoróforo se encuentra unido a un receptor, en forma directa o mediante un espaciador. El diseño de estos sensores requiere un cuidado especial para cumplir los criterios de afinidad y selectividad hacia el analito. Como se observa en la **Figura 9** los cambios en las propiedades fotofísicas del fluoróforo se deberán a la interacción entre el analito y el receptor. Estos sensores también pueden ser de dos tipos, CEQ y CEF.²⁶

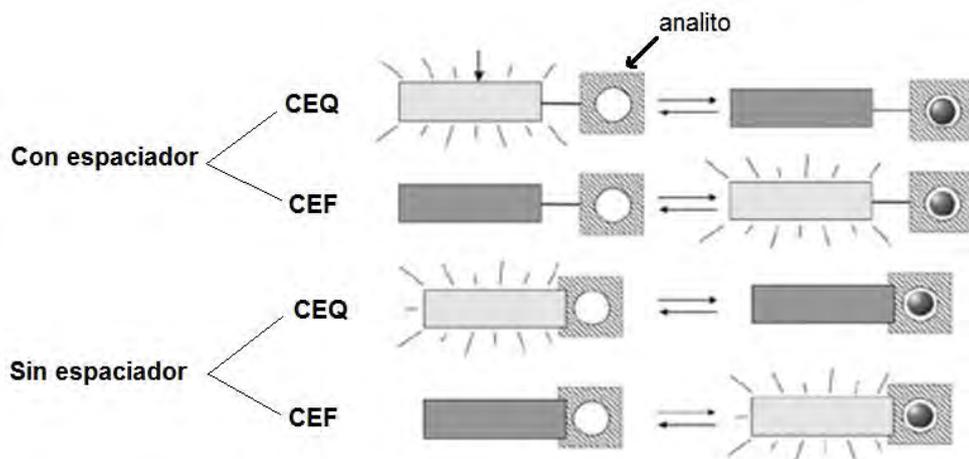


Figura 9. Sensor fluorescente clase 3.²⁶

El diseño particular de un sensor debe estar relacionado con la naturaleza del analito y es deseable que resulte selectivo hacia este para evitar posibles interferencias en el análisis. De esta manera, es posible detectar numerosos analitos químicos y bioquímicos por métodos de fluorescencia: cationes, aniones, moléculas neutras y gases; esto unido a la simplicidad en el análisis, alta sensibilidad y muy bajos límites de detección de esta técnica, ha derivado en una alta demanda en diferentes campos como la química analítica, bioquímica clínica, medicina, medio ambiente, etc. Así, se han diseñado sensores moleculares fluorescentes para aplicaciones particulares y muchos de ellos están disponibles comercialmente.²⁶

En el caso particular de que la aplicación del sensor fluorescente este orientada hacia el campo biológico, se deben tener en cuenta ciertos criterios básicos en lo que respecta a sus propiedades espectrales en el diseño del mismo, a saber:²⁸

- Alta intensidad fluorescente que no comprometa la fotoestabilidad del sistema
- Longitudes de onda de excitación mayores de 340nm, para disminuir el daño celular
- Longitudes de onda de emisión en el rango visible, para facilitar su detección óptica y, también, para evitar posibles interferencias como absorción celular endógena o autoabsorción de biomoléculas como el NADH
- Buena diferenciación entre máximos de excitación y emisión (desplazamiento de Stokes)

En este sentido, las cumarinas ofrecen propiedades fotométricas muy atractivas para su utilización, como componente fluoróforo, de un sensor molecular a nivel biológico. Asimismo, su síntesis accesible y versátil permite su derivatización para incorporar en el diseño del sensor un componente receptor; de esta manera, se podrían modificar no

solo las propiedades espectrales del sensor sino también su afinidad y selectividad por un analito, en este caso del Zn(II).

4.4 CUMARINAS

Las cumarinas, o benzo- α -pironas, son una familia muy grande e importante de compuestos. A partir del descubrimiento de la cumarina en 1820, aislado de una variedad específica de frijol, se han encontrado muchos derivados cumarínicos en una amplia gama de plantas.⁷ Estos compuestos son de reconocido interés farmacológico al presentar actividad antiinflamatoria, antibiótica, anticoagulante, antioxidante, anticancerígena y antidiabética, entre otras.^{29,30}

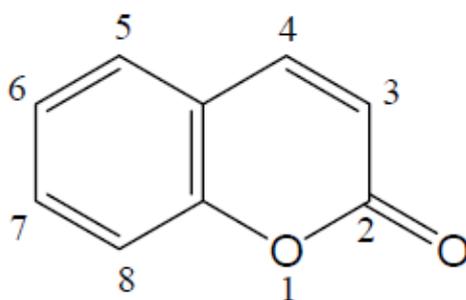


Figura 10. Estructura y numeración de la cumarina.⁷

4.4.1. Cumarinas como fluoróforos

Las cumarinas como clase constituyen uno de los grupos más versátiles y de mayor aplicación comercial de los materiales fluorescentes orgánicos. Estos compuestos exhiben propiedades fotofísicas y espectroscópicas sumamente atractivas entre las que destacan longitudes de onda de excitación/emisión próximas al rango visible o dentro de éste (360-550 nm o aún mayores), buena diferenciación entre los máximos de excitación y emisión, es decir un considerable desplazamiento de Stokes y coeficientes de extinción por encima de $18000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.³¹ Esto ha llevado a que encuentren una amplia aplicación como agentes abrillantadores, colorantes fluorescentes para fibras sintéticas y pigmentos fluorescentes a la luz. También juegan un papel significativo en dispositivos electrofotográficos y electroluminiscentes.²⁸

Estas propiedades están relacionadas con su estructura básica la cual incorpora dos anillos aromáticos fusionados, bencénico y pirona (**Figura 10**), lo que conduce a transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ de relativamente baja energía y da lugar a una estructura rígida que disminuye la posibilidad de desactivaciones no radiantes. Además, son moléculas muy estables y su síntesis es muy accesible y versátil. Esto facilita el diseño de nuevos derivados que permitan extender la deslocalización electrónica y, por tanto, el

rango de emisión a longitudes de onda más largas, además de incrementar la intensidad de la emisión fluorescente.^{7,10,32,33}

Así, por ejemplo, la 7-hidroxycumarina y la 7-metoxicumarina, poseen una intensidad fluorescente superior a la no sustituida, además, un incremento en la polaridad del solvente aumenta la intensidad y desplaza la banda de emisión a longitudes de onda mayores.⁷ Por otro lado, la adición de sustituyentes atractores en la posición 3 también causa el efecto de desplazar la banda de emisión hacia longitudes mayores.^{7,33}

4.4.2. Sensores fluorescentes cumarínicos

Las excelentes propiedades fluorescentes de las cumarinas han propiciado numerosas investigaciones orientadas al desarrollo de una amplia gama de sensores de cationes metálicos,^{7,33} los que incluyen sensores específicos para el Zn(II), metal de interés en este trabajo por su importancia biológica y farmacológica. Muchos de estos sensores incorporan cumarinas como componente fluoróforo y entre ellos destacan los que presentan una muy baja emisión fluorescente en el estado libre, la cual se ve incrementada considerablemente por complejación al metal, efecto conocido comúnmente como **turn on** o **switching on**.

En una revisión realizada por Li y colaboradores se muestran diversos sensores cumarínicos diseñados para la detección de cinc. Los sensores que presentaron mayor intensidad fluorescente fueron aquellos que incorporaban en su diseño un sustituyente donador en la posición 7 y un componente receptor nitrogenado, para que la coordinación al metal sea vía N.³³

Así, entre otros, tenemos que el sensor mostrado en la **Figura 11**, que acopla un componente fluoróforo cumarínico a un receptor di(2-picolil)amina (DPA), exhibe un considerable incremento en la emisión fluorescente por quelación al cinc, aproximadamente 20 veces, resultante de un bloqueo del mecanismo de desactivación PET en el sensor libre. Asimismo, esta emisión fluorescente, se encuentra dentro del rango visible (430 nm) y solo se observó en presencia de Zn²⁺ y en menor medida en presencia de Cd²⁺. Sin embargo, a pesar de presentar la emisión fluorescente dentro del rango visible, la longitud de onda de excitación necesaria fue de 343 nm, lo cual representa una desventaja para su posible aplicación como biosensor. Además, otra desventaja fue que al analizar la competencia del Zn²⁺ con otros iones metálicos la fluorescencia se ve inhibida con Ni²⁺ y Cu²⁺.⁹

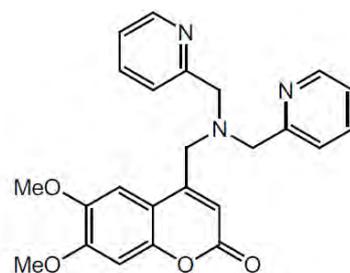


Figura 11. Sensor fluorescente cumarínico, la coordinación al Zn^{2+} ocurre vía DPA.⁹

A semejanza del anterior, en la estructura mostrada en la **Figura 12** también se aprovecha la afinidad del $Zn(II)$ por el grupo DPA para el diseño de un sensor fluorescente, el cual mostró un incremento de 6 veces en su intensidad fluorescente a **450 nm**, tanto para Zn^{2+} como para Cd^{2+} . Al igual que el sensor descrito anteriormente este también presenta una λ_{ex} en el ultravioleta (380 nm).¹⁰

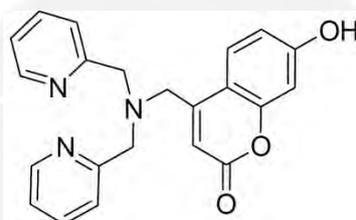


Figura 12. Sensor fluorescente cumarínico con receptor DPA en la posición 4 de la cumarina.¹⁰

Por otro lado, en otro tipo de sensor se aprovecha la fuerte afinidad de las bases de Schiff por el $Zn(II)$ para su uso como componente receptor en el diseño de sensores cumarínicos de este metal. En la **Figura 13** se muestra un quimiosensor de $Zn(II)$ que acopla, en la posición 8 de la cumarina, mediante un enlace $C=N$ a una semicarbazida. En el sensor libre la presencia del par no enlazante del N imino induce el conocido mecanismo de desactivación por PET; al complejar el $Zn(II)$ ocurre un bloqueo de este proceso lo que conduce a un incremento significativo (4 veces) en la intensidad fluorescente. Este sensor resultó selectivo al cinc respecto a una gran variedad de cationes metálicos, tanto de grupos principales como metales de transición del primer período. Con excepción del Ni^{2+} , Co^{2+} y Cu^{2+} , estos metales no interfirieron con el observado aumento de la fluorescencia en presencia del cinc. Cabe mencionar que en este sensor las longitudes de onda de excitación y emisión se encuentran dentro del rango visible, 400 y 450 nm respectivamente. Además, su análisis se realizó en una mezcla etanol/agua 30%,¹⁴ a diferencia de los sensores cumarina-DPA mostrados anteriormente los cuales fueron analizados en metanol puro.

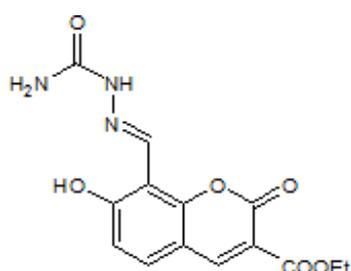


Figura 13. Sensor cumarínico tipo base de Schiff.¹⁴

Asimismo, en otro sensor relacionado con el anterior se incorpora en la posición 8 un componente receptor benzoimidazol (**Figura 14**); en este caso se observa un incremento en 10 veces de la intensidad fluorescente centrada a 443 nm, con una λ_{ex} = 390 nm. Los autores atribuyen este efecto *turn on* a una restricción conformacional que inhibe la isomerización del enlace C=N y que es consecuencia de una coordinación muy efectiva del N imínico, el O⁻ en posición 7 del anillo cumarínico y uno de los N imidazólicos al Zn(II). Este mecanismo de desactivación se considera el predominante en este tipo de bases de Schiff. Respecto a la competencia por el sitio de coordinación entre el Zn²⁺ y otros iones metálicos, salvo en caso de Co²⁺, Ni²⁺ y Cu²⁺, no se observaron interferencias en la emisión fluorescente.¹¹

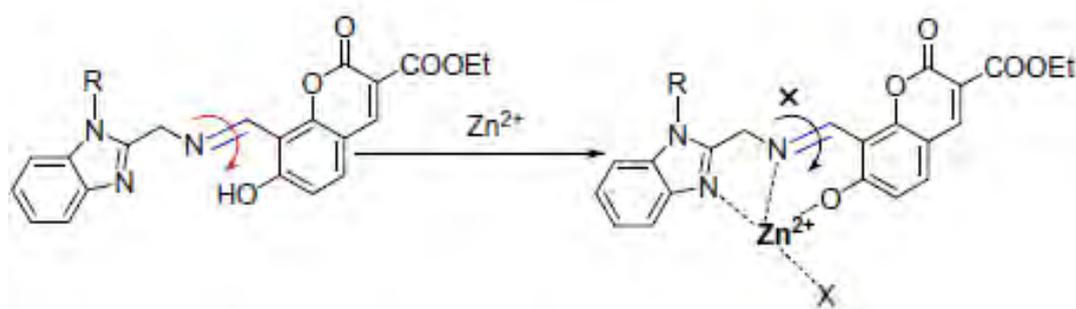


Figura 14. Mecanismo propuesto de la inhibición de la isomerización del enlace C=N por coordinación al Zn²⁺.¹¹

Por otro lado, Yang y colaboradores también aprovechan el efecto del sustituyente hidroxilo en la posición 7, para diseñar un sensor tipo base de Schiff (**Figura 15**) que acopla un receptor de quinolina en la posición 8. El incremento de la intensidad fluorescente por complejación al Zn²⁺ fue de cerca 20 veces; no se observó el mismo efecto en presencia de otros cationes metálicos. La emisión fluorescente se da en la región visible, a 538 nm sin embargo, la longitud de excitación fue de 368 nm y, además, el solvente utilizado para las mediciones fue THF.¹²

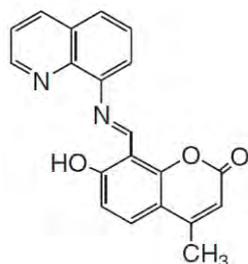


Figura 15. Sensor base de Schiff para Zn(II) con receptor quinolina.¹²

Wang y colaboradores desarrollaron un sensor fluorescente de cinc que acopla una base de Schiff antipirínica en la posición 3 de un derivado cumarínico. La formación del complejo de Zn(II) (**Figura 16**) ocasiona un dramático incremento en la emisión fluorescente la que tiene lugar en el rango visible, a 522 nm a una λ_{ex} de 400 nm; sin embargo, presenta un desplazamiento de **Stokes** de solo 22 nm. La emisión fluorescente es de color verde y se detecta a simple vista. Además, el sensor mostró solo un modesto incremento respecto a otros cationes metálicos del bloque **d** así como con Pb^{2+} , Cd^{2+} y Hg^{2+} . Este efecto **turn on** se debe principalmente a la inhibición en la isomerización del enlace C=N, lo que a su vez es consecuencia de una coordinación muy efectiva del N imínico y el grupo C=O lactónico del anillo cumarínico al Zn(II). Cabe mencionar que las mediciones fueron realizadas con acetonitrilo como solvente.

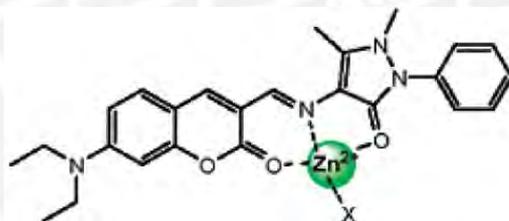


Figura 16. Fluorescencia por restricción conformacional en un complejo de Zn (II).¹⁵

En otro sensor, reportado por Xi y colaboradores, cumarínico 7-hidroxi sustituido del tipo **turn on**, se incorpora un componente receptor base de Schiff fenólico en la posición 3 del anillo cumarínico. Este sensor (**Figura 17**) mostró al complejarse al Zn(II) una emisión fluorescente a **540 nm**, aproximadamente 20 veces más intensa que aquella extremadamente muy débil del ligando. En contraste, otros iones metálicos mostraron una emisión muy débil (Cd^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+}) o ausencia de la misma (Na^+ , K^+ , Mn^{2+} , Fe^{3+} , Co^{2+} , Ni^{2+} y Cu^{2+}); sin embargo, no se estudió la interferencia de todos estos iones metálicos en el efecto **turn on** del Zn(II). Cabe mencionar que este sensor se deriva de una cumarina R-amino sustituida y no de una R-formil como los sensores bases de Schiff descritos anteriores, pero a semejanza de ellos su baja solubilidad solo permite su análisis en un solvente orgánico como acetonitrilo.

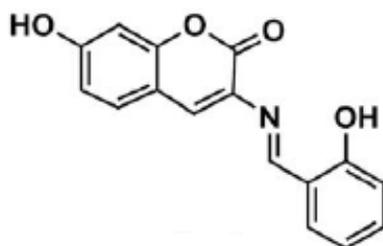


Figura 17. Sensor base de Schiff cumarínico derivado de la 7-metoxi-3-aminocumarina.¹⁶

Recientemente, se ha desarrollado un sensor cumarínico altamente sensible y selectivo que incorpora a una quinolina en la posición 3 mediante un enlace C=N. Este sensor (**Figura 18**) fluorescente exhibe un pronunciado efecto *turn on* por complejación al Zn^{2+} , con un incremento en la intensidad de 40 veces. La emisión fluorescente tiene lugar a **427 nm** con una $\lambda_{ex}=338$ nm. Este sensor mostró especificidad por el Zn^{2+} en presencia de una variedad de cationes metálicos, los que incluyen al Co^{2+} , Ni^{2+} y Cu^{2+} que por su configuración *d* incompleta normalmente inhiben la fluorescencia en este tipo de ligandos. Las mediciones se realizaron en una mezcla CH_3CN/H_2O 1:1 a un pH de 7.2 usando una solución buffer de HEPES.¹³

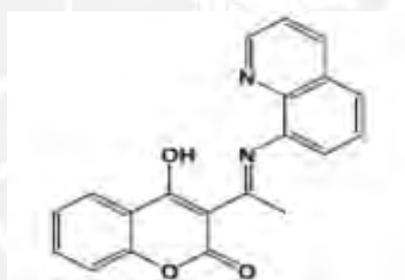


Figura 18. Sensor cumarínico que incorpora una quinolina en la posición 3.¹³

Cabe resaltar, que si bien los sensores cumarínicos bases de Schiff mostrados anteriormente presentan buena selectividad por el $Zn(II)$, los análisis se tuvieron que realizar en solventes orgánicos o en una mezcla acuosa con una proporción máxima de 50% de agua. Esto dificultaría una posible aplicación de estos sensores a nivel biológico.

Si bien el mecanismo de desactivación por isomerización del enlace C=N ha sido la base para el diseño de numerosos sensores fluorescentes, aún no se ha logrado esclarecer de qué manera desactiva a la molécula. En una investigación desarrollada por Johnson y colaboradores se propone que la isomerización se debe a la rotación de la forma protonada de la imina. Como se muestra en la **Figura 19**, la imina protonada es atacada por un nucleófilo (contraíón del ácido) lo que provoca la formación de un

intermediario tetraédrico. Este último sufre una “estereomutación” y posterior pérdida del nucleófilo dando el otro estereoisómero.³⁴

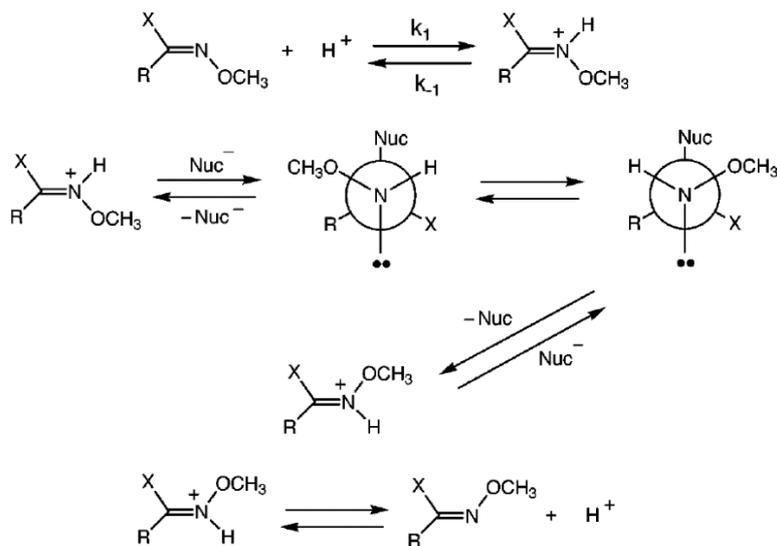


Figura 19. Mecanismo propuesto para la isomerización del enlace C=N.³⁴

Por otro lado, Traven y colaboradores estudian este mecanismo presente en las bases de Schiff cumarínicas derivadas de la 8-formil con un sustituyente hidroxilo en la posición 7. Los autores proponen que la isomerización involucra un equilibrio ceto-enólico desde la forma *E*-(hidroxil)imina a *Z*-(hidroxil)imina, tal como se muestra en la **Figura 20**.³⁵

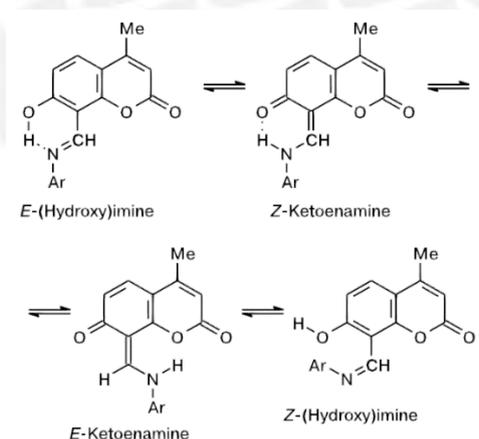


Figura 20. Mecanismo de isomerización del enlace C=N que involucra un equilibrio ceto-enólico.³⁵

4.5. ESTEQUIOMETRÍA DE COMPLEJOS EN SOLUCIÓN. MÉTODO DE JOB.

En los estudios de sensores fluorescentes de zinc y otros metales, los complejos a analizar se sintetizan *in situ* para las mediciones y normalmente no se aíslan cristales.

Por esta razón, usualmente solo se llega a una propuesta estructural razonable a partir de información estequiométrica. En ese sentido, resulta conveniente en los casos en que la complejación promueva la fluorescencia, aplicar el método de Job para determinar la relación molar ligando/metal (**Figura 21**) del complejo formado en solución.^{14, 36, 37}

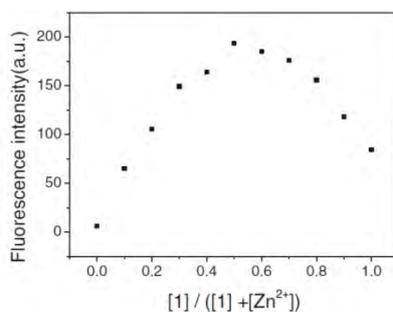


Figura 21. Método de Job para un complejo Zn(II) 1:1.¹⁴

En algunos de los sensores cumarínicos revisados anteriormente, los autores determinan por el método de Job la estequiometría de sus complejos formados *in situ*. En los casos en el que el fluorosensor cumarínico incorpora en su estructura un componente receptor DPA en la posición 4, la estequiometría del complejo formado es 1:1.^{9, 10} En el caso de las bases de Schiff cumarínicas uno de los sitios de coordinación clave es el N imino y si este se ubica en la posición 8 del anillo cumarínico y está presente un sustituyente OH en la posición 7, ambos formarían parte de la esfera de coordinación. En este tipo de sensores el complejo formado presenta una estequiometría 1:1, y se propone que la tercera y cuarta posición la ocupan un grupo donador del receptor y un contraión o molécula del solvente respectivamente.^{11, 14} Una excepción es el sensor reportado por Yang, el cual también presenta tres posibles sitios de coordinación, pero se ha determinado una estequiometría 2:1.¹²

Por otro lado, para aquellos sensores cumarínicos del tipo base de Schiff que incorporan el grupo imino en la posición 3 se han reportado estequiometrías 1:1 y 2:1.^{13, 15, 16, 38} Wang propone una geometría tetraédrica para la estequiometría 1:1, la cuarta posición estaría ocupada por un contraión o molécula de solvente.¹⁶ Por otra parte, Mondal y colaboradores proponen, para una estequiometría 2:1, una geometría octaédrica con un ligando tridentado monoaniónico, la cual se sustenta en una modelación computacional.¹³

5. HIPÓTESIS

A partir de lo discutido en el problema de investigación, se propone que los sensores bases de Schiff cumarínicos sintetizados muestren el efecto **turn on** en presencia de Zn^{2+} . Esta hipótesis se basa en el hecho de que al acoplar en la posición 3 del fluoróforo cumarínico un derivado del salicilaldehído como componente receptor, se tendría un ligando bidentado el cual coordinaría al Zn^{2+} vía el N imínico y el OH desprotonado del receptor, e incluso uno tridentado si además el C=O lactónico adyacente al enlace C=N participa en la coordinación. En ambos casos, la coordinación al metal conduciría a la restricción de los mecanismos de desactivación no radiantes usuales en las bases de Schiff, isomerización del enlace C=N y PET.

Asimismo, el anillo bencénico del componente receptor, unido por un enlace imino a la cumarina en la posición 3, permitiría extender la conjugación de esta última, lo cual causaría un desplazamiento de las longitudes de onda de excitación y emisión fluorescente hacia el rojo. Este efecto se vería complementado por el sustituyente donador metoxi en la posición 7 del anillo cumarínico, que además de producir un efecto batocrómico en las λ_{ex} y λ_{em} , incrementaría la intensidad fluorescente.⁷ De esta manera, se lograrían λ_{ex} dentro del rango visible, las que resultarían convenientes para una posible aplicación a nivel biológico de los sensores, dado que se minimizaría el riesgo de daño celular por radiación UV. Asimismo, λ_{em} lo más cercanas al rojo evitarían una posible absorción celular endógena o eventual autofluorescencia de ciertas biomoléculas presentes como tirosina ($\lambda_{abs}=275$ nm; $\lambda_{em}=303$ nm), triptofano ($\lambda_{abs}=280$ nm; $\lambda_{em}=348$ nm), ADH ($\lambda_{abs}=340$ nm; $\lambda_{em}=435$ nm).³⁹ Por último, cabe la posibilidad de usar un medio principalmente acuoso para las mediciones de fluorescencia lo que también favorecería su desarrollo posterior en biosensores.

Por otra parte, para una potencial aplicación de los sensores de cinc a nivel biológico, el efecto **turn on** debe ser selectivo para el Zn(II) y no tener lugar en presencia de otros cationes metálicos presentes en el organismo como Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , entre otros. En caso de los cationes metálicos del bloque s como Na^+ , K^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} que se encuentran en mayores concentraciones, estos no coordinarían a los ligandos en cuestión.³³ Por otro lado, en lo que respecta a la complejación del sensor a iones de metales de transición, que sí podrían ser afines al sitio de coordinación que ofrecen estos ligandos como Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} y Cu^{2+} , se espera que la fluorescencia se vea inhibida. Esto se debe a que presentan capas *d* parcialmente llenas, lo que conduce a una rápida y eficiente desactivación no radiante de los estados excitados por transferencia de energía entre dichos cationes metálicos y el fluoróforo.^{14,16,33} Por

último, en lo que respecta al Cd^{2+} , del mismo grupo y configuración d^{10} que el cinc, se ha observado que en ciertos casos presenta un efecto **turn on** de intensidad variable y en ocasiones incluso ausente.

En lo que se refiere a la interferencia de los cationes antes mencionados sobre la intensidad fluorescente del complejo de Zn^{2+} formado en solución, se espera que los cationes de los metales del bloque **s** no interfieran en la fluorescencia. En el caso de los metales de transición, como se ha descrito en la parte teórica para sensores relacionados, el efecto de estos es bastante variable, por tanto, es pertinente analizar su comportamiento con estos ligandos en particular.

Finalmente, para proponer una posible estructura del complejo fluorescente, se determinará la estequiometría del complejo formado en solución por el método de Job por fluorescencia. Se espera una estequiometría ligando/metál 2:1 dada la similitud estructural de los sensores propuestos con aquellos vistos en la parte teórica que presentan esta misma estequiometría.



6. METODOLOGÍA

El siguiente proyecto de investigación se dividirá en dos etapas. La primera consistirá en la síntesis y caracterización de los ligandos tipo base de Schiff derivados de la 3-aminocumarina, así como del precursor acetoamido. La segunda etapa consistirá en la evaluación fotométrica, por espectroscopías de absorción UV-Vis y fluorescencia, de los ligandos en presencia de Zn(II) y de otros metales para observar el efecto *turn on* esperado y la selectividad hacia el Zn(II).

6.1. EQUIPOS, REACTIVOS Y SOLVENTES

6.1.1. Equipos

Espectroscopía Infrarroja: Los espectros fueron medidos en el espectrofotómetro FT-IR Perkin Elmer modelo Spectrum 100 de la Sección Química - PUCP en un intervalo de $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$. Las muestras se prepararon en pastillas de KBr.

Resonancia Magnética Nuclear: Se utilizó el espectrómetro Bruker Avance III-HD Ascend 500 NMR de la Sección Química - PUCP. Las muestras se disolvieron en DMSO deuterado y se empleó tetrametilsilano (TMS) como estándar interno.

Espectrometría de masas: Las gráficas se obtuvieron empleando el espectrómetro de masas cuadrupolar en tándem Quatro Premier™ XE de la Sección Química – PUCP. La generación de los iones fue por aerosol Z-Spray™. Para la obtención de los espectros se disolvió la muestra en acetonitrilo grado masas.

Espectroscopía Ultravioleta-Visible: Los datos se registraron empleando el Espectrofotómetro UV-Visible Agilent modelo 8453 de la Sección Química - PUCP en un rango de 190 a 1000 nm. Las muestras se disolvieron en una mezcla DMF/HEPES 10% para su respectiva medición.

Fluorescencia: Los espectros de emisión fueron medidos en el espectrofluorímetro Perkin Elmer modelo LS - 55 de la Sección Química – PUCP en un rango de 400 - 700 nm con longitudes de onda de excitación entre 400 y 500 nm. Las muestras se prepararon en una mezcla DMF/HEPES 10%.

6.1.2. Reactivos

Nombre	Proveedor
2-hidroxi-4-metoxi-benzaldehído para síntesis $\geq 98\%$	Sigma-Aldrich
2-hidroxi-5-metoxi-benzaldehído para síntesis $\geq 98\%$	Sigma-Aldrich
2-hidroxi-benzaldehído para síntesis $\geq 98\%$	Sigma-Aldrich

N-acetilglicina para síntesis $\geq 98\%$	Sigma-Aldrich
Acetato de sodio anhidro $\geq 99\%$	Sigma-Aldrich
Acetato de cinc anhidro	Sigma-Aldrich
Carbonato de sodio	Merck
Cloruro de cobre dihidratado	Merck
Cloruro de níquel hexahidratado	Merck
Cloruro de cobalto hexahidratado	Merck
Cloruro de manganeso tetrahidratado	Merck
Cloruro de magnesio hexahidratado	Merck
Cloruro de calcio	Merck
Cloruro de potasio	Merck
Cloruro de sodio	Merck
Cloruro de cadmio	Merck
Sulfato de hierro amonio hexahidratado	Merck
Acetato de cinc dihidratado	Merck
Acido 4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazina-etanosulfónico (HEPES)	Sigma-Aldrich

6.1.3. Solventes

Nombre	Proveedor
Anhidrido acético	Sigma-Aldrich
Ácido Clorhídrico concentrado	Merck
Acetato de etilo	J.T. Baker
Etanol p.a.	J.T. Baker
N,N-Dimetilformamida	J.T. Baker
Dimetilsulfóxido deuterado	Merck
Agua Milli-Q	PUCP

6.2. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LOS LIGANDOS

Para la síntesis de los precursores cumarínicos y de los ligandos se seguirán dos rutas de síntesis reportadas. No obstante, se variarán las condiciones de síntesis para mejorar el rendimiento debido a que para el precursor acetoamido solo se reporta un 20% de rendimiento. La caracterización de los precursores y los ligandos se realizará por FTIR (%T) y RMN (^1H y ^{13}C).

6.2.1. Precursor 7-metoxi-3-acetamidocumarina (Prec-3AA)

La síntesis se basa en el método reportado por Kudale y colaboradores con algunas modificaciones.⁴⁰ A una mezcla de 6.5 mmol de 4-metoxi-salicilaldehído, 13 mmol de N-acetilglicina y 26 mmol de acetato de sodio se le agrega 2 mL de anhídrido acético, y se calienta hasta 120°C. Durante el calentamiento se tritura la mezcla de reactivos y una vez alcanzada la temperatura de reflujo se deja bajo agitación por 3 horas. Durante la reacción, se observa un cambio progresivo de color, que va de amarillo a

naranja para, finalmente, adquirir una coloración marrón muy oscura. Al término de la reacción, la mezcla caliente se vierte sobre agua helada y se tritura la masa resultante hasta obtener una suspensión fina. Se filtra al vacío y se lava con agua helada. El sólido marrón obtenido se deja secar al aire por algunas horas, y luego se tritura con acetato de etilo. Se filtra al vacío y se lava con acetato de etilo y etanol hasta obtener un sólido amarillo pálido. En la **Figura 22** se muestra el esquema de síntesis para este precursor.

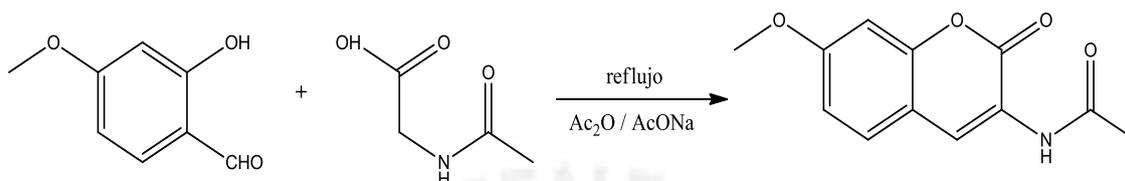


Figura 22. Esquema de síntesis del precursor 7-metoxi-3-acetoamidocumarina.

6.2.2. Síntesis del precursor 7-metoxi-3-aminocumarina (Prec-3^a)

El método de síntesis (**Figura 23**) se basa en el reportado por Connor y colaboradores con ligeras modificaciones.⁴¹ En un balón se suspende 1 mmol del precursor Prec-3AA con 5 mL de HCl concentrado a una temperatura de 100°C y bajo agitación constante por una hora. Durante la reacción se observa una disolución progresiva del sólido y un cambio de coloración desde amarillo pálido hasta un marrón verdoso. La solución se vierte en un vaso y se deja enfriar en baño de hielo, para luego neutralizar con una solución de carbonato de sodio (25%). Finalmente se filtra al vacío y se lava con agua.

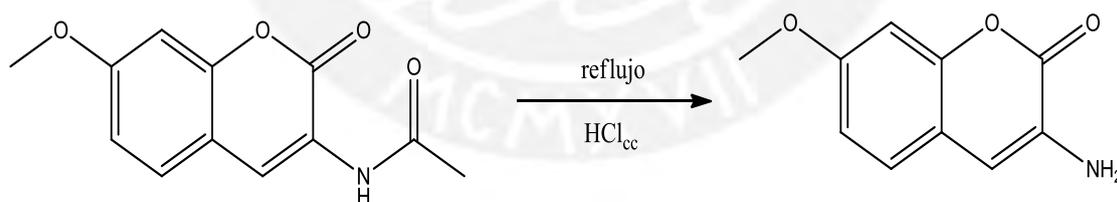


Figura 23. Esquema de síntesis del precursor 7-metoxi-3-aminocumarina.

6.2.3. Síntesis de los ligandos bases de Schiff cumarínicos^{16,42}

La síntesis de los tres ligandos se basó en la combinación de dos procedimientos de síntesis reportados para compuestos análogos.^{16, 42} En un balón se disuelve 3 mmol de 7-metoxi-3-aminocumarina en 3 mL de etanol a 70°C. Luego, se le agrega 3 mmol de salicilaldehído, o el derivado correspondiente, según el caso, disuelto en 3 mL de etanol y la mezcla de reacción se mantiene bajo calentamiento y agitación agita por 2 horas. La precipitación de la base de Schiff se inicia casi de inmediato. Al término de la

reacción, la mezcla se deja enfriar al aire, se filtra al vacío y el producto se lava con etanol. El sólido obtenido se conserva dentro de un desecador al vacío.

En la **Figura 24** se muestra el esquema de síntesis para los tres ligandos propuestos, así como las sustituciones que presentarán cada uno de ellos.

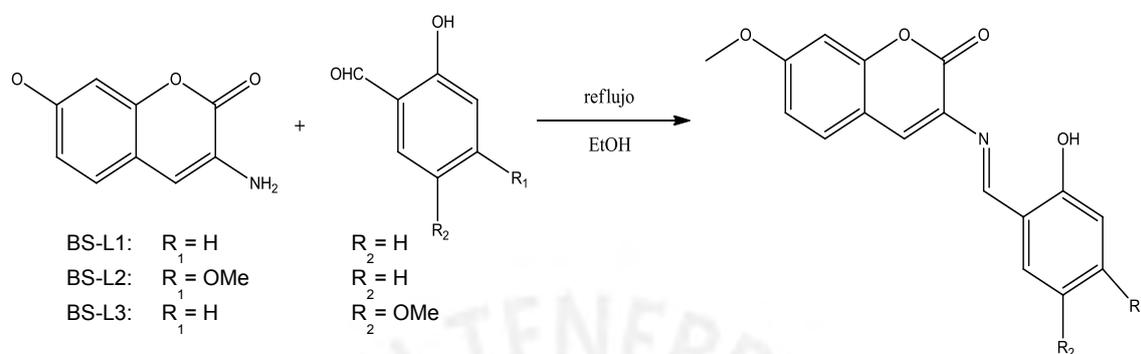


Figura 24. Esquema de síntesis de los ligandos.

6.3 ANÁLISIS ESPECTROFOTOMÉTRICO DE LOS LIGANDOS³³

6.3.1. Mediciones de absorción UV-Vis

Todas las mediciones de los espectros de absorbancia UV-Vis se realizan en una mezcla de una solución buffer 25 mM de ácido 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazina-etanosulfónico (HEPES) y N,N-dimetilformamida (DMF) en una proporción v/v 9:1. El uso de la solución buffer responde a la necesidad de mantener un pH 7.5 – 8 el cual favorece la desprotonación del OH fenólico del ligando base de Schiff.

Las mediciones se realizan en la región comprendida entre 250 y 700 nm a 20°C; se trabajó cubetas de cuarzo de 1 mL y de 1 cm de paso óptico.

6.3.1.1. Mediciones de los ligandos y complejos de Zn(II)

Se preparan soluciones 1 mM en DMF de cada uno de los tres ligandos, así como de dos sales de cinc, cloruro y acetato.

Para la obtención de los espectros UV-Vis de los ligandos se toman alícuotas de 30 a 60 uL y se completan a 100 uL con DMF; luego se diluyen con la solución buffer de HEPES hasta un volumen de 1 mL. De esta manera, se mantiene en todos los casos la proporción DMF/HEPES 1:9.

Para la obtención de los espectros UV-Vis de los complejos de cinc se toman alícuotas de 30 a 60 uL de la solución de cada ligando, 15 a 30 uL de solución de Zn^{2+} y se completan a 100 uL con DMF; luego se diluyen con la solución buffer de HEPES hasta

un volumen de 1 mL. De esta manera, se mantiene una proporción ligando/metalo 2:1 y DMF/HEPES 1:9.

Asimismo, para determinar los valores de los coeficientes de absorividad molar de las bandas presentes en los espectros UV-Vis, se aplicó la Ley de Beer-Lambert:

$$A = \epsilon bc$$

En donde **b** es la longitud el camino óptico (1 cm), **A** es la absorbancia, a una longitud de onda seleccionada, a diferentes concentraciones (**c**) de ligando, o complejo según sea el caso. Se grafica la absorbancia vs la concentración (M) y a partir la pendiente de esta recta determinaría el valor de absorividad molar ϵ ($M^{-1}cm^{-1}$).

6.3.1.2. Mediciones de los ligandos en presencia de otros iones metálicos

Al igual que para los complejos de Zn(II), se preparan soluciones 1 mM de los cloruros de cada metal a excepción del hierro, en el cual se utilizó como fuente del metal la sal de Mohr. Para el caso de los metales Mg, Mn, Co, Ni, Cu y Cd las soluciones fueron preparadas en DMF, y por otro lado, para el caso del Na, Ca y Fe fueron soluciones acuosas debido a problemas de solubilidad en DMF.

Para obtener los espectros UV-Vis de los ligandos en presencia de los iones divalentes de Mg, Mn, Co, Ni, Cu y Cd se toma una alícuota de 60 uL de la solución de ligando y 30 uL de solución de cada metal que se completan a 100 uL con DMF, y se diluyen con la solución buffer hasta un volumen de 1 mL.

Por otro lado, en caso de los metales Na, Ca y Fe, se toma una alícuota de 60 uL de la solución de ligando en DMF y se completa a 100 uL con DMF. Luego, se agrega una alícuota de 30 uL de solución acuosa M^{2+} y se completa hasta 1 mL con la solución buffer, de tal manera que se mantenga la proporción DMF/HEPES 1:9.

6.3.2. Mediciones de emisión fluorescente

Al igual que para las mediciones de absorción UV-Vis, la adquisición de los espectros de emisión de los ligandos libres, en presencia de Zn^{2+} y de otros iones metálicos se realiza en una mezcla de una solución buffer 25 mM de HEPES y DMF en una proporción v/v 9:1.

Las mediciones se realizan en la región comprendida entre 400 y 700 nm, a 20°C, con un ancho de rendija de excitación de 15 nm y de emisión de 20 nm; se usan cubetas de vidrio de 1 mL y 1 cm de paso óptico. Las λ_{ex} se encuentran entre 400 y 500 nm.

6.3.2.1. Mediciones de los ligandos y complejos de Zn(II)

Se preparan soluciones de los tres ligandos base de Schiff y de cloruro de cinc en DMF, a una concentración de 0.1 mM. Para la obtención de los espectros de emisión de los ligandos se toma una alícuota de 66 uL de la solución que se lleva a 100 uL con DMF y, luego se diluye con la solución buffer de HEPES hasta un volumen de 1 mL.

Para cada ligando se registra el espectro de emisión a diferentes longitudes de onda de excitación, en el rango 400 a 500 nm. Para el caso de los complejos de Zn(II) se toma una alícuota de 67 uL de la solución de ligando y se le añaden 33 uL de la solución de Zn²⁺ y se diluye con la solución buffer de HEPES hasta un volumen de 1 mL.

Los barridos a diferentes longitudes de onda de excitación, tanto de los ligandos libres como de sus correspondientes complejos de Zn(II), se realizan con el fin de determinar a qué longitudes de onda de excitación (λ_{ex}) se observa el mayor incremento de la intensidad de la emisión fluorescente del complejo respecto al ligando libre (efecto *turn on*).

6.3.2.2. Mediciones de los ligandos en presencia de otros iones metálicos

Para estas mediciones se sigue un procedimiento similar al descrito para las de UV-Vis. Así, se preparan soluciones de las sales de cada metal en el solvente apropiado (DMF o agua), pero esta vez con una concentración de 0.1 mM. Se toma una alícuota de 66 uL de ligando y 33 uL de la solución M²⁺ y se diluye con la solución buffer hasta un volumen de 1 mL. La adquisición de los espectros de emisión se realiza a las longitudes de onda de excitación determinadas anteriormente para el Zn(II).

Para la evaluación de la competencia entre el Zn²⁺ y los iones metálicos divalentes de Mg, Mn, Co, Ni, Cu y Cd, se toma una alícuota de 50 uL de ligando, 25 uL de Zn²⁺ y 25 uL de M²⁺ que se diluye a un volumen de 1 mL con la solución buffer. En caso de los metales Na, Ca y Fe, se toma 50 uL de solución de ligando y 25 uL de solución de Zn²⁺ que se completan a 100 uL con DMF. Luego, se toma 25 uL de solución acuosa de estos iones metálicos y se lleva a un volumen de 1 mL con la solución buffer. Los espectros de emisión se obtienen a una longitud de onda de excitación λ_{ex} previamente determinada para cada uno de los complejos de Zn(II).

6.3.2.3. Mediciones del precursor 7-metoxi-3-aminocumarina

Se prepara una solución 0.1 mM de precursor en DMF. Para la obtención de los espectros de emisión se toma una alícuota de 66 uL y se completa a 100 uL con DMF; luego, se diluye con la solución de HEPES hasta un volumen final de 1 mL.

Se registra los espectros de emisión variando λ_{ex} de 300 a 450 nm para determinar la longitud de onda de emisión del precursor.

6.3.3. Determinación de la estequiometría de los complejos en solución

Para determinar la estequiometría del complejo en solución se utiliza el método de Job por fluorescencia, el cual aplicado a complejos de coordinación consiste en medir la intensidad fluorescente a diferentes fracciones molares del ligando. Luego se grafica la siguiente relación:

$$I - I_0 \text{ vs } \frac{[L]}{[L] + [Zn^{2+}]} \quad (1)$$

donde I representa la intensidad fluorescente del ligando en presencia de Zn^{2+} para una determinada fracción molar del mismo e I_0 aquella del ligando en ausencia del ion metálico para una concentración molar equivalente.

Para realizar las mediciones se utilizan soluciones 0.1 mM en DMF de cada ligando y de Zn^{2+} , y a diferencia de los casos anteriores, aquí el volumen de la cubeta de trabajo es de 3 mL. Para determinar los valores de I , a diferentes fracciones molares, se toman alícuotas de las soluciones de ligando y de Zn^{2+} , y se diluyen hasta un volumen de 3 mL con la solución buffer, tal y como se muestra en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Volúmenes utilizados para determinar los valores de I .

	X_0	V_L (uL)	V_{Zn} (uL)	V_{HEPES} (uL)
I	1.00	300	0	2700
	0.92	275	25	
	0.83	250	50	
	0.75	225	75	
	0.67	200	100	
	0.58	175	125	
	0.50	150	150	
	0.42	125	175	
	0.33	100	200	
	0.25	75	225	
	0.17	50	250	
	0.08	25	275	
	0.00	0	300	

Por otro lado, como se observa en la **Tabla 1**, para determinar los valores de I_0 se procede de manera similar que en el caso anterior, pero en este caso, se sustituye la alícuota de la solución de Zn^{2+} por DMF.

Tabla 2. Volúmenes utilizados para determinar los valores de I_0 .

	X_0	V_L (uL)	V_{DMF} (uL)	V_{HEPES} (uL)
I_0	1.00	300	0	2700
	0.92	275	25	
	0.83	250	50	
	0.75	225	75	
	0.67	200	100	
	0.58	175	125	
	0.50	150	150	
	0.42	125	175	
	0.33	100	200	
	0.25	75	225	
	0.17	50	250	
	0.08	25	275	
	0.00	0	300	

Al graficar (1) se observa un máximo valor para $I-I_0$, el cual indica la relación molar entre el ligando y Zn^{2+} propia del complejo formado. El valor teórico de la fracción molar para un complejo 1:1 es de 0.5 y para un complejo 2:1 es de 0.67.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 PROCESOS DE SÍNTESIS

7.1.1. Síntesis del precursor 7-metoxi-3-acetoamidocumarina (Prec-3AA)

Para la síntesis del precursor acetilado, 7-metoxi-3-acetoamidocumarina, se ensayaron dos métodos de síntesis reportados; el primero para el compuesto precursor en cuestión,⁴⁰ y el segundo para un compuesto análogo, la 7-hidroxi-3-acetoamidocumarina.¹⁶ Los dos procedimientos se basan en la condensación de la N-acetilglicina (**N-Agly**) y 4-metoxi-salicilaldehído (**sustrato**), en presencia de acetato de sodio como base. En ambos procedimientos se utilizó anhídrido acético como solvente a la temperatura de reflujo, 120°C aproximadamente. El tiempo de reacción, así como el procesamiento posterior del producto y el rendimiento obtenido en los ensayos exploratorios se muestran en la **Tabla 3**. El rendimiento mostrado para el método N°1 fue el promedio de 10 ensayos, en cambio para el método N°2 fue de solo 3 ensayos.

Tabla 3. Procedimientos de síntesis para el precursor **Prec-3AA**.

N°	Sustrato	N-Agly	Solvente	Base	Tiempo	Procesamiento	Rendimiento
1	3.25 mmol	3.25 mmol	1.5 mL	13 mmol	3.5 h	- Enfriar al aire. - Triturar con agua helada y filtrar. - Triturar con acetato de etilo y filtrar.	20%
2	1 mmol	1 mmol	10 mL	6 mmol	8h	Verter sobre agua helada y filtrar.	5%

El primer método utilizado fue el reportado por Kudale y colaboradores, sin embargo, a pesar de que se siguió exactamente el procedimiento descrito, inicialmente no se pudo lograr el mismo rendimiento; además, el color del sólido obtenido era marrón pálido, diferente al amarillo pálido reportado por los autores. Después de varios intentos se determinó la conveniencia de triturar los sólidos durante el calentamiento de la mezcla de reacción para lograr la homogenización de los reactivos. Este cambio condujo a un incremento sustancial en el rendimiento y finalmente se pudo obtener la coloración y rendimiento reportados para el producto final. Cabe mencionar que, en la etapa de procesamiento del producto se optó por verter directamente la mezcla de reacción caliente sobre el agua helada, con el fin de facilitar el triturado; este cambio no afectó el rendimiento final.

A diferencia del primer método, en el segundo reportado por Xi y colaboradores, se trabajó con los reactivos en solución y a baja concentración; sin embargo, si bien se

obtuvo el producto puro este presentaba una coloración marrón oscura y el rendimiento fue demasiado bajo.

Por lo tanto, se optó por seleccionar el procedimiento usado por Kudale que conduce a un producto puro con menor tiempo de reacción y menor cantidad de solvente. Esto último resulta conveniente, puesto que el anhídrido acético es un producto controlado en el Perú y se presentan dificultades para su importación. Con el fin de examinar la posibilidad de aumentar el rendimiento, se realizaron algunas variaciones en los parámetros de síntesis, las cuales se presentan en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Ensayos de síntesis realizados para el precursor **Prec-3AA**.

Ensayo	Sustrato	N-Agly	Solvente	Base	Tiempo	Rendimiento	Color
1	3.25 mmol	3.25 mmol	1.5 mL	13 mmol	3 h	20%	Amarillo Pálido
2	3.25 mmol	3.25 mmol	1.5 mL	13 mmol	5 h	15%	Marrón Pálido
3	6.5 mmol	6.5 mmol	3 mL	26 mmol	3 h	20%	Amarillo Pálido
4	6.5 mmol	13 mmol	3 mL	26 mmol	3 h	37%	Marrón Pálido
5	6.5 mmol	13 mmol	3 mL	26 mmol	3 h	35%	Amarillo Pálido
6	6.5 mmol	13 mmol	2 mL	26 mmol	3 h	40%	Amarillo Pálido
7	6.5 mmol	13 mmol	2 mL	32 mmol	3 h	40%	Amarillo Pálido
8	6.5 mmol	19.5 mmol	2 mL	26 mmol	3 h	30%	Marrón Pálido

En la **Tabla 4** se puede observar que el reducir ligeramente el tiempo de reacción (**ensayo 1**) no afectó en el rendimiento ni en la apariencia física del producto. Sin embargo, al incrementarlo a 5 horas, en el **ensayo 2**, el rendimiento disminuyó y el sólido mostró señales de impurezas, tanto a la vista como en el espectro $^1\text{H-RMN}$. Posteriormente, al escalar la reacción al doble, pero sin variar el tiempo de reacción respecto al primer ensayo 1, el rendimiento final se mantuvo.

En el **ensayo 4** se probó incrementar la cantidad de N-acetilglicina en un equivalente adicional, lo que condujo a un considerable incremento en el rendimiento. Sin embargo, el producto obtenido presentó algunas impurezas. Es por esto que, a partir del **ensayo 5**, se introdujo un lavado adicional con etanol, lo que, si bien redujo ligeramente el rendimiento, permitió obtener el producto puro. Por otro lado, en el

ensayo 6, se redujo el volumen de solvente lo que elevó aún más el rendimiento (40%). Finalmente, en los **ensayos 7 y 8** se probó incrementar la cantidad de base y N-acetilglicina respectivamente; en el primer caso el cambio no repercutió en el rendimiento final y, en el segundo, se observó la disminución del mismo. De esta manera se estableció como parámetros de reacción los utilizados en el **ensayo 6**.

7.1.2 Síntesis del precursor 7-metoxi-3-aminocumarina (Prec-3A)

Para la síntesis del precursor 7-metoxi-3-aminocumarina, se ensayaron tres procedimientos de síntesis. El primero reportado para este mismo compuesto por Connor y colaboradores,⁴³ el segundo reportado por Xi y col. para la 7-hidroxi-3-aminocumarina,¹⁶ y finalmente, el tercero reportado por Ravinder para la 3-aminocumarina.⁴³ Los tres procedimientos se basan en la hidrólisis en medio ácido del precursor 7-metoxi-3-acetoamidocumarina. Los parámetros de síntesis particulares de cada uno de ellos, así como sus respectivos rendimientos se muestran en la **Tabla 5**. Los rendimientos mostrados fueron el promedio de tres ensayos para cada procedimiento.

Tabla 5. Procedimientos de síntesis para el precursor **Prec-3A**.

N°	Sustrato	Solvente	Tiempo	Temp	Procesamiento	Rendimiento
1	1 mmol	6 mL HCl	40 min	100 °C	Enfriar en hielo Recristalizar MeOH	80%
2	1 mmol	4 mL HCl + 2 mL EtOH	2 h	100 °C	Verter en 5 mL agua helada Neutralizar NaOH (30%) pH =5 - 6	-
3	1 mmol	5 mL Ac. Acético + 5 mL H ₂ SO ₄ (50%)	45 min	60 °C	Neutralizar NaHCO ₃ Recristalizar EtOH	20%

En el **ensayo 1**, si bien se obtuvo un alto rendimiento este resultó menor que el reportado por Connor (88%) y, además, y la coloración de los cristales obtenidos fue amarillo pálido diferente de la marrón reportada por el autor. No obstante, el espectro ¹H-RMN de estos cristales mostró que se trataba del producto puro. En cambio, el **ensayo 2**, no dio un resultado positivo, pues no se logró aislar ningún producto. En el **ensayo 3**, se obtuvieron cristales amarillo pálido como en el **ensayo 1**; sin embargo, el rendimiento fue muy bajo. En este caso se pudo demostrar, por ¹H-RMN, que el producto obtenido luego de la neutralización era puro, por lo que resultaba innecesario recristalizar.

Por tanto, se optó por seleccionar el procedimiento desarrollado por Connor al que se le introdujeron algunas variaciones. La principal consistió en incluir un paso adicional de neutralización de la mezcla de reacción final no considerado por el autor. En la **Tabla 6**, se muestran los cambios realizados; en todos los ensayos la temperatura de reacción fue de 100°C y la mezcla final se enfrió en hielo antes de la neutralización.

Tabla 6. Ensayos de síntesis realizados para el precursor **Prec-3A**.

N°	Sustrato	Solvente	Tiempo	Procesamiento	Rendimiento
1	1 mmol	6 mL HCl	40 min	Neutralizado NaHCO ₃ (20%)	80%
2	1 mmol	6 mL HCl	40 min	Neutralizado NaOH (30%)	-
3	1 mmol	6 mL HCl	40 min	Neutralizado NaOH (20%)	-
4	1 mmol	6 mL HCl	1 h	Neutralizado NaHCO ₃ (20%)	88%
5	1 mmol	6 mL HCl	1 h	Neutralizado Na ₂ CO ₃ (25%)	90%
6	1 mmol	5 mL HCl	1 h	Neutralizado Na ₂ CO ₃ (25%)	98%

En el **ensayo 1**, tomando como referencia el método reportado por Ravinder, se decidió neutralizar la mezcla final de reacción, con el fin de determinar si era posible la obtención del producto puro sin que se requiera la recristalización. El resultado fue un producto amarillo pálido sin señales de impurezas en el espectro ¹H-RMN. Por esta razón se incluyó en adelante este paso en el procesamiento de la mezcla de reacción, pero introduciendo sucesivas variaciones en la naturaleza y concentración de la base utilizada. Los **ensayos 2 y 3** en que se utilizó NaOH dieron resultados negativos; por esta razón en el ensayo 4 se volvió a utilizar NaHCO₃, pero se aumentó el tiempo de reacción con lo que se logró obtener el rendimiento reportado. Por un hecho fortuito, en el **ensayo 5** se reemplazó, con buen resultado, el NaHCO₃ por Na₂CO₃ y finalmente, utilizando esas mismas condiciones pero trabajando a mayor concentración se alcanzó un altísimo rendimiento.

Cabe resaltar que, si bien el proceso de síntesis para la obtención del precursor 7-metoxi-3-aminocumarina ya se encontraba reportado por Kudale,³⁸ este consistía en tres pasos de síntesis debido a que, los autores planteaban que podría existir una hidrólisis del grupo acetamido a hidroxilo. Sin embargo, esta hipótesis fue rechazada porque a pesar de utilizar HCl concentrado, el rendimiento de la hidrólisis fue cuantitativo.

Por último, cabe mencionar que Kudale y colaboradores reportaron otro método para obtener este mismo compuesto, el cual consta de dos pasos de síntesis partiendo de la 7-metoxi-3-acetoamidocumarina. Estos autores plantean que es necesario recurrir a un grupo protector voluminoso en el N de la posición 3 para evitar así la hidrólisis del grupo acetoamido a hidroxilo. Con este fin derivatizan este N, mediante un procedimiento largo y tedioso, que incluye el di-*ter*-butil-dicarbonato entre otros reactivos no convencionales para luego hidrolizarlo en una mezcla de ácido trifluoroacético/cloroformo. El rendimiento global es de 21% y en ambos pasos se requiere de una purificación por cromatografía de columna.

En este sentido, este trabajo resulta en un aporte para la obtención de la 7-metoxi-3-aminocumarina a partir de la 7-metoxi-3-acetoamidocumarina en un solo paso con un rendimiento del 98%, no observándose la formación del producto 3-hidroxi sustituido reportado por dichos autores. Además, en la síntesis del precursor acetoamido de este compuesto se logró duplicar el rendimiento reportado. De esta manera, en el presente trabajo se ha obtenido un rendimiento global del compuesto amino, a partir de la 4-metoxi-salicilaldehído y la N-acetilglicina, del 39% en una síntesis de dos pasos versus solo el 4% reportado por Kudale en su síntesis de 3 pasos.

7.1.3 Síntesis de los ligandos

Para la síntesis de los ligandos tipo base de Schiff derivados de la 7-metoxi-3-aminocumarina se ensayaron dos procedimientos de síntesis reportados para ligandos análogos. El primero reportado por García-Beltrán y colaboradores para la 7-hidroxi-3-(4-hidroxi-salicildeneamino)cumarina.⁴⁴ y el segundo reportado por Xi y colaboradores para la 7-hidroxi-3-(salicildeneamino)cumarina.¹⁶ Ambos se basan en una reacción de condensación entre el grupo amino de la cumarina y el grupo aldehído del derivado salicílico en medio etanólico a temperatura de reflujo y solo se diferencian en la concentración de los reactivos.

Cabe mencionar, que si bien ya estaba reportado un método de síntesis específico para el ligando no sustituido en el componente salicílico, la 7-metoxi-3-(salicildeneamino)cumarina (**BS-L1**), este implicaba del uso de cloroformo como solvente y de una recristalización en benceno, para obtener un rendimiento final del 60%.⁴⁶ Por esta razón se optó por ensayar los dos métodos antes mencionados con el fin de encontrar un método más “ecoamigable” y eventualmente con un mejor rendimiento. En la **Tabla 7** se muestran los parámetros utilizados para los dos métodos de síntesis reportados, los cuales fueron ensayados para la síntesis del primer ligando, **BS-L1**. Los rendimientos mostrados son un promedio de 5 ensayos.

Tabla 7. Procedimientos de síntesis para el ligando 7-metoxi-3-(salicildeneamino)cumarina, (**BS-L1**).

N°	Sustrato 1	Sustrato 2	Solvente	T _{rx}	Rendimiento
1	3 mmol	3 mmol	1 mL	2 h	80%
2	3 mmol	3 mmol	6 mL	4 h	75%

Como se puede observar se obtuvo un mayor rendimiento por el primer procedimiento, reportado por García-Beltrán. Sin embargo, con el fin de evaluar una posible mejora del rendimiento se introdujeron algunos cambios en la cantidad de solvente utilizado, los cuales se muestran en la **Tabla 8**. Se encontró que el rendimiento aumentaba a 88% (**ensayo 3**), al utilizar una combinación de ambos métodos (6 mL de etanol y 2 horas de reacción). Por último, en el **ensayo 4**, en lugar de agregar el solvente a la mezcla de reactivos, se disolvieron ambos por separado y se añadió la solución del salicilaldehído a la de cumarina, lo que condujo a un incremento ulterior del rendimiento.

Tabla 8. Procedimientos de síntesis para el ligando 7-metoxi-3-(salicildeneamino)cumarina.

N°	Sustrato 1	Sustrato 2	Solvente	Rendimiento
1	3 mmol	3 mmol	1 mL	80%
2	3 mmol	3 mmol	3 mL	85%
3	3 mmol	3 mmol	6 mL	88%
4	3 mmol	3 mmol	6 mL	92%

Los parámetros de síntesis optimizados del ensayo 4 fueron empleados con éxito para la síntesis de las otras dos bases de Schiff, la 7-metoxi-3-(4-metoxi-salicildeneamino)cumarina y la 7-metoxi-3-(5-metoxi-salicildeneamino)cumarina; se obtuvieron rendimientos similares al del primer ligando, 95% y 92% respectivamente.

7.2. CARACTERIZACIÓN

7.2.1. Precursor 7-metoxi-3-acetoamido-cumarina

Espectroscopía Infrarroja

En el espectro infrarrojo del precursor 7-metoxi-3-acetoamido-cumarina (Prec-3AA) mostrado en la **Figura 25** se pueden observar las fuertes bandas de absorción correspondientes a las vibraciones de estiramiento del N-H amido a 3350 cm^{-1} y del C=O lactónico a 1708 cm^{-1} . Asimismo, el espectro presenta dos intensas bandas características de las vibraciones de estiramiento $\nu_{\text{C=O}}$ amida I y de flexión $\delta_{\text{N-H}}$ amida II a 1678 y 1529 cm^{-1} respectivamente. Por otro lado, las bandas de mediana intensidad a 1625 y 1614 cm^{-1} son asignables a estiramientos C=C del anillo cumarínico, mientras que aquellas a 1241 , 1157 y 1109 cm^{-1} corresponden a los estiramientos C-O lactónico y del sustituyente metoxi.

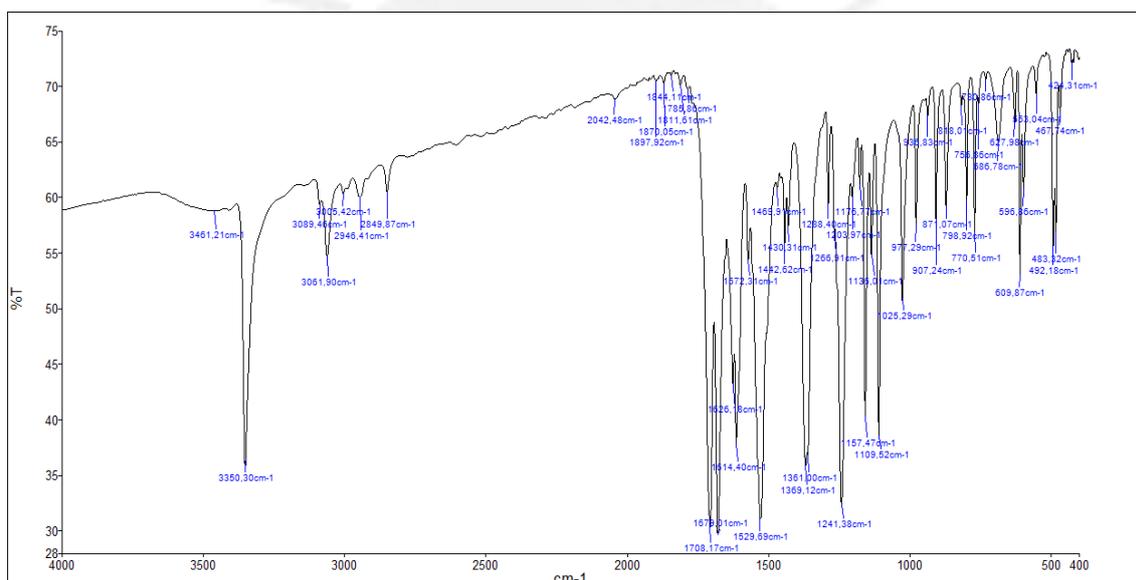


Figura 25. Espectro IR del precursor 7-metoxi-3-acetoamido-cumarina.

Espectroscopía de Resonancia Magnética nuclear

Como se observa en la **Figura 26** el espectro de resonancia magnética nuclear ^1H -RMN del precursor 7-metoxi-3-acetoamido-cumarina muestra la típica señal singlete del hidrógeno en la posición 4 del anillo cumarínico, el cual se encuentra a campo más bajo (8.55 ppm) que el resto de hidrógenos aromáticos (7.64 - 6.93 ppm). Esto se debe a su cercanía al grupo acetoamido, el cual por ser un pobre donador de electrones ejerce un efecto apantallante modesto que contrasta con aquel mucho más pronunciado del grupo metoxi. Por otro lado, el hidrógeno N-H amido se ubica a

campo más bajo (9.64 ppm) que el resto de los hidrógenos cumarínicos. Para poder diferenciar este último del H-4 se utilizó la técnica HSQC (**Figura 27**) que permitió determinar la posición de cada uno.

La asignación completa de las señales del **Prec-3AA** se logró mediante la observación de la multiplicidad de cada señal y el cálculo de las constantes de acoplamiento (J en Hz). Dadas las posiciones relativas de los hidrógenos presentes en el anillo bencénico, es posible observar acoplamientos característicos del tipo orto y meta (6-10 y 1-3 Hz, respectivamente), lo que facilita la asignación de las señales en los espectros.

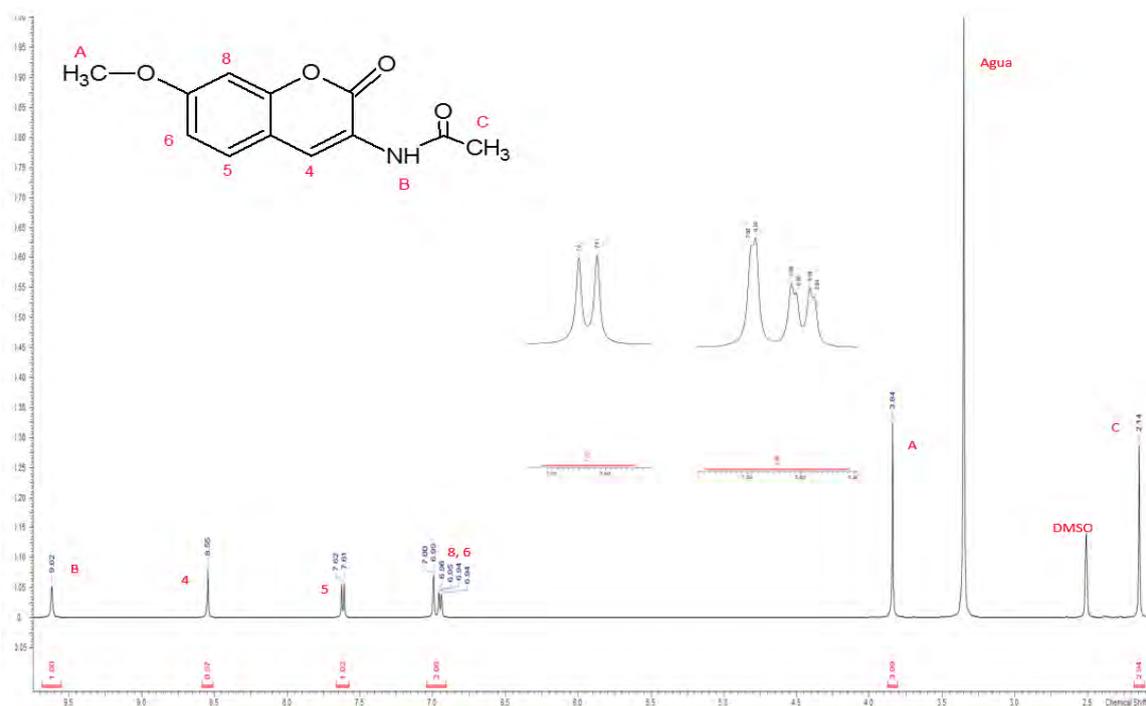


Figura 26. Espectro $^1\text{H-RMN}$ del precursor 7-metoxi-3-acetamidocumarina.

Otro aspecto que resaltar es que el sustituyente donador en la posición 7 facilita aún más la asignación de los hidrógenos cumarínicos al limitar estos acoplamientos y desplazar a campo alto algunas señales, en relación con las de una cumarina no sustituida en el anillo bencénico, en la cual ocurre superposición de señales. Así, se aprecian señales bien diferenciadas para los tres protones del anillo bencénico, un doblete bien definido a 7.6 ppm para el H-5 ($J_{\text{orto}} = 8.54$ Hz), un doblete con una constante de acoplamiento más pequeña ($J_{\text{meta}} = 8.54$ Hz) a 7.0 ppm y un doblete de dobletes para el H-6 que presenta acoplamientos orto y meta.

La asignación de ambos grupos metilo fue sencilla ya que, como era de esperar el singleto del grupo metoxi se encuentra desplazado a campo más bajo (3.83 ppm) que aquel del grupo acetoxi (2.14 ppm).

En lo que respecta al espectro de ^{13}C -RMN, fue posible observar las señales de los 12 carbonos presentes en el compuesto. Dos de estas señales, las que corresponden a los carbonos de los grupos metilo del sustituyente metoxi y acetamido se ubican a campo alto, mientras que el resto pertenecientes a los carbonos aromáticos de la cumarina y el C=O del sustituyente acetamido en la posición 3 están a campo bajo. Para la completa asignación de cada una de estas señales se utilizaron las técnicas bidimensionales HSQC y HMBC-RMN. A continuación, se muestra cómo se asignaron las señales de todos los carbonos aplicando dichas técnicas.

Primero se analizó el espectro HSQC-DEPT (**Figura 27**) mediante el cual se logró asignar las señales a 129.25, 125.47, 113.24 y 100.96 ppm a los carbonos en las posiciones 5, 4, 6 y 8 respectivamente de la cumarina; aquellos a 56.31 y 24.3 corresponden a los metilos del grupo metoxi y acetoxi respectivamente.

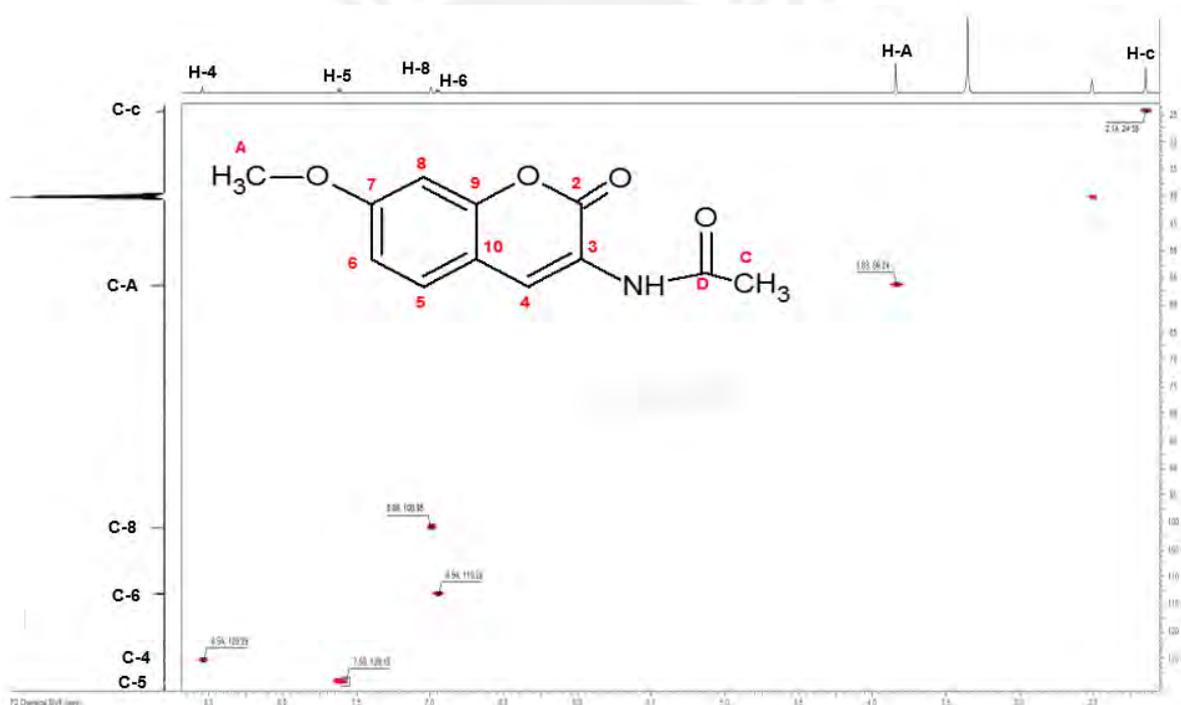


Figura 27. Espectro ^1H - ^{13}C HSQC-DEPT del precursor 7-metoxi-3-acetoamidocumarina.

El siguiente paso es analizar el espectro ^1H - ^{13}C HMBC (**Figura 28**), donde se pueden observar las múltiples correlaciones entre carbonos e hidrógenos separados hasta por tres enlaces. Cabe resaltar que, al tratarse de cumarinas, se pueden observar

Como se observa en la **Figura 27 y 28**, la señal a 170.37 ppm corresponde al C=O del grupo acetoamido, puesto que sólo presenta correlación con los protones N-H y del metilo de dicho grupo. La señal a 161.26 ppm se asigna al carbono en la posición 7 debido a que correlaciona con los hidrógenos H-8, H-6 y H-5 y con aquellos del grupo metoxi; el enlace al átomo de oxígeno del C-7 justifica su ubicación a campo tan bajo.

Por otro lado, la señal a 158 ppm correlaciona con los protones N-H y H-4; esto unido a su desplazamiento obtenido a campo bajo permite asignarlo a campo bajo permite asignarlo al C=O lactónico. La señal a 122.31 ppm, que solo correlaciona con el H-4 se asigna al C-3.

Finalmente, las señales a 151.77 y 113.13 ppm presentan correlaciones con los mismos protones (H-4, H-5, H-8 y H-6); sin embargo, la cercanía al oxígeno lactónico del C-9 lo desplaza hacia campo mucho más bajo y permite diferenciarlo del C-10.

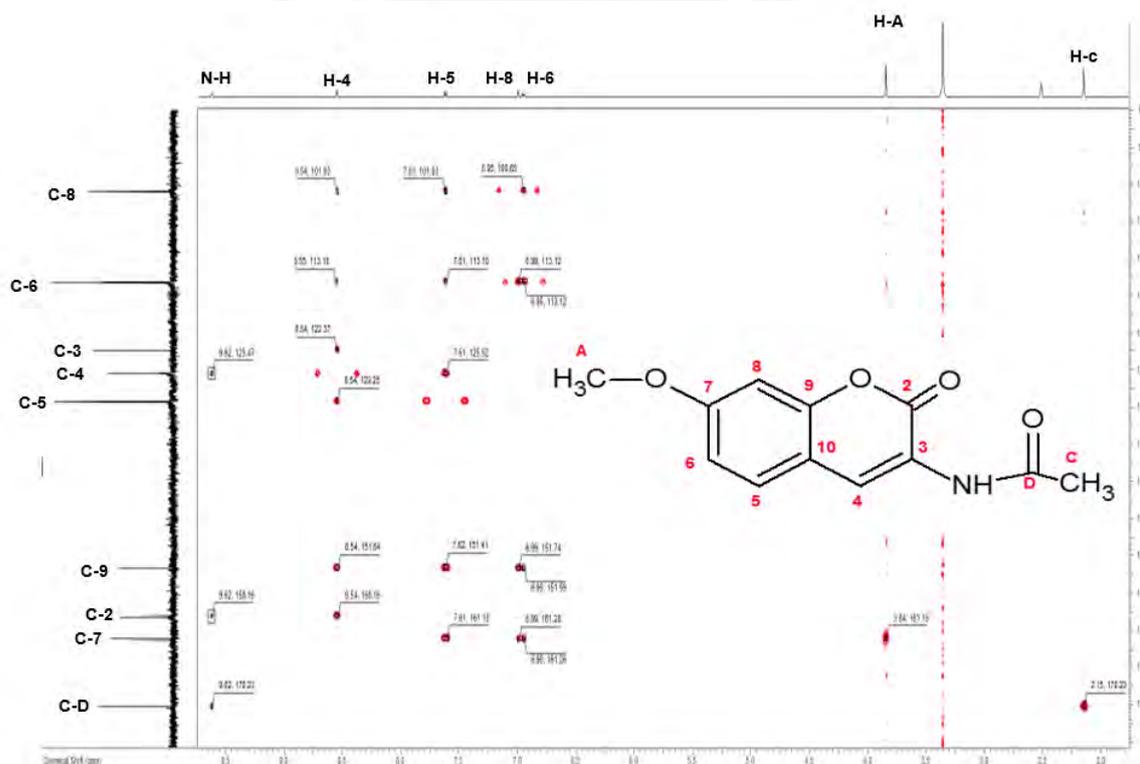


Figura 28. Espectro ¹H-¹³C HMBC del precursor 7-metoxi-3-acetoamidocumarina.

7.2.2. Precursor 7-metoxi-3-aminocumarina

Espectroscopía Infrarroja

En el espectro IR de la 7-metoxi-a-aminocumarina mostrado en la **Figura 29** se observan las bandas correspondientes a las vibraciones de estiramiento simétrica y

asimétrica de la amina primaria a 3420 y 3324 cm^{-1} respectivamente. La aparición de estas bandas unida a la desaparición de las intensas bandas $\nu\text{C}=\text{O}$ amida I y $\delta\text{N-H}$ amida II presentes en la correspondiente acetoamida constituyen evidencia de que la hidrólisis de esta última ha sido completa (**Figura 30**). En el rango de 1650 a 1500 cm^{-1} se pueden observar cuatro bandas de intensidad media propias de los modos vibracionales $\nu\text{C}=\text{C}$ de la cumarina. Finalmente, entre 1260-1100 aparecen varias bandas que corresponden a estiramientos C-O lactónico y del grupo metoxi.

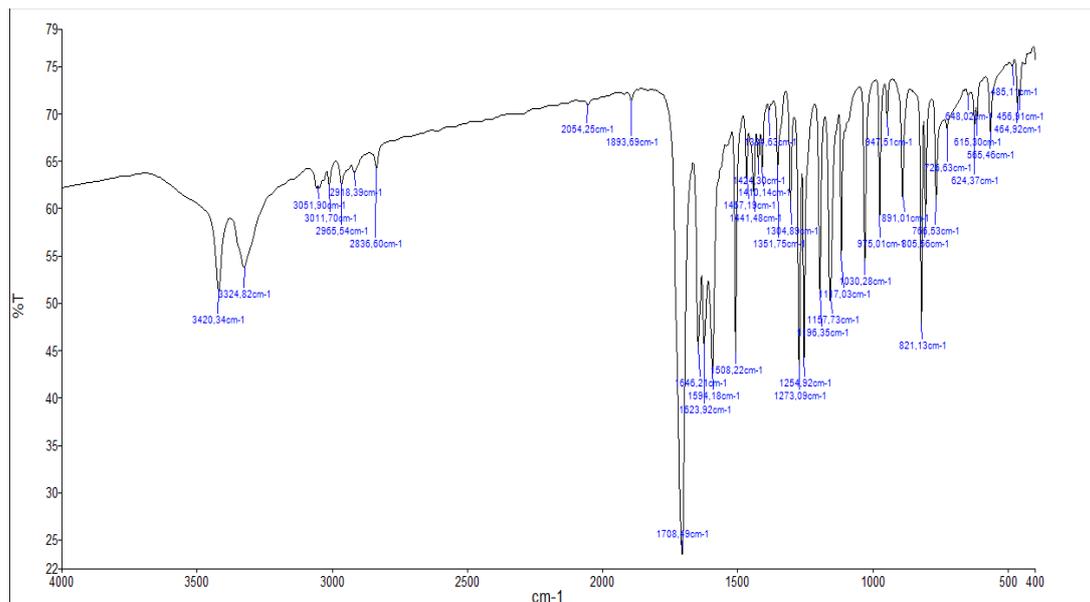


Figura 29. Espectro IR del precursor 7-metoxi-3-aminocumarina.

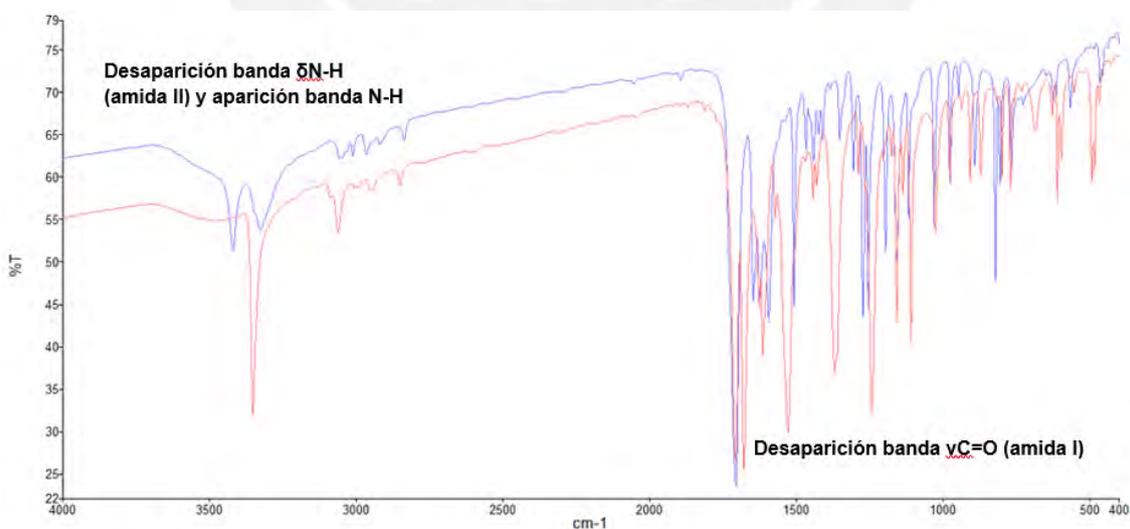


Figura 30. Espectro IR comparativo del precursor 7-metoxi-3-acetoamidocumarina y 7-metoxi-3-aminocumarina.

Espectroscopía de Resonancia Magnética nuclear

En caso del precursor 7-metoxi-3-amino-cumarina la asignación se simplifica respecto a aquella de la correspondiente acetoamida. Como se observa en la **Figura 31** la señal correspondiente al N-H amido a 9.25 ppm desaparece y en su lugar aparece un singlete a 5.36 ppm correspondiente al grupo amino. De igual manera se observa la desaparición del singlete del grupo acetoxi en campo alto.

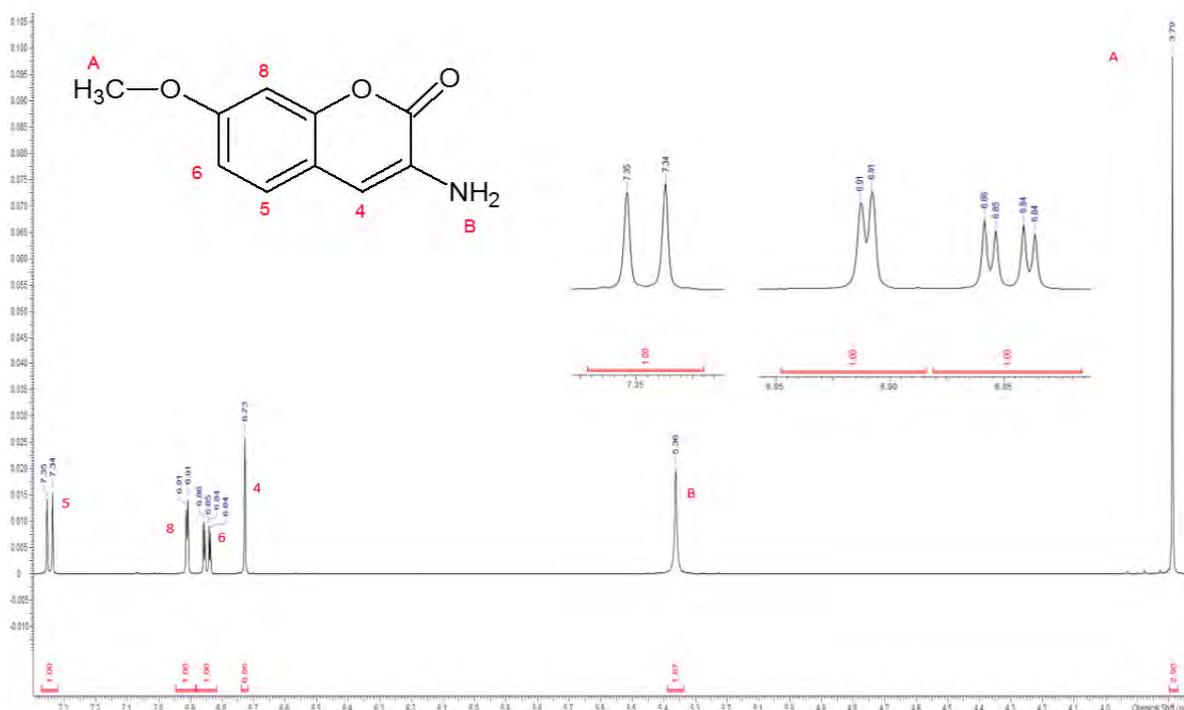


Figura 31. Espectro ¹H-RMN del precursor 7-metoxi-3-aminocumarina.

Es pertinente comentar que la hidrólisis del sustituyente acetoamido genera cambios en los desplazamientos de los hidrógenos. En la **Tabla 9** se puede observar que el H-4 se desplaza fuertemente ($\Delta=1.82$ ppm) hacia campo alto cuando el grupo acetoamido es hidrolizado a NH₂; este último es un donador mucho más potente lo que aumenta la densidad electrónica en el C-4 por efecto de resonancia y, en consecuencia, el H-4 es apantallado con mayor intensidad. En cambio, el desplazamiento de los protones bencénicos hacia campo alto es modesto en caso del H-5, por su conjugación al grupo amino, y muy pequeño para el H-6 y H-8.

Tabla 9. Datos ^1H -RMN para los precursores en d^6 -DMSO.

Precursor	Señal ^1H -RMN: δ ppm, multiplicidad J (Hz)						
	H-4	H-5	H-6	H-8	7-OCH ₃	N-H	3-CH ₃
Prec-3AA	8,55; s	7.62; d $J = 9$	6.95; dd $J = 9/3$	7.0; d $J = 3$	3,83; s	9.62; s	2.14; s
Prec-3A	6.73; s	7.34; d $J = 9$	6.85; dd $J = 9/3$	6.91; d $J = 3$	3.76; s	5.36; s	-

Leyenda: s, singlete; d, doblete; dd, doblete de dobletes.

El espectro ^{13}C muestra las señales de los 10 carbonos, la del metilo a campo alto y todas las demás señales correspondientes a los carbonos aromáticos a campo bajo. La asignación completa se realizó por las técnicas anteriormente mencionadas y desarrollando un análisis similar al del precursor acetoamido. Los espectros bidimensionales se encuentran en el **Anexo 12.3**.

La técnica HSQC-DEPT (**Figura 32**) permitió asignar fácilmente las señales de los carbonos correlacionados a hidrógenos por solo un enlace.

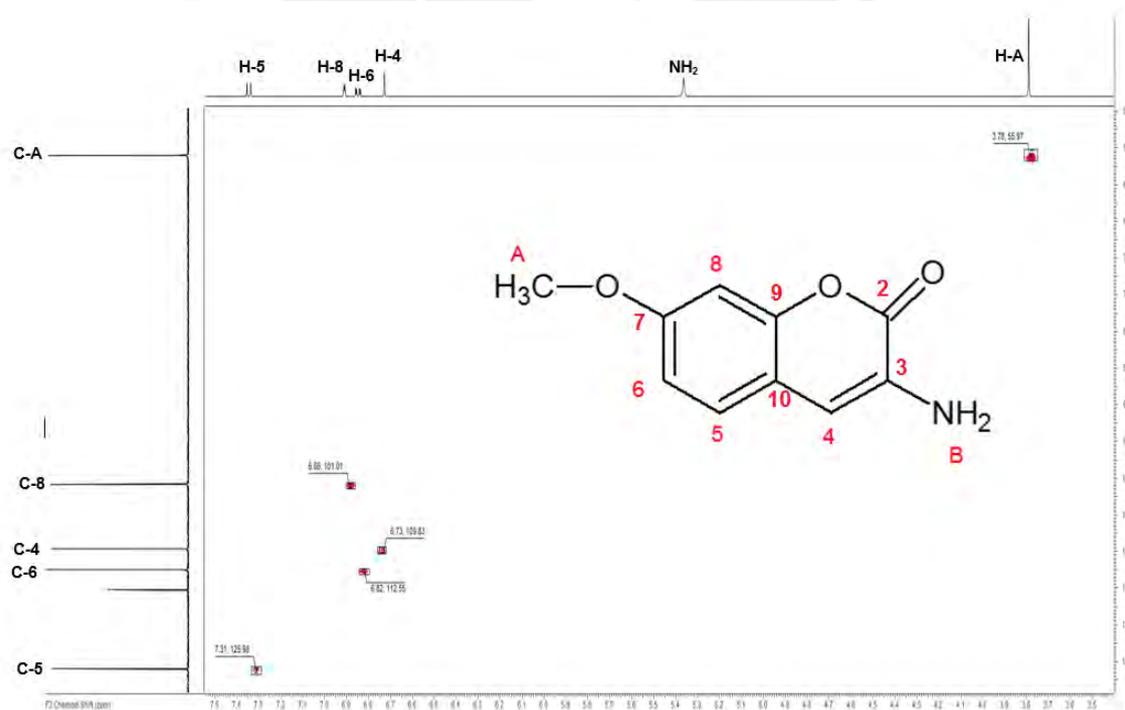


Figura 32. Espectro ^1H - ^{13}C HSQC-DEPT del precursor 7-metoxi-3-aminocumarina.

Por otro lado, gracias al análisis HMBC (**Figura 33**) se lograron correlacionar también los carbonos e hidrógenos más distantes entre sí. A semejanza de lo que se observó en el precursor acetoamido, el C=O lactónico solo presenta correlación con los protones de la amina secundaria y el H-4. La señal a 158.21 ppm se asigna al C-7 por las correlaciones que presenta con los hidrógenos aromáticos y el metilo del grupo metoxi. Las señales a 149.61 y 115.28 ppm presentan correlaciones con los mismos hidrógenos, por lo que sería lógico afirmar que se tratarían de los carbonos C-9 y C-10 respectivamente. Por último, el carbono a 131.38 ppm solo correlaciona con el hidrógeno H-4 y se asigna al C-3.

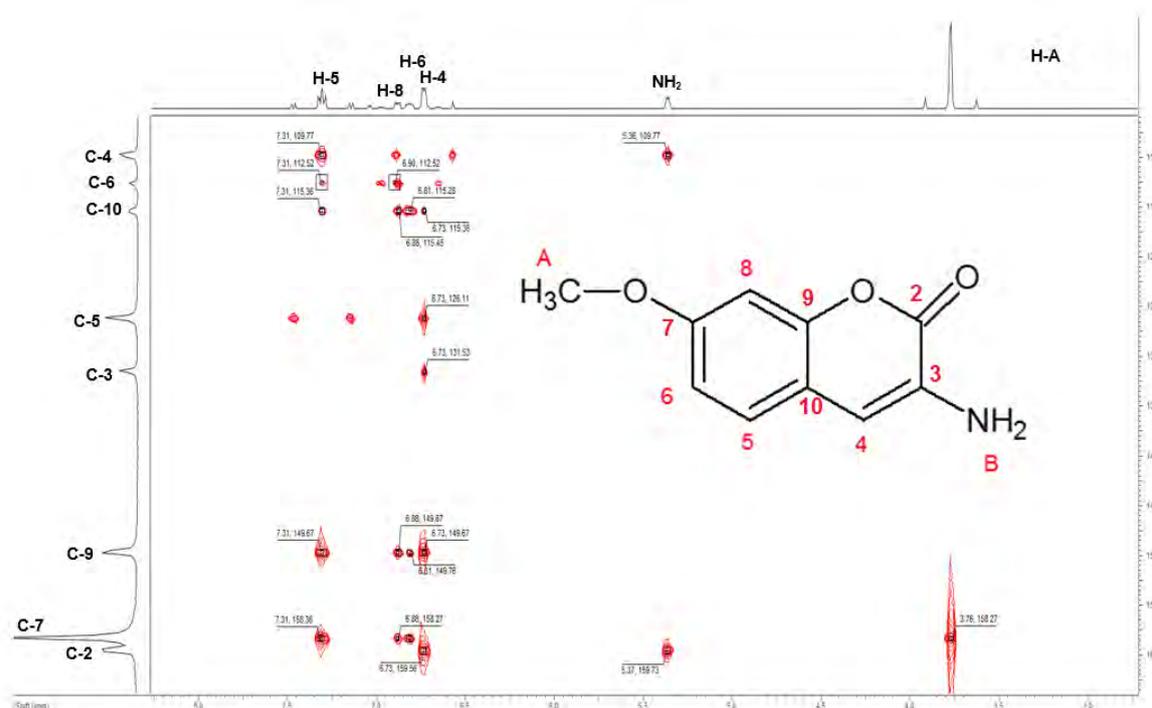


Figura 33. Espectro ^1H - ^{13}C HMBC del precursor 7-metoxi-3-aminocumarina.

En la **Tabla 10** se comparan los desplazamientos de los carbonos de los dos precursores cumarínicos. A semejanza de lo que se discutió anteriormente para el hidrógeno H-4, el fuerte incremento en el efecto de resonancia del NH₂ aumenta el apantallamiento sobre el C-4 y lo desplaza considerablemente hacia campo alto.

Tabla 10. Desplazamientos químicos en los espectros ^{13}C -RMN para los precursores acetoamido y amino.

Precursor	Señal ^{13}C -RMN: δ ppm (d^5 -DMSO)									
	A	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C10
Prec-3AA	56.31	158.23	122.31	125.47	129.25	113.24	161.26	100.96	151.77	113.13
Prec-3A	55.95	159.4	131.38	109.65	126.04	112.52	158.21	100.84	149.61	115.28

7.2.3. Bases de Schiff derivadas de la 7-metoxi-3-amino-cumarina

Espectroscopía Infrarroja

Los tres ligandos bases de Schiff obtenidos por condensación de la 7-metoxi-3-amino-cumarina con el salicilaldehído y con dos de sus derivados metoxi sustituidos presentan una banda de absorción centrada a 3466 cm^{-1} característica de la vibración de estiramiento O-H fenólico. El hecho que esta banda sea ancha y débil como se puede apreciar en los espectros IR mostrados en el **Anexo 12.2**, se puede atribuir a la presencia de un enlace de hidrógeno intramolecular con el N del enlace imino de la base de Schiff.⁴⁴

Los espectros IR ampliados en el rango $2000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ de los tres ligandos se muestran de modo comparativo en la **Figura 34**. Para los tres ligandos se observan dos bandas características de las bases de Schiff cumarínicas. La primera en el rango de $1720\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ que corresponde a las vibraciones de estiramiento $\nu\text{C=O}$ lactónico y la segunda entre $1620\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ propia del estiramiento del enlace C=N imino.

Por otro lado, en el rango de $1600\text{-}1420\text{ cm}^{-1}$ aparecen varias bandas de intensidad variable asignables a los modos vibracionales de los estiramientos C=C del esqueleto cumarínico y del anillo fenólico. Asimismo, el rango $1300\text{-}1100\text{ cm}^{-1}$ incluye bandas asociadas a los estiramientos C-O lactónico, fenólico y de los sustituyentes metoxi. En la **Tabla 11** se presentan las frecuencias y rangos exactos de las bandas de absorción antes discutidas para cada ligando.

Tabla 11. Bandas del infrarrojo (cm^{-1}) de los ligandos sintetizados.

Ligando	$\nu\text{O-H}$ fenólico	$\nu\text{C=O}$ lactona	$\nu\text{C=N}$ imino	$\nu\text{C=C}$ del anillo aromático	$\nu\text{C-O}$
BS-L1	3466	1705	1616	1570 - 1401	1265-1243
BS-L2	3466	1713	1603	1504 - 1401	1250-1197
BS-L3	3467	1716	1615	1571 - 1422	1279-1233

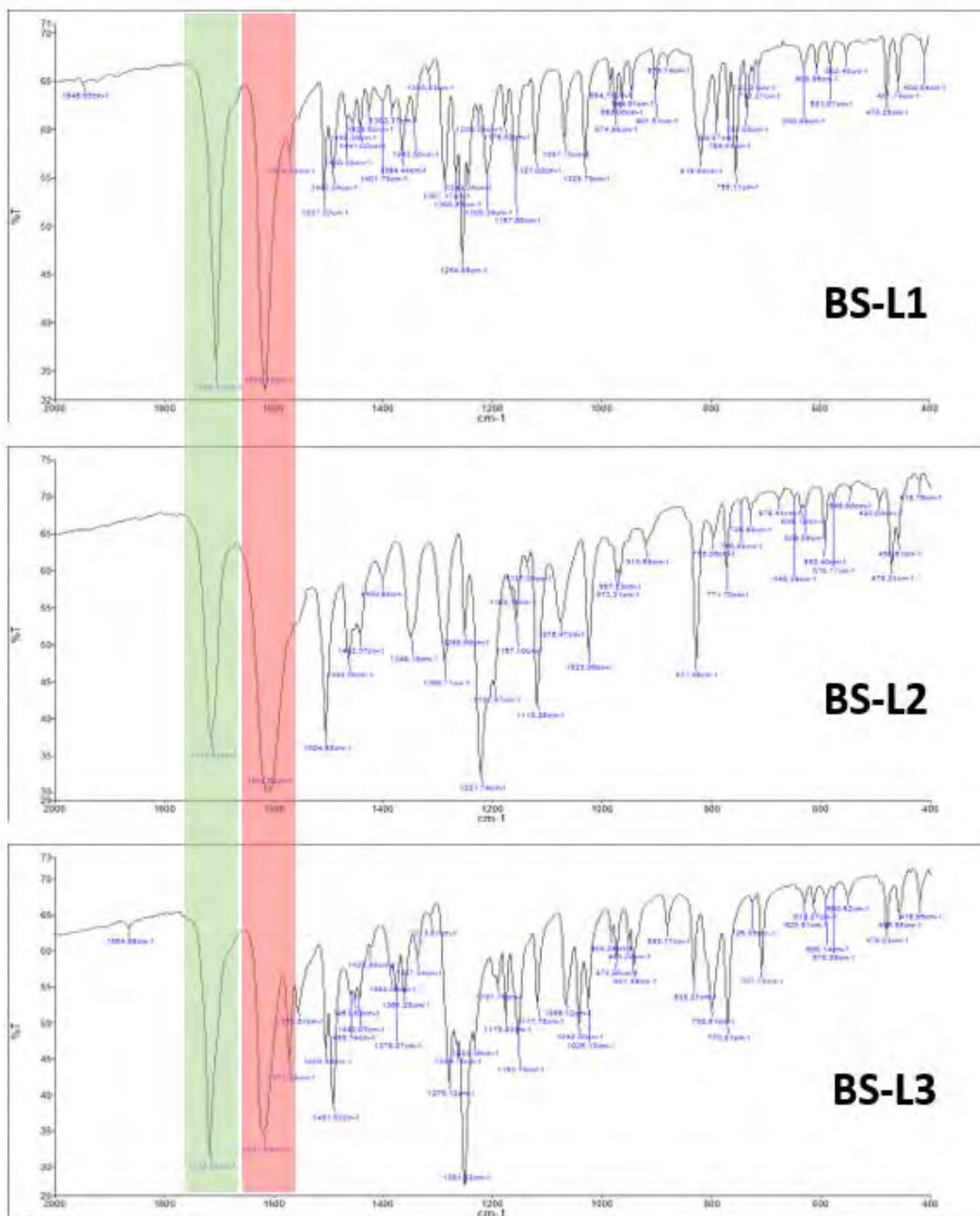


Figura 34. Espectro IR de los tres ligandos bases de Schiff cumarínicos (BS-L1, BS-L2, BS-L3); banda correspondiente a $\nu\text{C}=\text{O}$ lactónico (verde); banda correspondiente a $\nu\text{C}=\text{N}$ imino (rojo)

Espectroscopía de Resonancia Magnética nuclear

En los espectros de resonancia magnética nuclear ^1H -RMN de las tres bases de Schiff se puede observar la presencia de la señal del OH fenólico entre 12 y 14 ppm así como otras señales características propias del hidrógeno cumarínico H-4 y del hidrógeno del grupo imino HC=N (H-13); este último aparece a 9.12-9.25 ppm, desplazado hacia campo más bajo respecto al H-4 (8.03-8.09 ppm), lo que concuerda con lo reportado en la literatura.^{45,46}

En la **Figura 35** se presenta el espectro ^1H -RMN del ligando 7-metoxi-3-(4-metoxisalicildeneamino)cumarina (**BS-L2**), el cual se tomará como ejemplo representativo. Para comprobar la asignación propuesta para los protones H-4 y H-13 se recurrió al análisis del espectro ^1H - ^{13}C HSQC-DEPT (**Figura 36**) y ^1H - ^{13}C HMBC del ligando **BS-L2** (**Anexo 12.4**). De esta manera, se pudo determinar que el H-13 correlaciona con un carbono que se encuentra desplazado hacia campo muy bajo (163.8ppm) y, por tanto, debe corresponder al grupo imino. En cambio, el H-4 correlaciona con el carbono que se encuentra a 130.1ppm, típico desplazamiento para un carbono aromático.

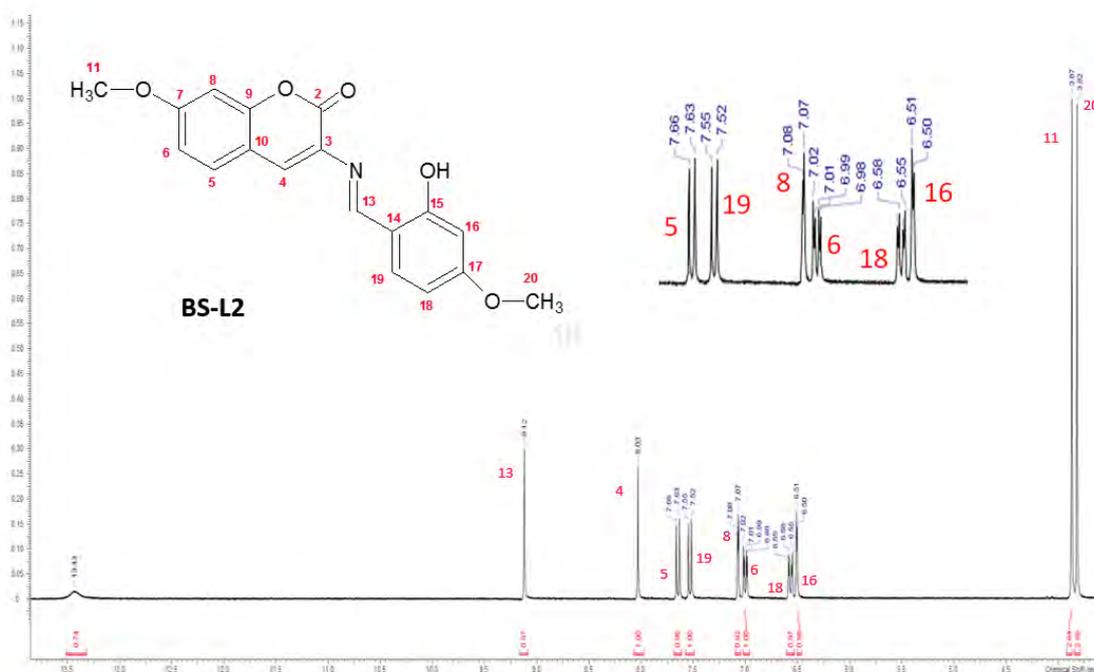


Figura 35. Espectro ^1H -RMN del ligando **BS-L2**.

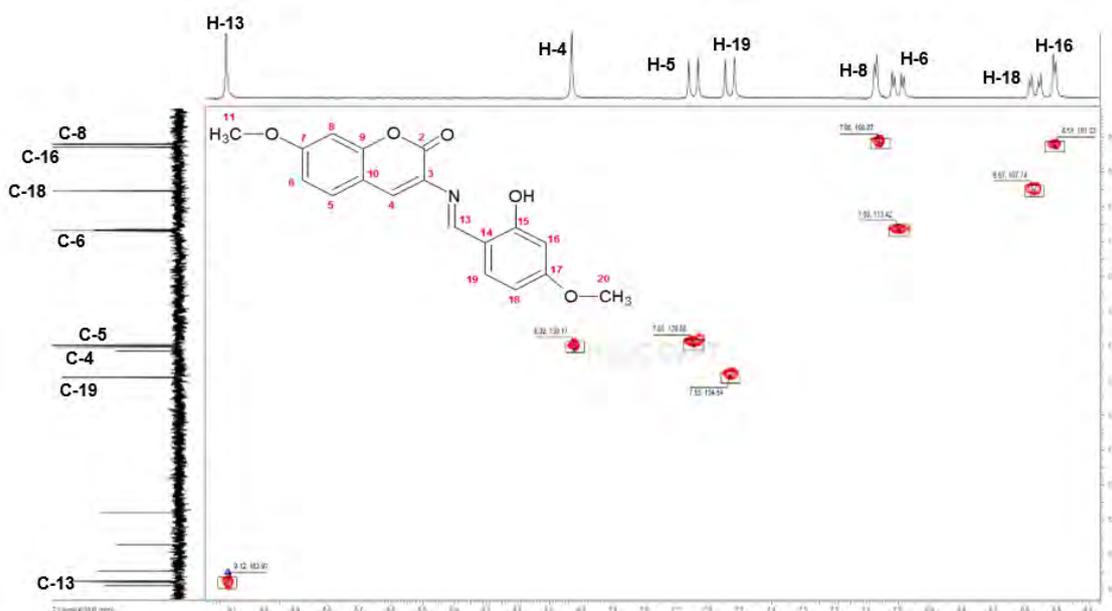


Figura 36. Espectro ^1H - ^{13}C HSQC-DEPT del ligando **BS-L2**.

Una vez identificados estos dos hidrógenos se procedió a asignar todas las demás señales de los espectros ^1H -RMN y ^{13}C -RMN del ligando **BS-L2**, tomado como referencia, mediante un análisis detallado de sus espectros HSQC-DEPT y HMBC. Un paso previo, que facilitó la asignación de los hidrógenos de esta base de Schiff, fue el reconocimiento de los distintos tipos de acoplamientos presentes en su espectro ^1H -RMN, los que se ven limitados por las sustituciones en los anillos aromáticos.

De esta manera, se estableció que los dobletes a 7.65 y 7.53 ppm pertenecen a los protones H-5 y H-19 que solo presentan acoplamiento *orto* ($J= 8$ Hz); los dobletes de dobletes a 7.00 y 6.57 ppm corresponden al H-6 y H-18 que presentan *orto* y *meta* ($J= 8; 3$ Hz) y por último, los dobletes con solo el pequeño acoplamiento *meta* ($J= 3$ Hz) a 7.06 y 6.51 ppm son propios del H-8 y H-16. A partir de esta información, el espectro HSQC-DEPT nos permite identificar los desplazamientos químicos de los átomos de carbono enlazados a dichos hidrógenos. Así, por ejemplo, las señales a 129.86 y 134.54 ppm en el espectro de ^{13}C -RMN que se encuentran asociadas a los dobletes a 7.65 y 7.53 en el ^1H -RMN deben corresponder a los carbonos C-5 y C-19. Al analizar las correlaciones de las señales de estos dos carbonos se observa que el carbono a 134.55 ppm solo correlaciona con el H-imino (9.12 ppm), mientras que aquel a 129.86 ppm lo hace con el H-4 (8.03 ppm); esto permite asignar la primera señal al C-19 y la segunda al C-5. Por consiguiente, los dobletes a 7.53 y 7.65 ppm en el ^1H -RMN corresponden al H-19 y H-5 respectivamente.

Un análisis similar de las correlaciones presentadas por las señales a 113.42, 107.70, 101.38 y 100.97 en el ^{13}C -RMN permitió asignarlas a los carbonos C-6, C-18, C-16 y C-8 respectivamente. En consecuencia, los dobletes de dobletes a 7.00 y 6.57 ppm en el ^1H -RMN resultaron asignados a los protones H-6 y H-18 respectivamente, mientras que los dobletes a 6.50 y 7.07 ppm corresponden a los protones H-16 y H-8 respectivamente. El desplazamiento a campo alto del H-16 y H-18 respecto a los protones cumarínicos H-6 y H-8 resulta consistente con la ubicación de los primeros en posición **orto** u **orto/para** a dos grupos donadores, OH y OMe, en el anillo bencénico.

Por otro lado, la asignación de los carbonos cuaternarios se facilitó separándolos en dos grupos claramente diferenciados. El primero, formados por los carbonos C-2, C-7, C-9, C-15 y C-17, los cuales por estar unidos directamente a átomos de oxígeno se ubican a campo más bajo, en el rango de 153 a 165 ppm. En cambio, las tres señales ubicadas entre 113 y 131 ppm deben corresponder al C-3, C-10 y C-14. Una comparación de las correlaciones ^1H - ^{13}C esperadas y observadas para los carbonos que integran cada grupo condujo finalmente a una asignación completa de todas estas señales. Estas asignaciones, al igual que las del resto de los carbonos se incluyen en la **Tabla 12**.

Tabla 12. Correlaciones ^1H - ^{13}C en los espectros HSQC-DEPT y HMBC del ligando **BS-L2**.

			Desplazamiento ^{13}C (ppm)																	
			C-17	C-13	C-15	C-7	C-2	C-9	C-19	C-3	C-4	C-5	C-14	C-6	C-10	C-18	C-16	C-8	C-20	C-11
			164.54	163.96	163.86	162.41	158.62	153.95	134.55	130.73	130.16	129.85	113.47	113.42	113.34	107.70	101.38	100.97	56.45	56.02
Desplazamiento ^1H (ppm)	OH	13.43		X									X				X			
	H-13	9.32			X		X		X	X			X				X			
	H-4	8.03		X			X	X		X		X			X				X	
	H-5	7.64					X		X						X	X			X	
	H-19	7.53	X	X	X								X				X	X		
	H-8	7.07					X		X		X				X	X				
	H-6	7.00					X		X							X	X			X
	H-18	6.57	X	X										X				X		
	H-16	6.50	X	X	X									X			X			
	H-11	3.87					X													
	H-20	3.82	X																	

Leyenda: X= ^1H - ^{13}C de hasta 4 enlaces; ■ = ^1H - ^{13}C de un enlace.

Adicionalmente, se utilizó la técnica SELECTIVE-TOCSY para observar los acoplamiento ^1H - ^1H dipolares. Esta técnica consiste en elegir la frecuencia de un hidrógeno específico para mandar un pulso y de esta manera observar el acoplamiento dipolar de otros hidrógenos que comparten el mismo sistema de spin. Por tanto, con este análisis se podrán observar los acoplamiento entre los protones aromáticos de la cumarina y del anillo fenólico independientemente.

En el **Anexo 12.4** se pueden observar los espectros obtenidos, de los cuales el que resultó de mayor interés es el mostrado en la **Figura 37**. Aquí se eligió la frecuencia correspondiente a H-16 (6.50ppm) y se observó que resonaban los hidrógenos 6.57 (H-18), 7.53 (H-19) y 9.12 (H-13) con lo cual se comprobó que las señales a 6.57 y 7.53 ppm pertenecían efectivamente al H-18 y H-19 respectivamente. Cabe destacar, que esta técnica es muy útil ya que por tratarse de un análisis donde se observan acoplamiento ^1H - ^1H no demanda tanto tiempo y cantidad de muestra como un análisis ^1H - ^{13}C , sin embargo, para realizarlo se debe de partir de frecuencias de hidrógenos previamente asignados.

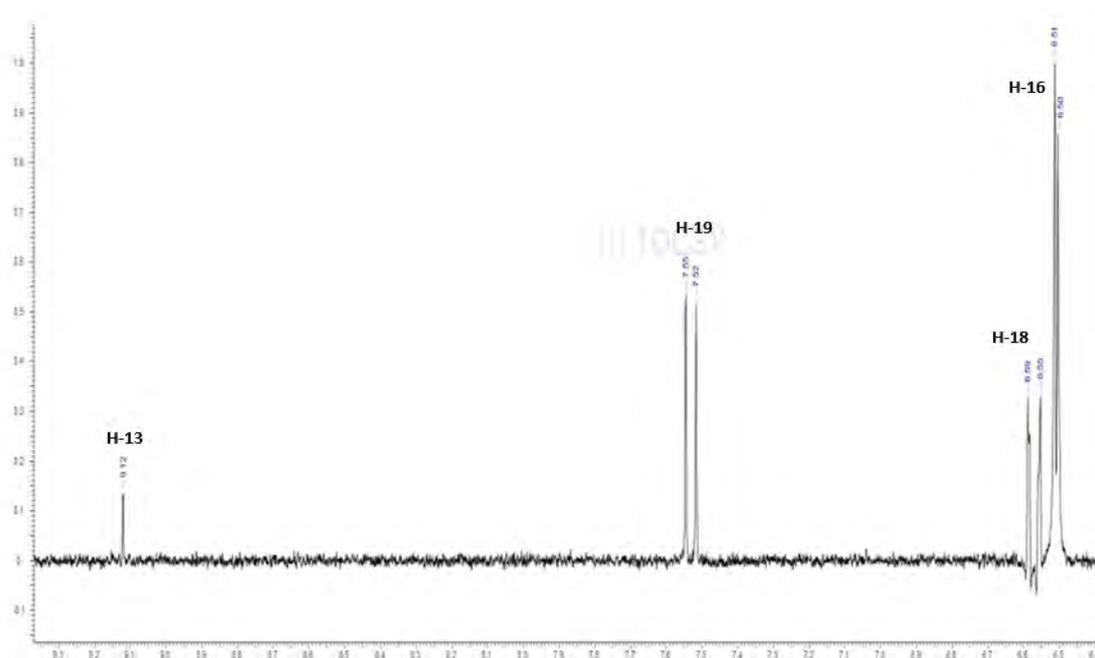


Figura 37. Espectro 1D-TOCSY del ligando **BS-L2**.

En el caso del ligando 7-metoxi-3-(5-metoxi-salicildeneamino)cumarina (**BS-L3**), a semejanza de lo observado en el BS-L2, las sustituciones en ambos anillos aromáticos limitan los acoplamiento ^1H - ^1H y facilitan la interpretación del correspondiente espectro ^1H -RMN. Es de esperarse que el cambio en la posición el sustituyente -OMe en el anillo bencénico no afecte significativamente los desplazamientos químicos de los protones en el anillo cumarínico. En la **Figura 38** se observa un doblete ($J= 9\text{Hz}$) que es asignable al hidrógeno H-5. Al elegir esta frecuencia en el análisis SELECTIVE-TOCSY (**Anexo 12.4**) se observa que acoplan los hidrógenos a 7.07 y 7.01 ppm, que por tratarse de un doblete ($J= 3\text{ Hz}$) y un doblete de dobletes ($J= 9; 3\text{Hz}$) respectivamente, resultan asignables a los hidrógenos H-8 y H-6.

De esta manera, las diferencias en el tipo de acoplamiento de los protones H-16, H-17 y H-19 permiten asignarlos al doblete ($J=9\text{ Hz}$) a 6.92 ppm, al doblete de dobletes ($J=9; 3\text{ Hz}$) a 7.06 ppm y al doblete ($J=3\text{ Hz}$) a 7.24 ppm respectivamente. El doblete de dobletes del H-17 se superpone con el doblete del H-8, lo que causa un aumento en la intensidad de este último como se observa en la **Figura 38**. Esta asignación se comprueba mediante el SELECTIVE-TOCSY de este ligando; al elegir la frecuencia del H-16 a 6.92 ppm se observa que acoplan los hidrógenos a 7.06 y 7.24 ppm, asignados a los protones H-17 y H-19 del anillo benzénico.

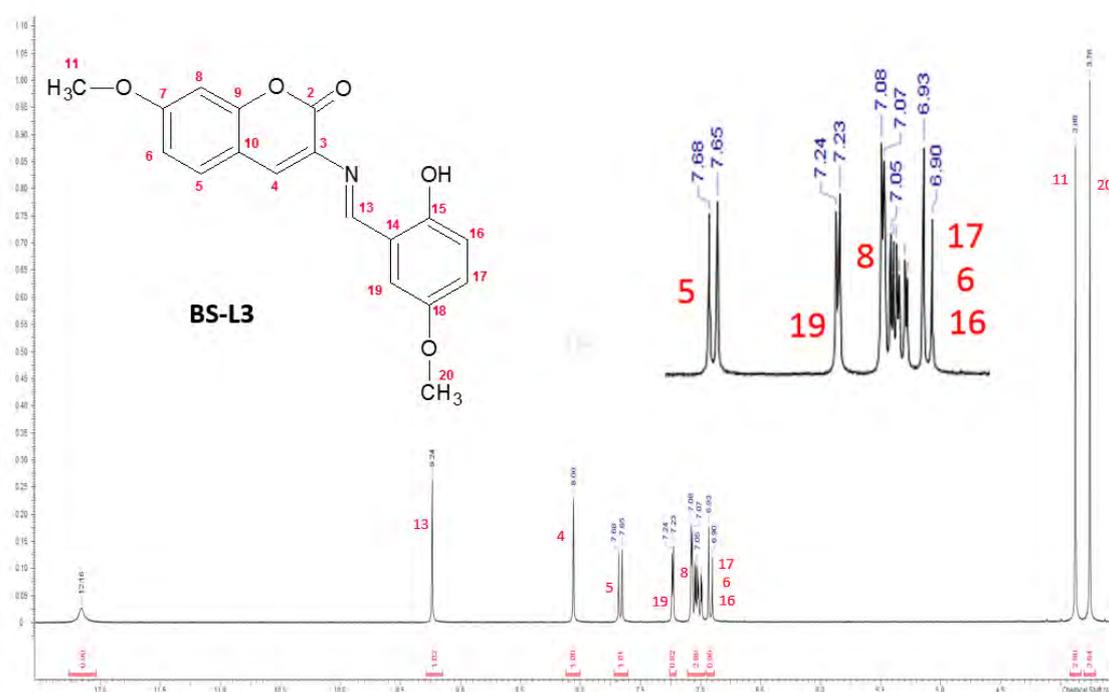


Figura 38. Espectro ^1H -RMN del ligando **BS-L3**.

Para el caso del ligando 7-metoxi-3-(salicildeneamino)cumarina (**BS-L1**), la asignación de las señales en el espectro ^1H -RMN (**Figura 39**) se complica por la ausencia de un sustituyente en el anillo benzénico, lo que origina que haya una superposición de señales. Se espera que, en el anillo benzénico, los protones H-17 y H-18 aparezcan como tripletes ($J=9; 3\text{ Hz}$), mientras que el H-16 y H-19 sean dobletes de dobletes ($J=9; 3\text{ Hz}$). Por otro lado, en el anillo cumarínico, se espera que los protones H-5, H-6 y H-8 presenten la misma multiplicidad que en los ligandos análogos y, por tanto, den origen a un doblete ($J=9\text{ Hz}$), doblete de dobletes ($J=9; 3\text{ Hz}$) y doblete ($J=3\text{ Hz}$) respectivamente. Asimismo, estos protones deben presentar un desplazamiento químico similar a aquel observado en los ligandos anteriores. De esta manera el

doblete a 7.67 ppm ($J= 9$ Hz) es asignable al H-5 y el doblete a 7.08 ppm ($J= 3$ Hz) corresponde al H-8.

En lo que respecta a los protones bencénicos se espera que la señal triplete a 7.44 ppm corresponda al H-17 o H-18; por analogía con el salicilaldehído y porque se espera que el H-17 se encuentre menos apantallado que el H-18 por el grupo donador -OH se ha asignado este primer triplete al H-17.

Por otro lado, se observa que el doblete del H-5 está superpuesto con un doblete de dobletes a 7.64 ppm, el cual podría corresponder al H-6, H-16 o H-19. Sin embargo, los dos primeros se encuentran en posición orto a un grupo donador, mientras que el H-19 está orto al grupo aceptor imino, lo que debe generar un efecto desapantallante y un desplazamiento hacia campo bajo. Esto lleva a asignar este doblete de dobletes al H-19.

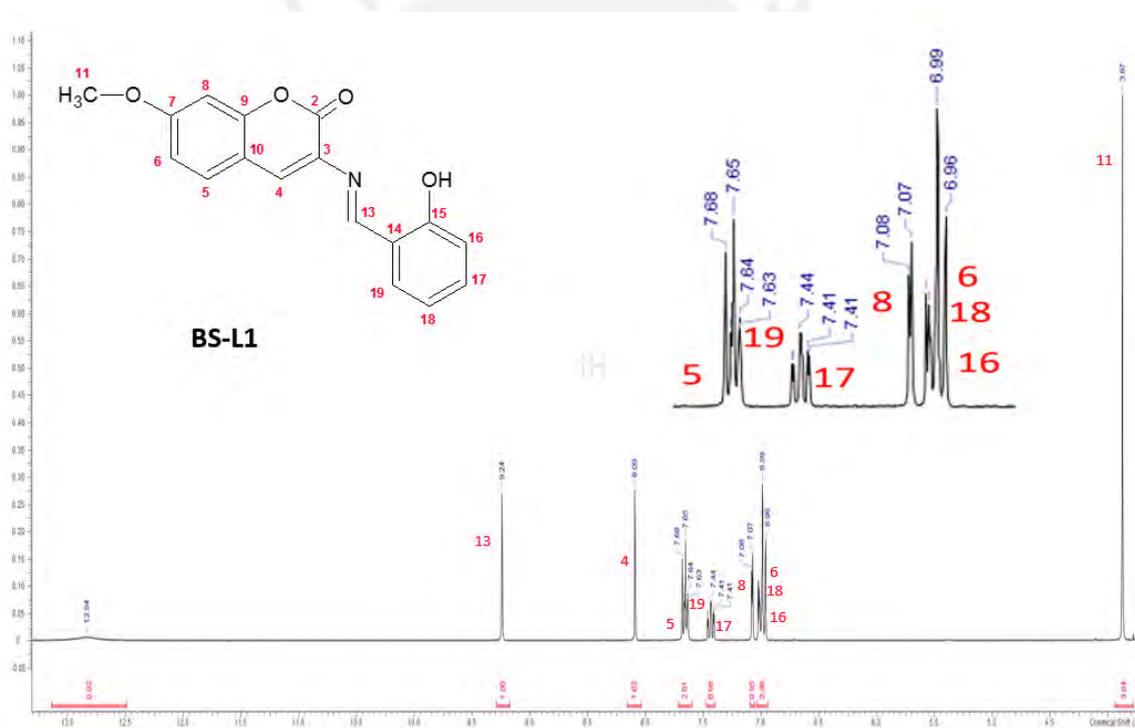


Figura 39. Espectro ^1H -RMN del ligando **BS-L1**.

Las tres señales pendientes, correspondientes al H-6, H-18 y H-19, se encuentran superpuestas a alrededor de 7 ppm aproximadamente, lo que es consistente con el valor de la integral, el cual es muy cercano a 3.

Tabla 13. Desplazamientos ^1H -RMN para los ligandos en d^6 -DMSO.

	Señal ^1H -RMN: δ ppm, multiplicidad J (Hz)		
	BS-L1	BS-L2	BS-L3
H-O	12.33; bs	13.43; bs	12.16; bs
H-4	8.09; s	8.03; s	8.06; s
H-13	9.25; s	9.12; s	9.24; s
H-5	7.67; d J = 9	7.64; d J = 8	7.67; d J = 9
H-6	7.01; dd J = 9; 3	7.01; dd J = 8; 3	7.01; dd J = 9; 3
H-8	7.08; d J = 3	7.07; d J = 3	7.07; d J = 3
H-16	6.97; d J = 9	6.50; d J = 3	6.92; d J = 9
H-17	7.44; t		7.06; dd J = 9; 3
H-18	7.00; t J = 9; 3	6.57; dd J = 9; 3	
H-19	7.64; dd J = 9; 3	7.53; d J = 9	7.24; d J = 3
H-11	3.87; s	3.87; s	3.88; s
H-20		3.82; s	3.76; s

Como se observa en la **Tabla 13**, introducir y variar la posición del sustituyente -OMe en el anillo fenólico no afecta significativamente el desplazamiento químico de los hidrógenos cumarínicos ni los del sustituyente metoxi en la posición 7. Para el caso del **BS-L2**, el sustituyente donador -OMe del anillo fenólico que se encuentra en posición *para* al C-14, incrementa mediante un efecto de resonancia su densidad electrónica, lo cual a su vez origina que el protón imino H-13 se apantalle más que en los otros dos casos. Asimismo, este efecto de apantallamiento por el sustituyente -OMe, se puede observar también sobre los hidrógenos ubicados en posición orto a dicho grupo, el H-16 y H-18 para el caso del **BS-L2** y el H-17 y H-19 para el **BS-L3**. Por otro lado, el sustituyente -OH, también ejerce un efecto de resonancia, es por esta razón que los hidrógenos del sustituyente metoxi del anillo fenólico se encuentran a un campo algo más alto en el caso del **BS-L3**.

Espectrometría de Masas

Los tres ligandos bases de Schiff fueron caracterizados por espectrometría de masas (ESI-MS). En la **Figura 40** se muestran de modo comparativo los espectros ESI-MS de los tres ligandos, mientras que en la **Tabla 14** se presentan las señales correspondientes a los pesos moleculares de cada ligando más un protón (M+H). Además, también se incluyen las señales correspondientes al peso del ligando con

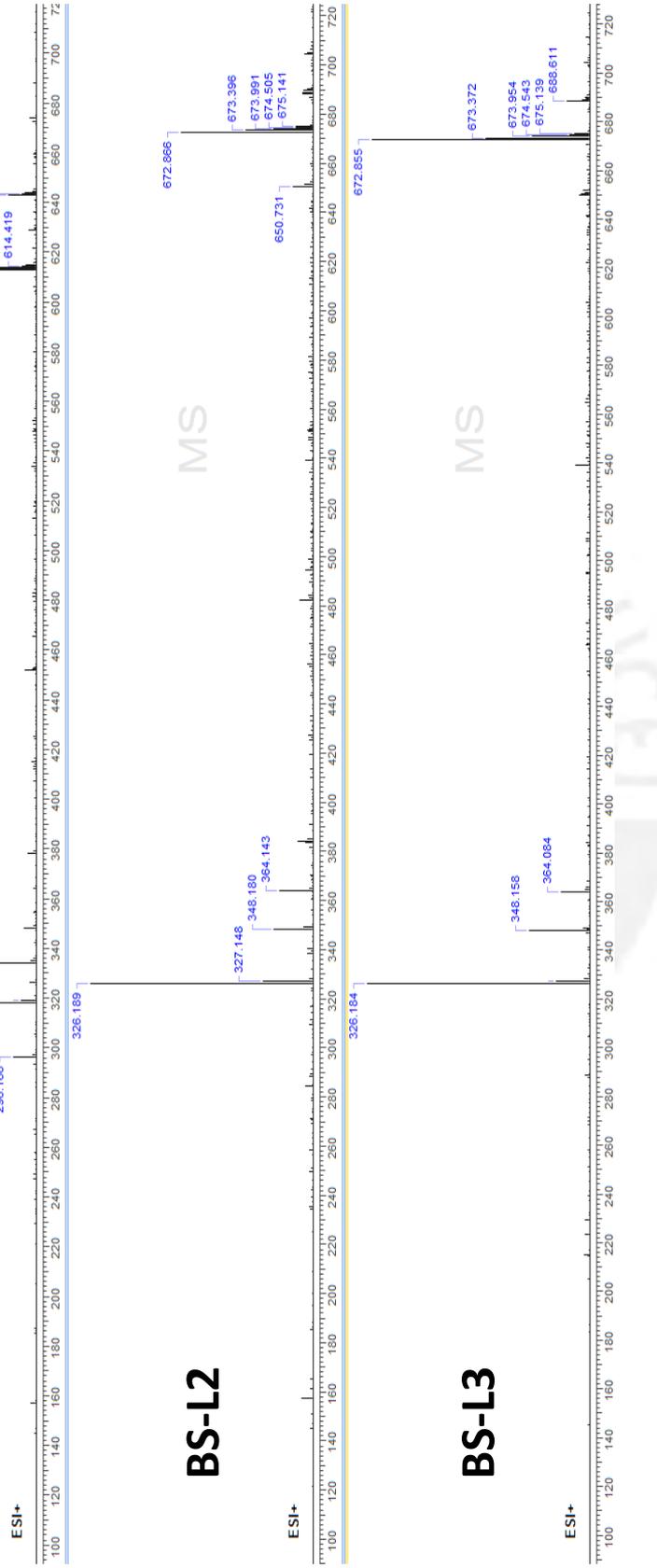
sodio y potasio que, posiblemente, son por el uso de detergentes en el lavado de los equipos de vidrio usados para preparar las muestras antes de la medición, o restos de carbonato de sodio de la reacción de hidrólisis

Tabla 14. Señales m/z de los espectros MS de cada ligando.

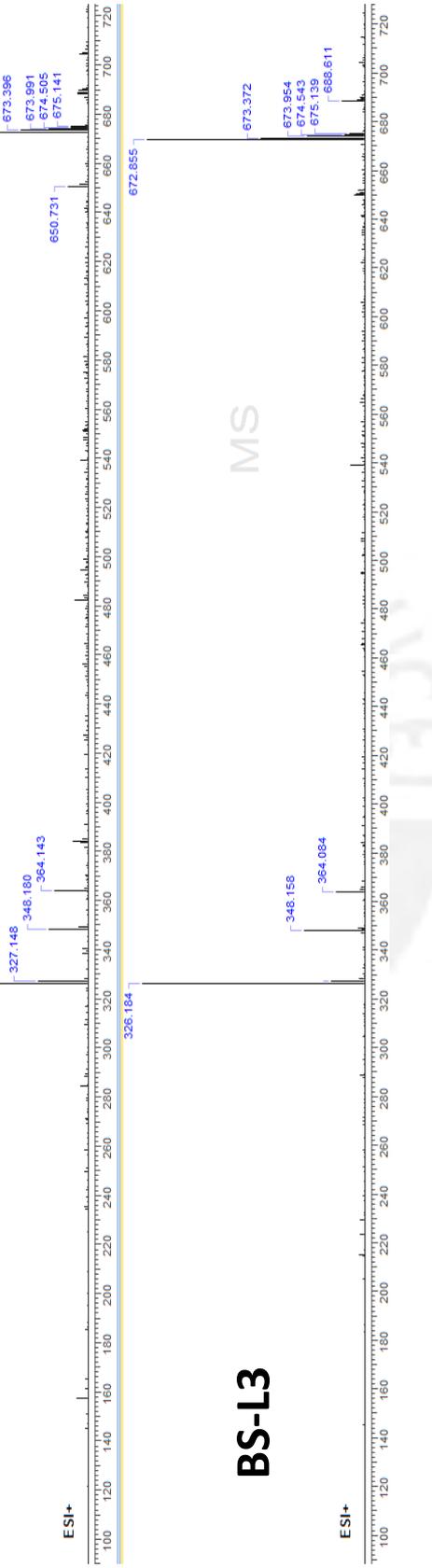
	M+H	M+Na	M+K	2M	2M+Na
BS-L1 (295.23 g/mol)	296.16	318.16	334.18		612.69
BS-L2 (325.24 g/mol)	326.18	348.18	364.14	650.73	672.06
BS-L3 (325.24 g/mol)	326.18	348.15	364.08		672.85



BS-L1



BS-L2



BS-L3

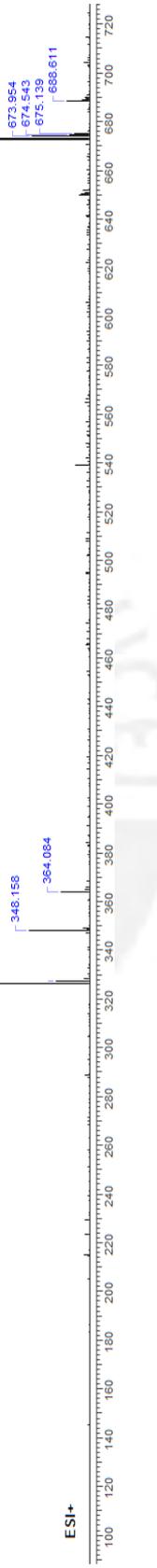


Figura 40. Espectros ESI-MS de los tres ligandos bases de Schiff.

7.3. ANÁLISIS ESPECTROFOTOMÉTRICO DE LOS LIGANDOS

7.3.1. Análisis ultravioleta visible (UV-Vis)

La adquisición de los espectros de absorción UV-Vis se realizó en una mezcla de una solución acuosa 25 mM de HEPES y DMF en una proporción v/v 9:1. Cabe resaltar, que el uso de la solución acuosa buffer es necesario para crear un entorno básico que favorezca la desprotonación del receptor fenólico y, de esta manera, promover la coordinación del ligando al metal. En la literatura se pudo hallar que para lograr un rango de pH entre 7.5 - 8 la concentración de HEPES debe ser de 15 a 30 mM; sin embargo, el valor del pH también dependerá de la naturaleza del ligando a analizar.^{49,50} Después de realizar varios ensayos con los ligandos en presencia de Zn(II) se determinó que la concentración de HEPES óptima era de 25 mM.

Se adquirieron los espectros UV-Vis de los ligandos tanto en estado libre como en presencia de Zn(II); las mediciones se realizaron usando dos diferentes sales de cinc, cloruro y acetato, con el fin de analizar la influencia del contraión sobre dichos espectros. Además, se determinaron los coeficientes de absortividad molar de las diferentes bandas presentes en cada uno de estos espectros.

En el **Anexo 12.5** se presentan los valores de la absorbancia a diferentes concentraciones del ligando o complejo de cinc, según el caso, así como las gráficas correspondientes necesarias para el cálculo de los coeficientes de absortividad molar de cada uno de los ligandos y sus correspondientes complejos de cinc.

Por otro lado, se analizó si los ligandos también coordinaban a otros metales seleccionados del **bloque s** y de **transición**. A continuación, se muestran y discuten, por separado, los espectros UV-Vis de cada ligando y sus respectivos complejos.

7.3.1.1. Ligando 7-metoxi-3-(salicildeneamino)cumarina (BS-L1)

En la **Figura 41** se muestra el espectro UV-Vis del ligando **BS-L1**, en el cual se puede observar una banda intensa a **380 nm** ($\epsilon=59293 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) que se encuentra solapada con una segunda banda la cual aparece con un hombro a **400 nm**. El alto valor del coeficiente de absortividad molar indica que corresponde a transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ propias del sistema aromático extendido del ligando base de Schiff cumarínico. El espectro UV-Vis de este ligando es muy similar a aquel reportado de una base de Schiff análoga, la 7-hidroxi-3-(salicildeneamino)cumarina ($\lambda_{\text{max}}=374 \text{ nm}$).¹⁶

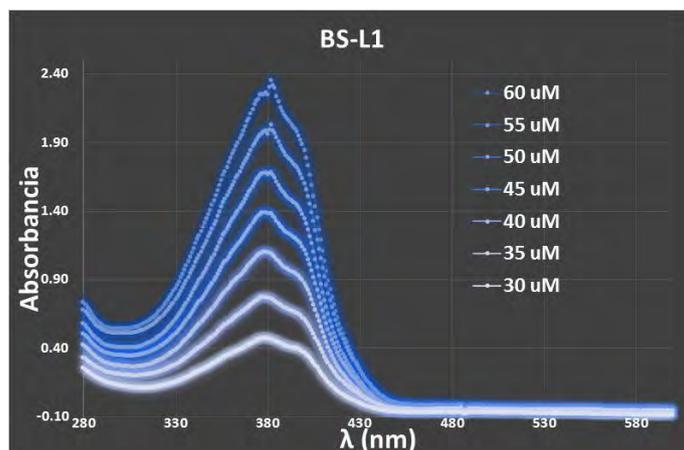


Figura 41. Espectros de absorbancia del **BS-L1** a diferentes concentraciones.

A continuación se midió el espectro UV-Vis del complejo de Zn(II) con el ligando 7-metoxi-3-(salicildeneamino)cumarina, para lo cual se utilizó cloruro de cinc como fuente del metal. En la **Figura 42**, se muestra el espectro de dicho complejo, en el cual se puede observar una banda de absorción bien definida a **370 nm** ($\epsilon=23449 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) que es asignable a la transición $\pi \rightarrow \pi^*$ antes mencionada del ligando cumarínico ($\lambda=380 \text{ nm}$), así como la aparición de una nueva banda también bien definida y de similar intensidad a **460 nm** ($\epsilon=24216 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Esta última corresponde a la banda de transferencia de carga ligando-metal (**LMCT**) en el complejo formado.¹⁶

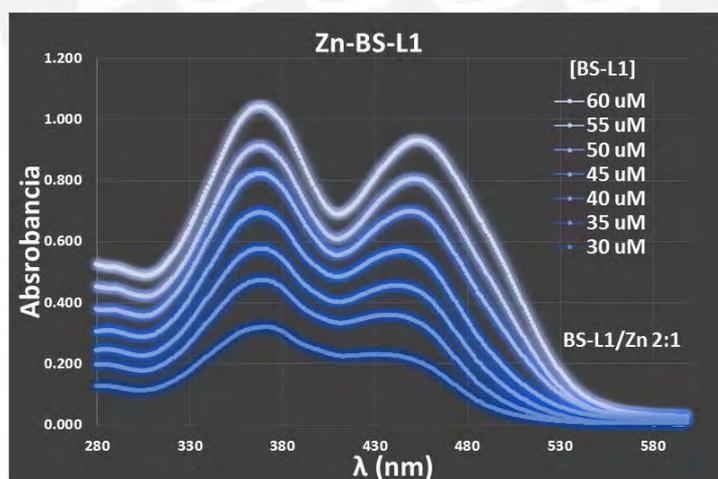


Figura 42. Espectro de absorbancia del complejo **Zn-BS-L1** a diferentes concentraciones y con una relación ligando/metal 2:1.

Asimismo, la aparición de la intensa banda de transferencia de carga ligando-metal en el espectro UV-Vis del ligando en presencia del Zn(II) demuestra que ha ocurrido una complejación efectiva. Por otro lado, con el fin de analizar la influencia del contraíón sobre el comportamiento en el UV-Vis del complejo **Zn-BS-L1**, se midió nuevamente el

espectro de absorción del ligando BS-L1 en presencia de Zn^{2+} , pero utilizando esta vez acetato de cinc como fuente del metal.

En la **Figura 43**, se presenta dicho espectro, el cual resultó muy similar tanto en la posición de los máximos de las bandas de absorción como en sus valores de absorptividad molar. Así se observa la banda característica de la transición $\pi \rightarrow \pi^*$ del ligando cumarínico a **370 nm** ($\epsilon=22192 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y la correspondiente a la transferencia de carga ligando-metal a **455 nm** ($\epsilon=23755 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Dada la gran similitud de ambos espectros, se podría proponer que el contraión no forma parte de la esfera de coordinación del complejo.

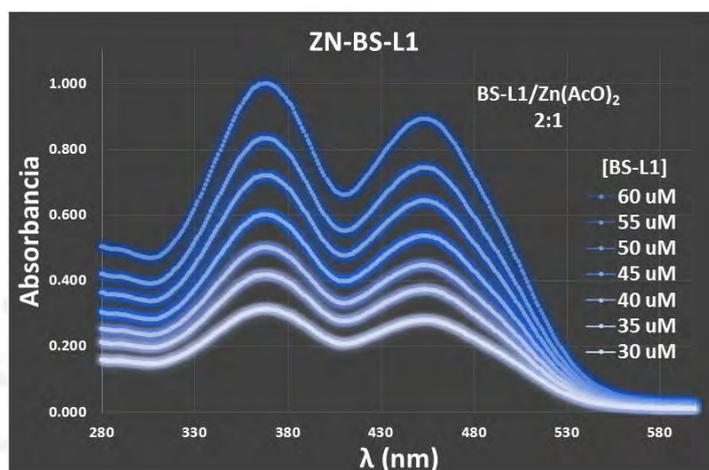


Figura 43. Espectro de absorción del complejo **Zn-BS-L1** a diferentes concentraciones y con una relación ligando/metal 2:1.

Por otro lado, también se analizó si otros cationes metálicos producían el mismo efecto en el espectro de absorción UV-Vis que el observado para el $Zn(II)$. Con este fin se midieron bajo las mismas condiciones que las utilizadas en caso del $Zn(II)$ los espectros UV-Vis del BS-L1 en presencia de diversos cationes metálicos.

Como se observa en la **Figura 44A**, no se aprecia ningún cambio en las bandas de absorción del ligando **BS-L1** en presencia de los metales de interés del **bloque s**. Sin embargo, como se muestra en la **Figura 44B**, en presencia de los metales de transición divalentes seleccionados, a excepción del cadmio, se observaron notables cambios en las bandas de absorción. La aparición de la banda característica de transferencia de carga ligando-metal constituye evidencia de la formación de un complejo de coordinación con estos iones divalentes.

En la **Tabla 15** se presentan las longitudes de onda correspondientes a las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ (λ_1) y la banda de transferencia de carga (λ_2) de los espectros UV-

Vis de los complejos del BS-L1. En todos los casos, la complejación desplaza hacia menores longitudes de onda la banda correspondiente a la transición $\pi \rightarrow \pi^*$ propia del ligando,^{26,27} lo cual se debe al efecto PCT antes discutido para el ligando BS-L1.

En lo que respecta a la banda LMCT, se observa que en todos los casos, a excepción del Cu^{2+} , esta banda se encuentra en el rango 445-490 nm, relativamente cercano a aquel del complejo **Zn-BS-L1**. En cambio, en caso del Cu^{2+} se produce un considerable desplazamiento hipsocrómico de dicha banda respecto al correspondiente complejo de Zn^{2+} .

Por otro lado, en el caso del Cd^{2+} solo se aprecia una banda ancha y débil entre 430 y 530 nm. Si los complejos formados con Zn(II) y Cd(II) presentaran las mismas geometrías, la estabilidad de los mismos, dada su configuración d^{10} , estaría influenciada, exclusivamente, por la acidez de Lewis del metal, la cual sería mayor en el caso del Zn(II) por presentar menor radio.

Tabla 15. Longitudes de onda de absorción en el UV-Vis del ligando BS-L1 en estado libre y en presencia de metales de transición propuestos.

	$\lambda_1 (\pi-\pi^*)$	$\lambda_2 (\text{LCMT})$
BS-L1	380	
Zn	370	460
Mn	360	467
Fe	355	449
Co	342	445
Ni	367	490
Cu	335	398
Cd	378	465

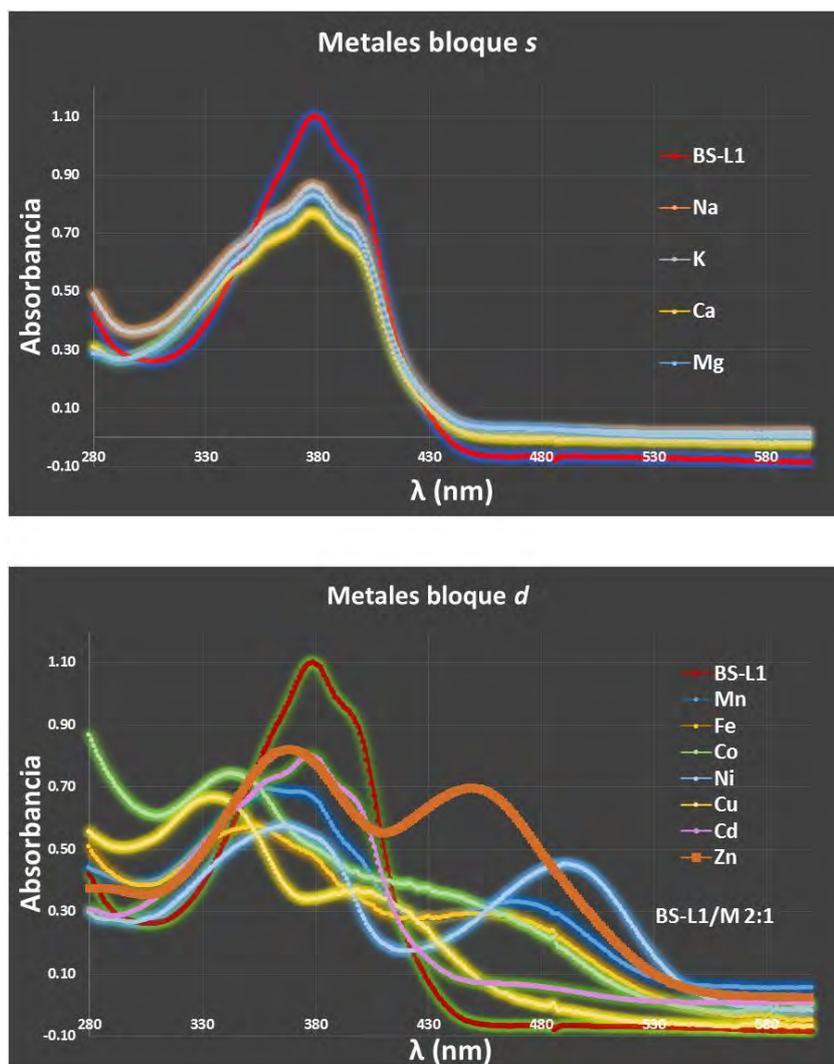


Figura 44. Espectros de absorbancia del **BS-L1** en presencia de otros metales divalentes.

7.3.1.2. Ligando 7-metoxi-3-(4-metoxi-salicildeneamino)cumarina (**BS-L2**)

El espectro de absorción UV-Vis del ligando **BS-L2**, que se muestra en la **Figura 45**, presenta un perfil muy similar al del ligando **BS-L1**. Se observa una banda con un máximo de absorción a **385 nm** ($\epsilon=74211 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y un hombro a **407 nm**, que por su intensidad pueden ser asignados a las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ propias de este compuesto aromático.

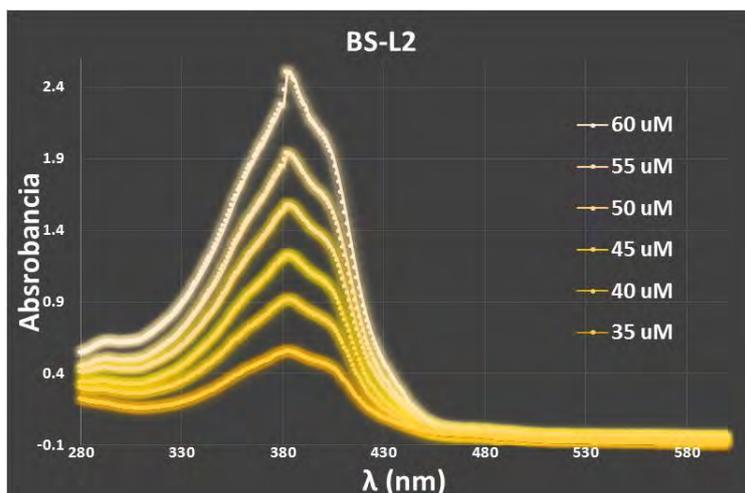


Figura 45. Espectros de absorbancia del **BS-L2** a diferentes concentraciones.

En la **Figura 46** se presenta el espectro de absorción del complejo **Zn-BS-L2**, medido usando cloruro de cinc como fuente del metal. A semejanza del complejo anterior, la coordinación al metal genera un desplazamiento hipsocrómico en las bandas de absorción de las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ propias del ligando, más pronunciado en este caso.

Es así que se observa un máximo a **360 nm** ($\epsilon=21518 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y un hombro a **325 nm**. Por otro lado, la banda de transferencia de carga ligando-metal también sufre un desplazamiento hipsocrómico respecto a aquella presente en el complejo **Zn-BS-L1** y se ubica ahora a **435 nm** ($\epsilon=34071 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). A diferencia del complejo anterior, esta última banda es considerablemente más intensa que la doble banda correspondiente a las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ del ligando cumarínico.

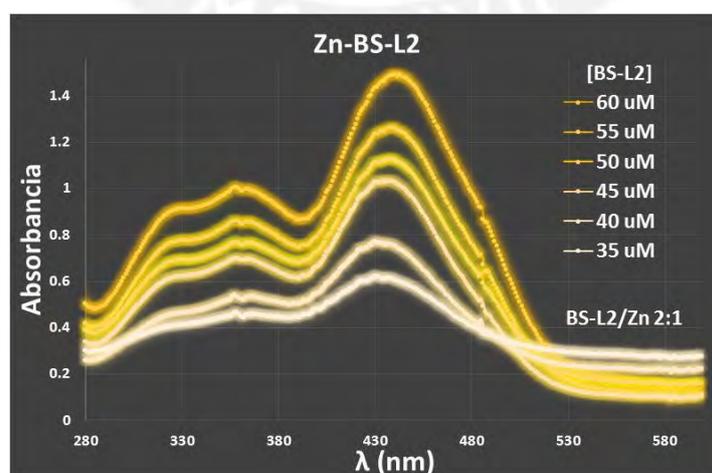


Figura 46. Espectros de absorbancia del **Zn-BS-L2** a diferentes concentraciones y con una relación ligando/metal 2:1.

Asimismo, también en este caso se midió el espectro de absorción UV-Vis del ligando **BS-L2** en presencia de acetato en lugar de cloruro de cinc. En este caso el espectro de absorción presenta dos máximos de absorción a las mismas longitudes de onda que el complejo con cloruro de cinc; además, los valores de la absorptividad molar para dichas bandas son muy similares a los del complejo con cloruro de cinc. Es así, que la banda correspondiente a las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ aparece a **360 nm** ($\epsilon=22414 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y la banda de LMCT a **435 nm** ($\epsilon=35749 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). El espectro UV-Vis correspondiente y el cálculo del coeficiente de absorptividad molar se muestran en el **Anexo 12.7**.

Por otra parte, el comportamiento en el UV-Vis de este ligando en presencia de otros metales fue similar al observado con el ligando **BS-L1**. En la **Figura 47** se puede apreciar que, en caso de los iones divalentes de Mn, Fe, Co, Ni y Cu, tiene lugar la aparición de la intensa banda LMCT; mientras que, para el Cd^{2+} , esta banda es muy débil.

Como se muestra en la **Tabla 16**, en este caso también se produce un considerable desplazamiento hipsocrómico de dicha banda para el complejo de Cu^{2+} respecto a los otros metales, cuyo λ_{LMCT} se ubica en el rango de 455-480 nm, muy cercano al valor observado para el complejo de Zn respectivo. Por último, a semejanza del complejo **Zn-BS-L2**, también se aprecia un desplazamiento hipsocrómico de la banda correspondiente a las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ en el ligando coordinado.

Tabla 16. Longitudes de onda de absorción en el UV-Vis del ligando **BS-L2** en estado libre y en presencia de metales de transición propuestos.

	$\lambda_1 (\pi-\pi^*)$	$\lambda_2 (\text{LMCT})$
BS-L2	385	
Zn	325-360	460
Mn	365	462
Fe	352	455
Co	360	457
Ni	370	479
Cu	303-334	390
Cd	384	463

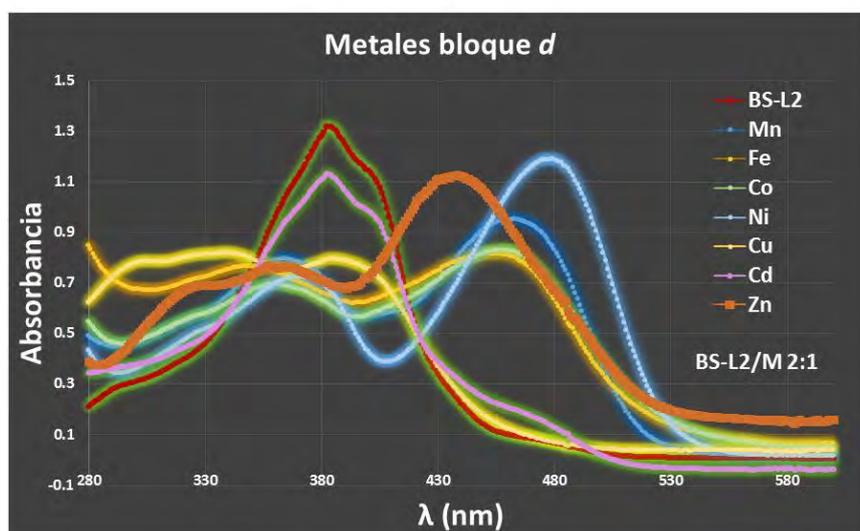
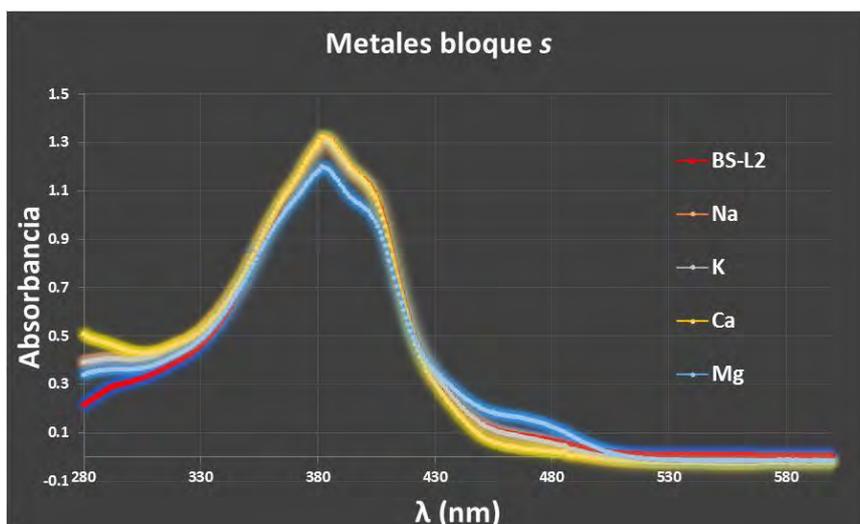


Figura 47. Espectros de absorbancia del BS-L2 en presencia de otros metales.

7.3.1.3. Ligando 7-metoxi-3-(5-metoxi-salicildeneamino)cumarina (BS-L3)

En es espectro de absorbancia para este último ligando (Figura 48) se observa una banda ancha con dos máximos de absorción bien definidos, a **362 nm** ($\epsilon=33061 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y **382 nm** ($\epsilon=35271 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), los cuales como en los anteriores corresponden a las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ de esta base de Schiff.

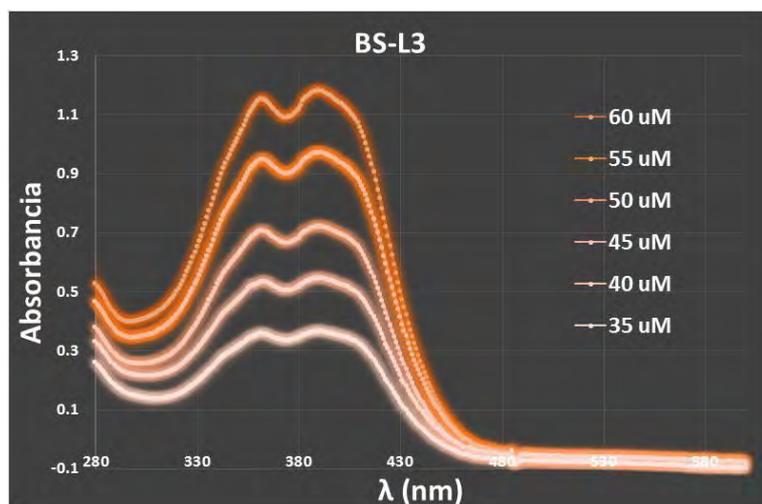


Figura 48. Espectros de absorbancia del **BS-L3** a diferentes concentraciones.

En cuanto al complejo **Zn-BS-L3**, en su espectro UV-Vis mostrado en la **Figura 49** se observa un máximo a **370 nm** ($\epsilon=29459 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) asignable a las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$, y otro a **500 nm** ($\epsilon=17518 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). El espectro muestra un perfil similar al observado para el Zn-BS-L1 con el máximo de absorción de las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ ubicado a la misma longitud de onda; sin embargo, la banda correspondiente al LMCT sufre un notable desplazamiento batocrómico respecto a los otros dos complejos de Zn(II).

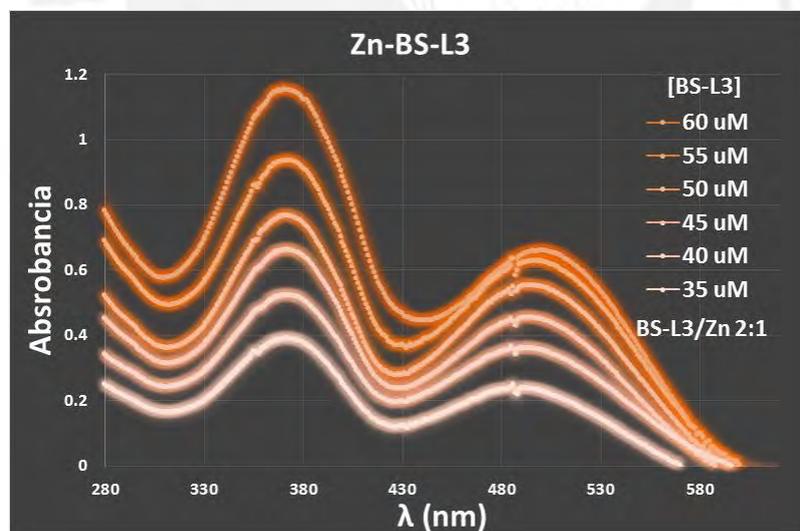


Figura 49. Espectros de absorbancia del **Zn-BS-L3** a diferentes concentraciones y con una relación ligando/metal 2:1.

Asimismo, también se midió el espectro de absorción UV-Vis del ligando **BS-L3** en presencia de acetato de cinc. Al igual que para el caso anterior, los máximos de absorción de los complejos con cloruro y acetato de cinc coinciden en las mismas longitudes de onda y con valores de absorptividad molar muy similares; para las

transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ la banda aparece a **370 nm** ($\epsilon=29191 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y la banda de LMCT aparece a **500 nm** ($\epsilon=17309 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). El espectro UV-Vis correspondiente y el cálculo del coeficiente de absorción molar se muestran en el **Anexo 12.7**.

Finalmente, se analizó el efecto que ejercen otros metales en el espectro de absorción UV-Vis de este ligando. Como se observa en la **Figura 50**, y a semejanza de los dos casos anteriores, en presencia de la mayoría de los iones divalentes de metales de transición estudiados se produce un notable cambio en dichos espectros; se observa el desplazamiento hipsocrómico de la banda $\pi \rightarrow \pi^*$ visto anteriormente, y la aparición de la banda LMCT que evidencia la complejación del ligando al metal. Esta banda se ubica en el rango de 480-530 nm, en una posición cercana a la del complejo de cinc, salvo en el caso del cobre donde sufre el desplazamiento hipsocrómico antes observado. Sin embargo, en caso de este ligando solo se observa una banda λ_{LMCT} débil a 500 nm en presencia del Mn^{2+} , y ninguna para el Cd^{2+} .

Tabla 17. Longitudes de onda de absorción en el UV-Vis del ligando **BS-L3** en estado libre y en presencia de metales de transición propuestos.

	$\lambda_1 (\pi-\pi^*)$	$\lambda_2 (\text{LMCT})$
BS-L3	362-382	
Zn	370	500
Mn	362	501
Fe	355	500
Co	352	480
Ni	372	530
Cu	340	440
Cd	360-390	

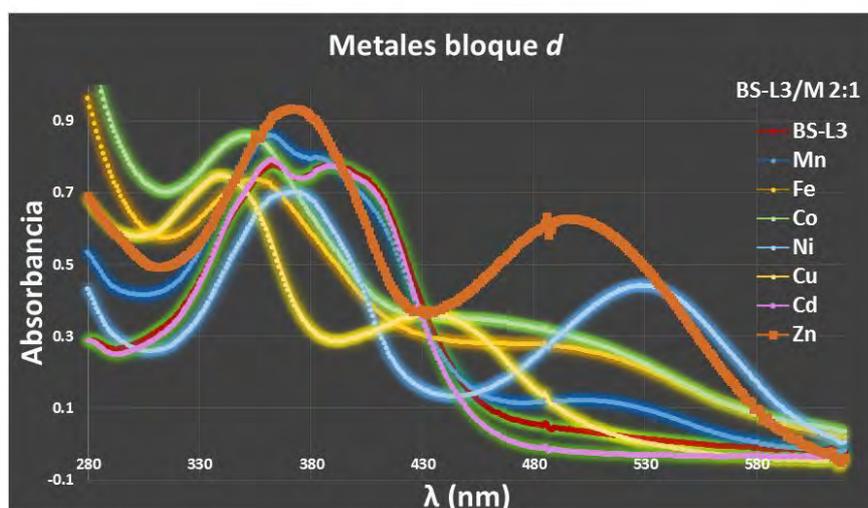
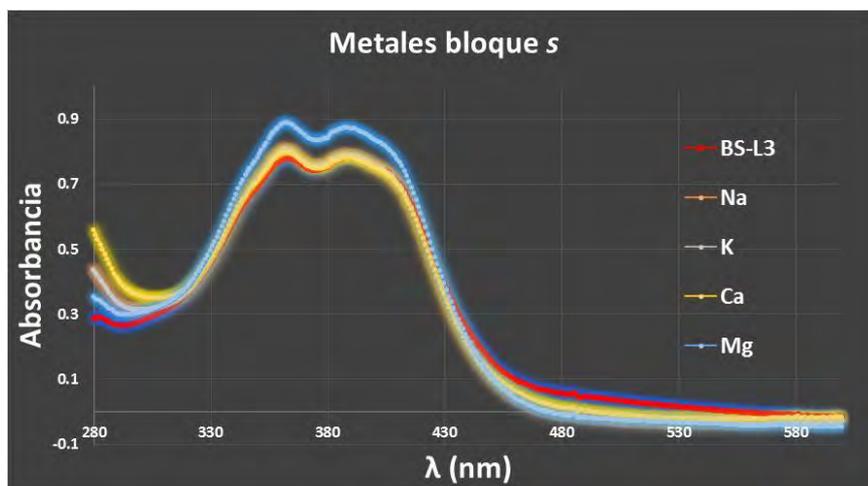


Figura 50. Espectros de absorción del BS-L3 en presencia de otros metales.

7.3.2. Análisis Fluorescente

La selección de un ligando fluoróforo para su potencial uso como biosensor responde a varios criterios. Primero, el sistema debe presentar una alta intensidad fluorescente que no comprometa la fotoestabilidad del ligando. Segundo, las longitudes de onda de excitación (λ_{ex}) deben ser mayores a 340 nm para disminuir el daño celular. Tercero, las longitudes de onda de emisión (λ_{em}) se deben encontrar en el rango visible para evitar posibles interferencias como lo son la absorción celular endógena o autoabsorción por biomoléculas como tirosina, triptofano o NADH.³⁹ Finalmente, debe existir una buena diferenciación entre los máximos de excitación y emisión (desplazamiento de Stokes), ya que esto minimiza una posible interferencia de la luz de excitación, así como, la autoabsorción del fluoróforo.³⁹

Por otro lado, es conocido que los sensores tipo bases de Schiff presentan dos mecanismos de desactivación no radiante, la isomerización del enlace C=N, y la transferencia electrónica fotoinducida (PET), discutidos en el **Acápito 4.4.2** de la parte teórica, los cuales serían inhibidos por la coordinación al metal, en este caso, del Zn(II). En consecuencia, se debe encontrar una λ_{ex} , de preferencia dentro del rango visible, a la cual se produzca una máxima emisión fluorescente del ligando coordinado al metal y una mínima emisión del ligando libre (efecto **turn on**). Asimismo, resulta deseable que la emisión fluorescente del complejo tenga lugar a longitudes de onda mayores, y además, que muestre un desplazamiento de Stokes mayor a 70 nm.⁵¹

Es así que se midieron los espectros de emisión fluorescente a diferentes λ_{ex} de cada uno de los ligandos y de sus respectivos complejos de Zn(II), con el fin de determinar en qué λ_{ex} el efecto **turn on** es más pronunciado. Una vez determinados los parámetros fotométricos, λ_{ex} y λ_{em} , adecuados, se analizó si los ligandos presentan el efecto **turn on** en presencia de otros metales y, además, si estos compiten con el Zn(II) por el sitio de coordinación.

Por otro lado, mediante el análisis del comportamiento fluorescente de los complejos de Zn(II), fue posible determinar la estequiometría de los mismos aplicando el método de Job. De esta manera se propuso una posible estructura del complejo de coordinación en solución.

A continuación, se muestran y discuten por separado los espectros de emisión de cada ligando y su respectivo complejo de Zn(II). Además, se presentan, de modo comparativo, las intensidades fluorescentes determinadas en presencia de otros metales, así como aquellas de estos mismos metales en competencia con el Zn(II). Finalmente, se muestran las gráficas obtenidas por el método de Job para la determinación de la estequiometría de los complejos.

7.3.2.1. Ligando 7-metoxi-3-(salicildeneamino)cumarina (BS-L1)

Para este primer ligando se observó que a una longitud de onda de excitación $\lambda_{ex}=460$ nm el efecto **turn on** es más pronunciado. Además, la coordinación al Zn(II) desplaza la longitud de onda de emisión fluorescente hacia longitudes mayores respecto a la observada en ligando libre, de **585 a 625 nm**.

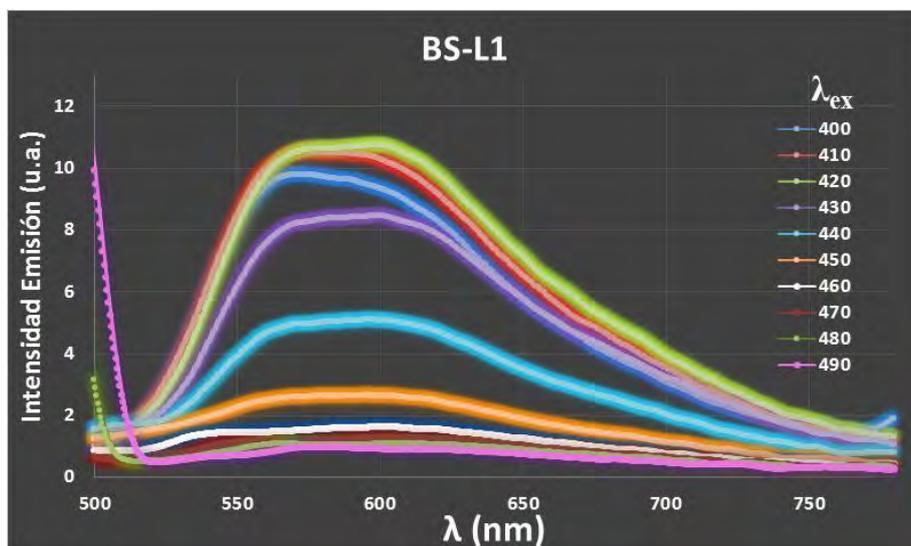


Figura 51. Espectros de emisión de **BS-L1** (6 μM) a diferentes longitudes de onda de excitación.

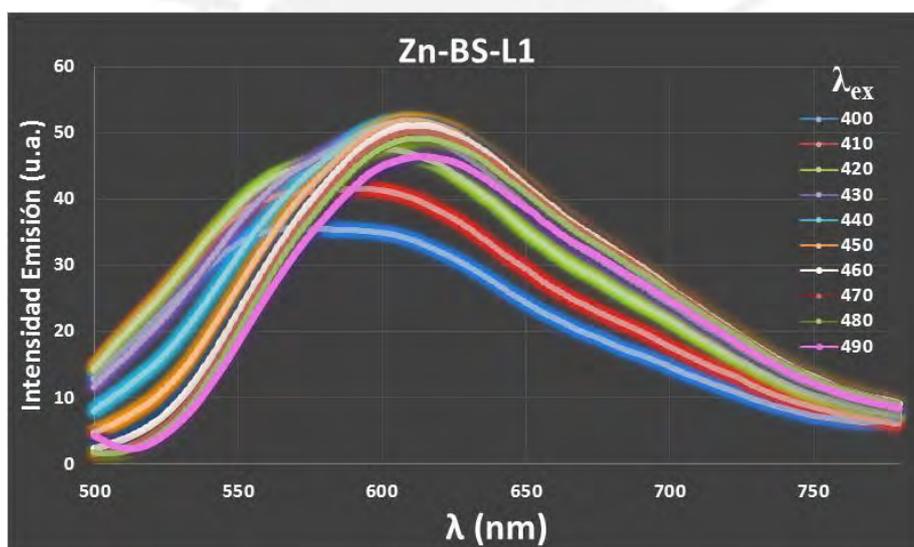


Figura 52. Espectros de emisión de **Zn-BS-L1** (6 μM BS-L1 / 3 μM Zn^{2+}) a diferentes longitudes de onda de excitación.

Como era de esperarse, la complejación al metal produce un incremento en la intensidad fluorescente, que como se discutió anteriormente es atribuido a dos factores. En primer lugar, la complejación de la base de Schiff que podría actuar como un ligando bidentado mediante el N del grupo imino y el $-\text{OH}$ desprotonado, o eventualmente incluso como tridentado si coordina también el $\text{C}=\text{O}$ lactónico, inhibe la isomerización del enlace $\text{C}=\text{N}$ responsable de la desactivación no radiante en el ligando libre. El segundo factor está relacionado con la inhibición por parte del metal del mecanismo de desactivación no radiante, PET, presente en el ligando libre, el cual

a su vez está asociado a la presencia del par libre del nitrógeno imino en la base de Schiff, tal como se muestra en la **Figura 48A**. Como se discutió en el **acápito 4.2.3.1**, el catión Zn^{2+} sería la especie atractora, que al coordinar con el par no enlazante lo estabiliza e inhibe el mecanismo PET, lo que conduce a un considerable aumento de la fluorescencia por quelación conocido como CEF (Chelation Enhanced Fluorescence), tal y como se muestra en la **Figura 48B**.

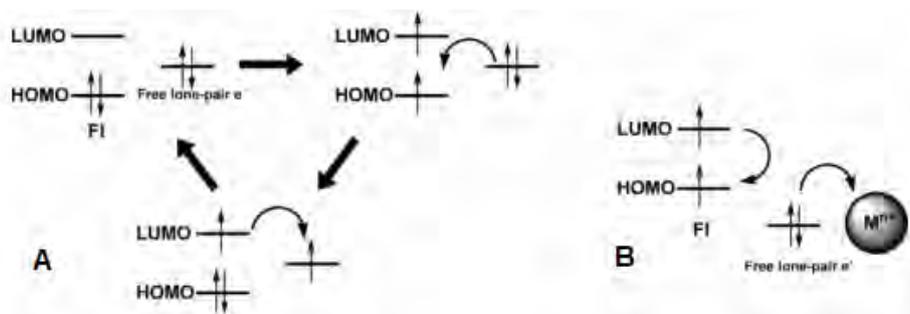


Figura 53. (A) Mecanismo PET para bases de Schiff; (B) Mecanismo CEF.²⁷

Este incremento en la intensidad fluorescente por coordinación al metal es más pronunciado, 30 veces aproximadamente, a una longitud de onda de excitación de **460 nm**, tal y como se muestra en la **Figura 54**.

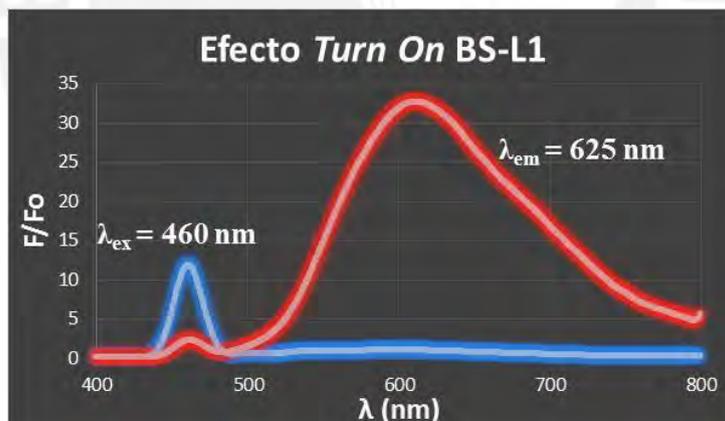


Figura 54. Efecto *Turn On* del **BS-L1** (6 μ M) en presencia de Zn^{2+} (3 μ M); espectro emisión **BS-L1** (azul); espectro de emisión **Zn-BS-L1** (rojo)

Por otro lado, el desplazamiento de Stokes obtenido para el complejo de Zn(II), como se muestra en la **Figura 50**, fue de **165 nm**, valor que permite afirmar que el complejo **Zn-BS-L1** presenta un considerablemente alto desplazamiento de Stokes.⁵¹



Figura 55. Desplazamiento de Stokes para **Zn-BS-L1**.

El siguiente paso consistió en analizar el efecto de otros metales sobre las propiedades fluorescentes del ligando y, además, si estos competían con el Zn(II) por el sitio de coordinación. En la **Figura 56** se presenta una gráfica comparativa de las intensidades fluorescentes del ligando **BS-L1** en presencia de Zn²⁺ y de otros iones metálicos, respecto a aquella del ligando libre.

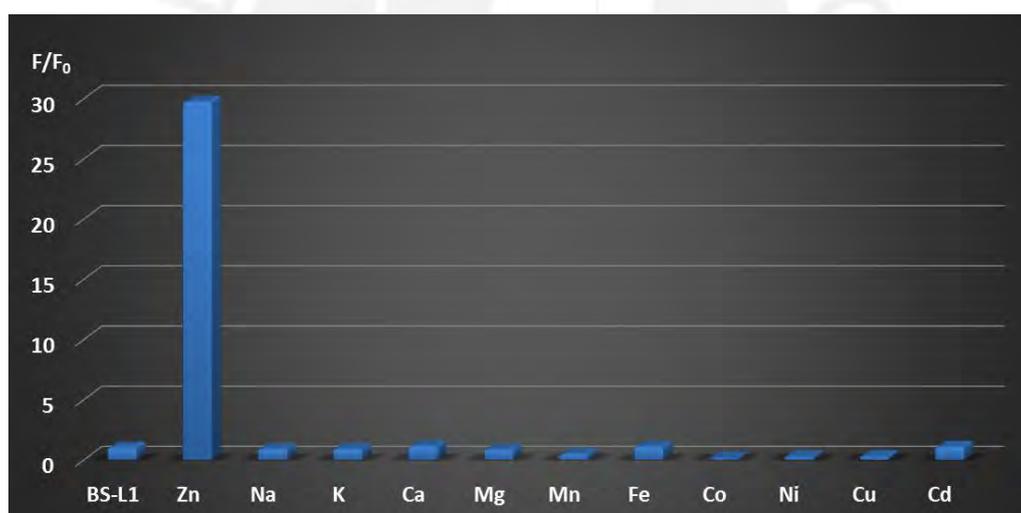


Figura 56. Gráfica comparativa del efecto **turn on** del **BS-L1** (6 μ M) en presencia de iones metálicos.

Como era de esperarse a partir de los espectros de absorción, la no complejación de los metales, como es el caso de Na⁺, Ca²⁺ y Mg²⁺, no produce efecto **turn on**.¹⁶ En el caso de los iones divalentes de los metales Mn, Fe, Co, Ni y Cu, donde se comprobó que ocurría una complejación por parte del ligando, se observa que la fluorescencia se ve inhibida. Este efecto se debe a que estos metales de transición presentan capas *d* parcialmente llenas, lo que conduce a una rápida y eficiente desactivación no radiante por transferencia de energía, como se describió en el **acápito 4.2.3.3**.

En lo que respecta a una posible competencia de estos metales ensayados por el sitio de coordinación, se observa en la **Figura 57**, que los metales del **grupo s** no disminuyen significativamente la intensidad fluorescente. En el caso del Mn^{2+} , a pesar de que de acuerdo al análisis por UV-Vis forma un complejo con el ligando **BS-L1**, se observa que este no compite por el sitio de coordinación con el Zn^{2+} . En cambio, los complejos formados con Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} y Cu^{2+} , aparentemente son más estables y reemplazan al Zn^{2+} en el sitio de coordinación, lo que produce la inhibición de la emisión fluorescente.¹⁴ Esta mayor estabilidad estaría relacionada con la mayor energía de estabilización de campo cristalino presente en los complejos de dichos iones, factor que predominaría en caso de estos sensores sobre el menor tamaño del Zn(II) y la consiguiente mayor acidez de Lewis de sus complejos.

Finalmente, la disminución en un 35% aproximadamente, de la intensidad fluorescente del complejo **Zn-BS-L1** en presencia de Cd^{2+} se podría atribuir a la formación de un complejo **Cd-BS-L1** que coexistirá con uno más estable de Zn^{2+} ; lo que resulta consistente con la presencia de una banda LMCT muy débil en el espectro UV-Vis del **BS-L1** en presencia de este metal. La mayor estabilidad del complejo de Zn(II) estaría relacionada con su mayor acidez de Lewis.

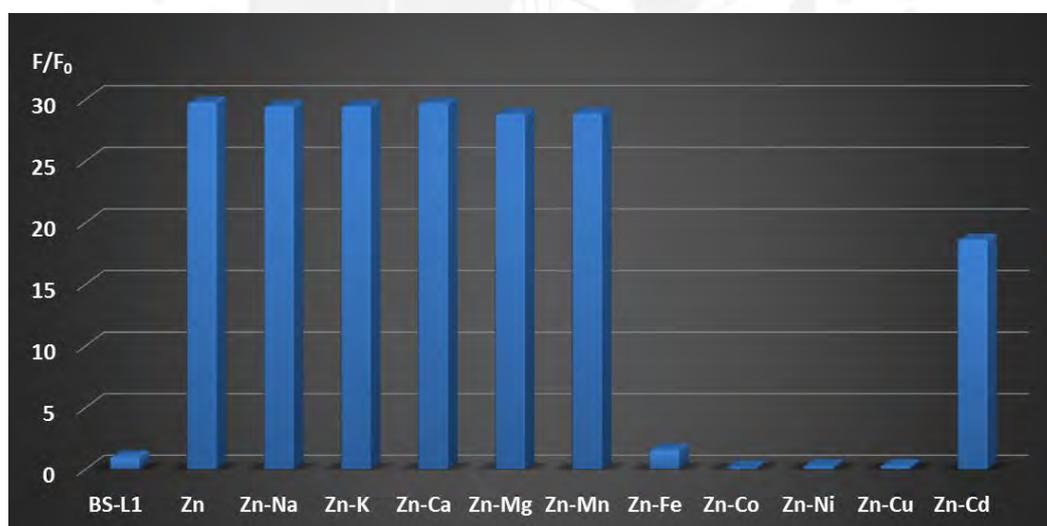


Figura 57. Gráfica comparativa del efecto *turn on* del **Zn-BS-L1** (6 uM) en presencia de otros iones metálicos.

7.3.2.2. Ligando 7-metoxi-3-(4-metoxi-salicildeneamino)cumarina (**BS-L2**)

Para el segundo ligando, **BS-L2**, se observó que a una longitud de onda de excitación $\lambda_{ex} = 490 \text{ nm}$ el efecto *turn on* es más pronunciado. Además, al igual que en el

complejo, **Zn-BS-L1**, la coordinación al metal desplaza la longitud de onda de emisión hacia longitudes mayores, de **558 a 575 nm**.

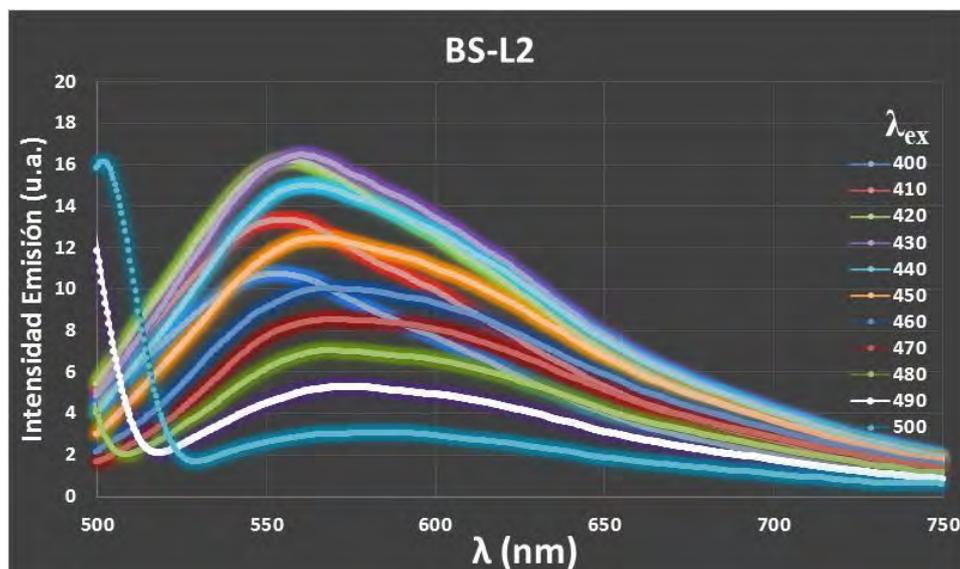


Figura 58. Espectros de emisión de **BS-L2** (6 μ M) a diferentes longitudes de onda de excitación.

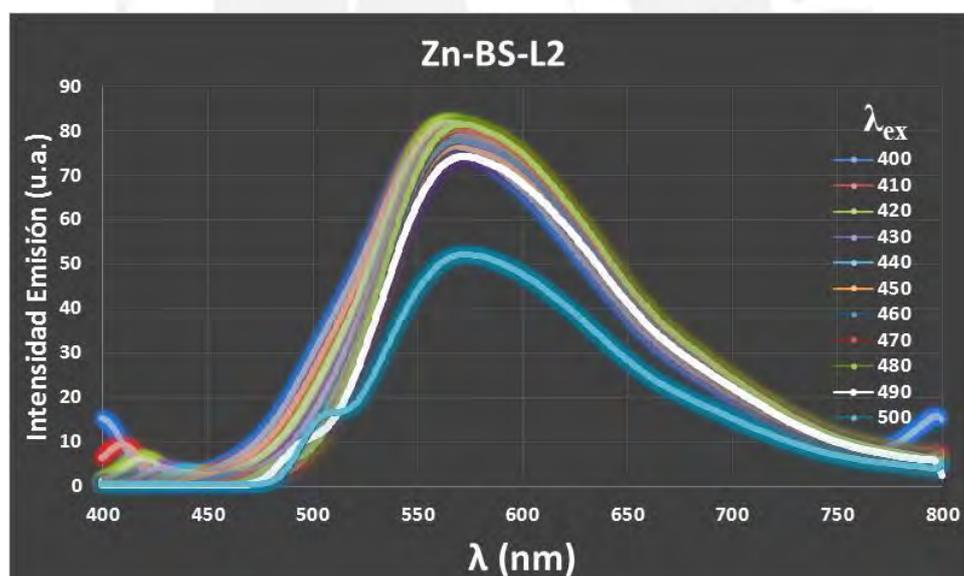


Figura 59. Espectros de emisión de **Zn-BS-L2** (6 μ M BS-L1 / 3 μ M Zn²⁺) a diferentes longitudes de onda de excitación.

Al igual que en el primer ligando, la complejación del metal promueve el incremento en la intensidad fluorescente. En este caso la intensidad fluorescente se incrementa en 14 veces aproximadamente, respecto del ligando libre como se observa en la **Figura 60**.

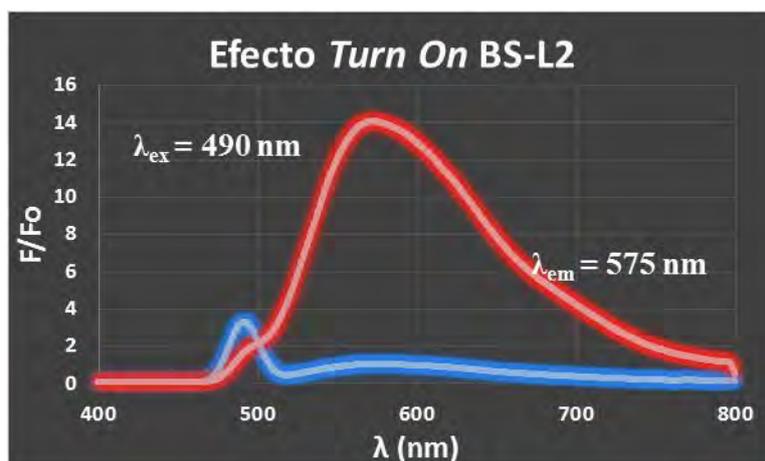


Figura 60. Efecto *Turn On* del **BS-L2** (6 μM) en presencia de Zn^{2+} (3 μM); espectro de emisión **BS-L2** (azul); espectro de emisión **Zn-BS-L2** (rojo)

El desplazamiento de Stokes en caso del complejo **Zn-BS-L2** fue de **140 nm**, como se observa en la **Figura 61**. Aunque este valor es algo menor que en el caso del complejo **Zn-BS-L1**, continúa siendo considerablemente alto.⁵¹



Figura 61. Desplazamiento de Stokes para **Zn-BS-L2**.

En la **Figura 62**, se compara la intensidad fluorescente del ligando libre con aquella en presencia de $\text{Zn}(\text{II})$ y de los otros metales seleccionados para este estudio. Se aprecia que, a semejanza de lo observado para el ligando **BS-L1**, el efecto *turn on* solo tiene lugar en presencia de Zn^{2+} .

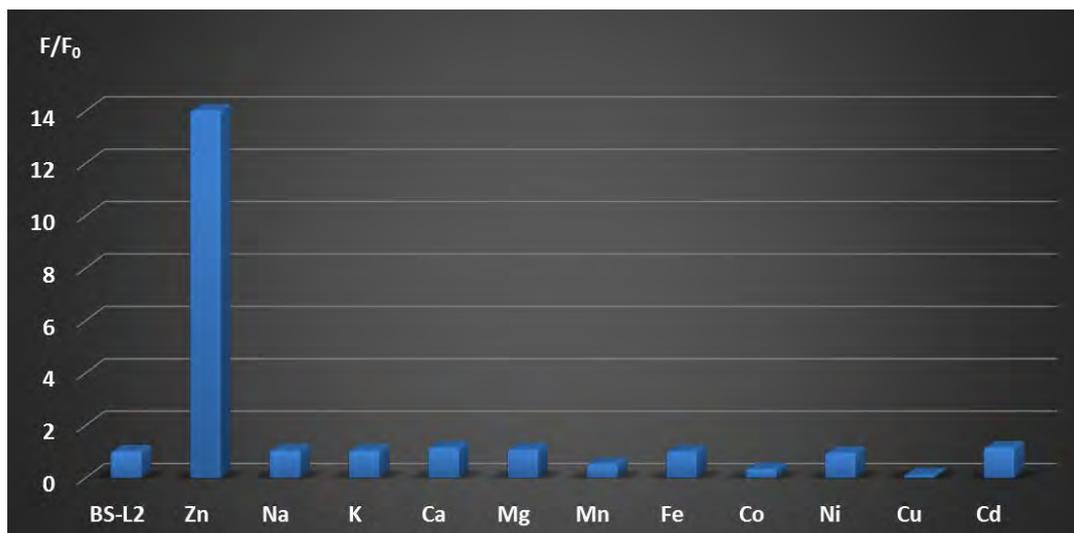


Figura 62. Gráfica comparativa del efecto *turn on* del **BS-L2** (6 uM) en presencia de iones metálicos.

Asimismo, al analizar la competencia por el sitio de coordinación entre el Zn^{2+} y otros iones metálicos, se observó un comportamiento similar al del primer ligando, tal y como se observa en la **Figura 63**. Tanto el Mn^{2+} como los iones de los metales del **grupo s** no interfieren en la complejación y, por ende, tampoco en el efecto *turn on* del Zn^{2+} sobre el ligando **BS-L2** en cuestión. En contraste, los iones Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} y Cu^{2+} inhiben completamente la fluorescencia. Por otro lado, como se observó para el complejo Zn-BS-L1, el Cd^{2+} causa una disminución del efecto *turn on*, en este caso del 28% aproximadamente.

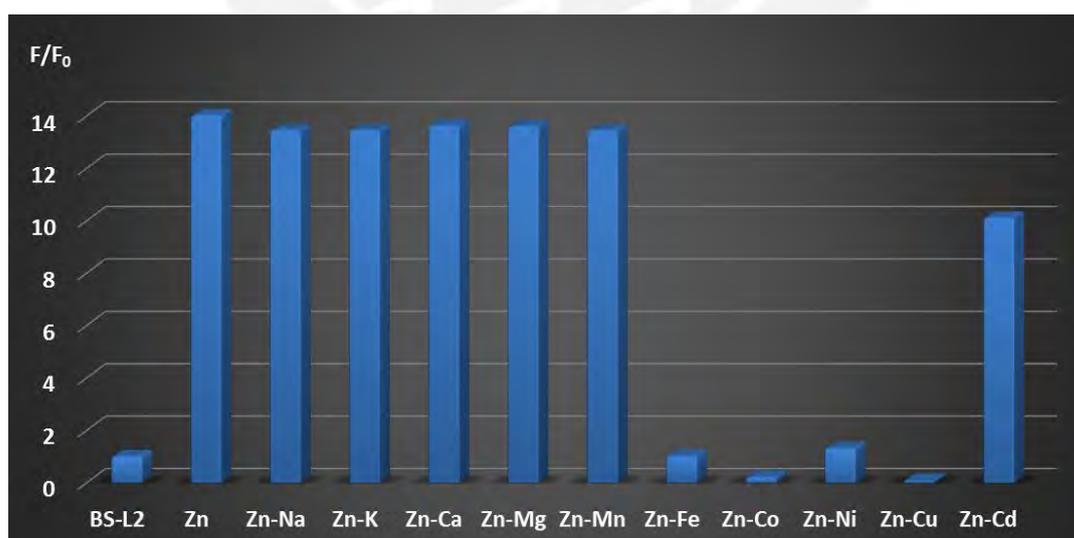


Figura 63. Gráfica comparativa del efecto *turn on* del **Zn-BS-L2** (6 uM) en presencia de otros iones metálicos.

7.3.2.3. Ligando 7-metoxi-3-(4-metoxi-salicildeneamino)cumarina (BS-L3)

Para el caso de este último ligando, sorprendentemente, no se observó el esperado **turn on** por complejación del Zn^{2+} . Si bien se observa un mínimo aumento (de 0.78 a 3.25 u.a.) de la emisión fluorescente en el rango de longitudes de onda de excitación 460-490 nm con respecto al ligando libre, este es de apenas cuatro veces y resulta en una emisión muy débil. A longitudes de onda inferiores la emisión fluorescente se mantiene o incluso disminuye.

Los resultados negativos con este ligando, no justificaron continuar con el estudio del efecto fluorescente en presencia de otros metales ni la evaluación de la competencia por el sitio de coordinación.

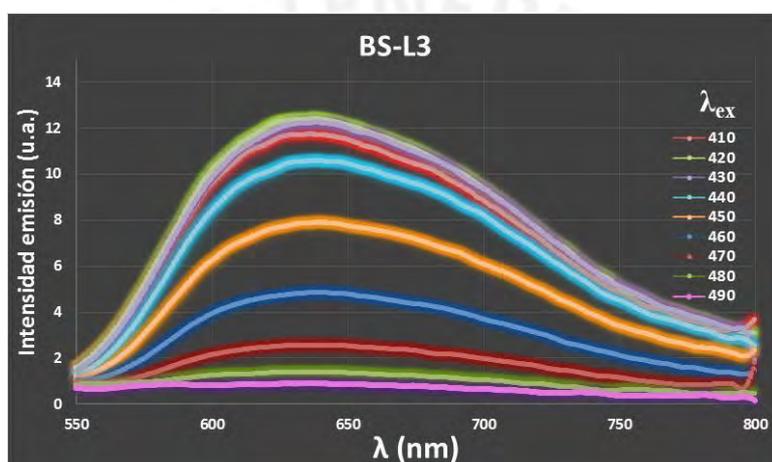


Figura 64. Espectros de emisión de **BS-L3** (6 μ M) a diferentes longitudes de onda de excitación.

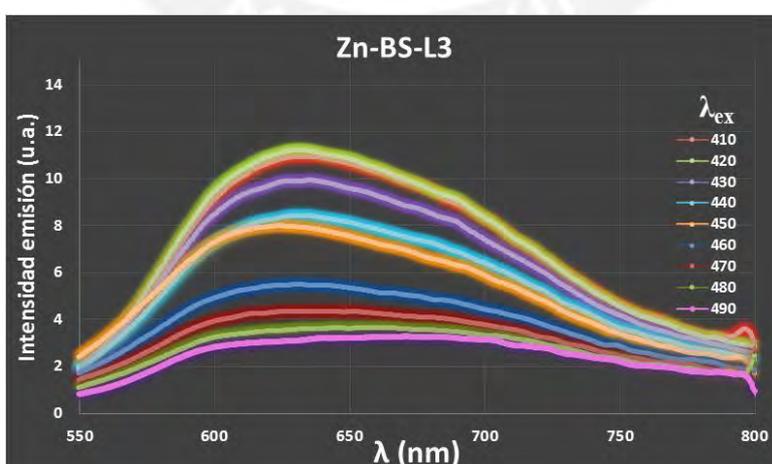


Figura 65. Espectros de emisión de **Zn-BS-L3** (6 μ M BS-L1 / 3 μ M Zn^{2+}) a diferentes longitudes de onda de excitación.

En base a los espectros de emisión fluorescente obtenidos para los ligandos y complejos de Zn(II) se podría concluir que a pesar de que el **BS-L1** posee un mayor factor de aumento en su intensidad en presencia de Zn²⁺ a aquel observado para el **BS-L2**, este último ligando sería un mejor sensor dado que presenta una intensidad relativa mayor que el primer ligando, tal y como se observa en la **Figura 66**.

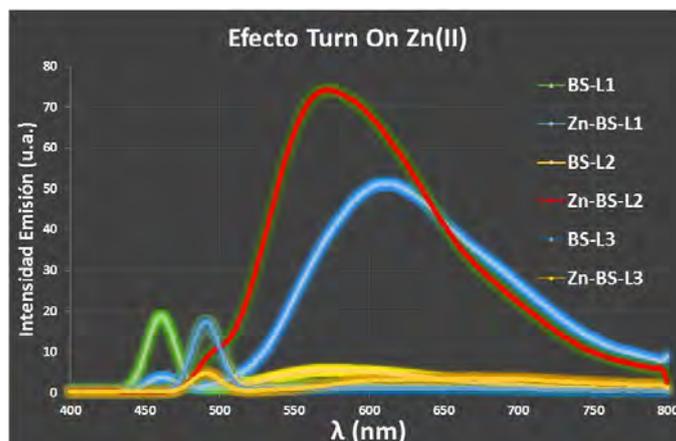


Figura 66. Gráfica comparativa del efecto *turn on* de los tres sensores sintetizados.

7.3.2.4. Precursor 7-metoxi-3-aminocumarina (Prec-3A)

Adicionalmente se analizó el efecto que ejerce la derivatización a base de Schiff del sustituyente amino en la posición 3 sobre las longitudes de excitación y emisión fluorescente. Con este fin se obtuvieron los espectros de emisión de la **7-metoxi-3-aminocumarina** (6μM, DMF/HEPES 10% v/v) a diferentes λ_{ex} , desde **320 a 380 nm**. En los espectros de emisión obtenidos se observó una disminución progresiva en la intensidad fluorescente situada a **410 nm**; también se exploró a λ_{ex} mayores, pero no observó emisión fluorescente alguna.

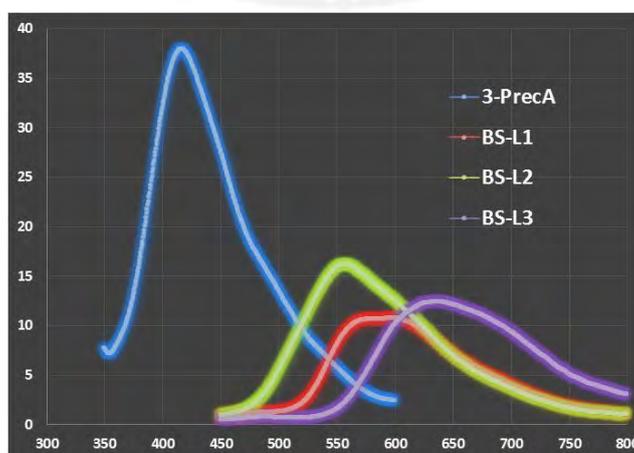


Figura 67. Espectro comparativo de la 7-metoxi-3-aminocumarina (6 μM)

En la **Figura 67** se comparan los espectros de emisión de los tres ligandos bases de Schiff ($\lambda_{\text{ex}} = 420 \text{ nm}$) y del precursor **Prec-3A** ($\lambda_{\text{ex}} = 320 \text{ nm}$); se observa que en caso de los ligandos la emisión fluorescente sufre un fuerte desplazamiento batocrómico ($\Delta\lambda_{\text{em}} = 150\text{-}220 \text{ nm}$), lo que es producto de la conjugación extendida del sistema aromático en estas bases de Schiff. Además, se observa una disminución de la intensidad fluorescente respecto al precursor, la cual se relacionaría con la desactivación no radiante por isomerización del enlace C=N en las bases de Schiff, proceso ausente en el precursor.

7.3.3. Determinación de la estequiometría de los complejos

Para poder determinar la estequiometría de los complejos en solución se utilizó el método de Job, en donde se midió la intensidad fluorescente mientras se variaba la fracción molar del ligando. La fracción molar teórica para un complejo 1:1 es de 0.5 y para un complejo 2:1 es de 0.66.

Para el primer ligando, **BS-L1**, se utilizó $\lambda_{\text{ex}} = 460 \text{ nm}$ y se midió la variación de la fluorescencia a un $\lambda_{\text{em}} = 625 \text{ nm}$. Como se observa en la **Figura 68**, las dos rectas se intersecan en el valor de fracción molar **0.68**, muy cercano al valor teórico de 0.66 para un complejo 2:1.

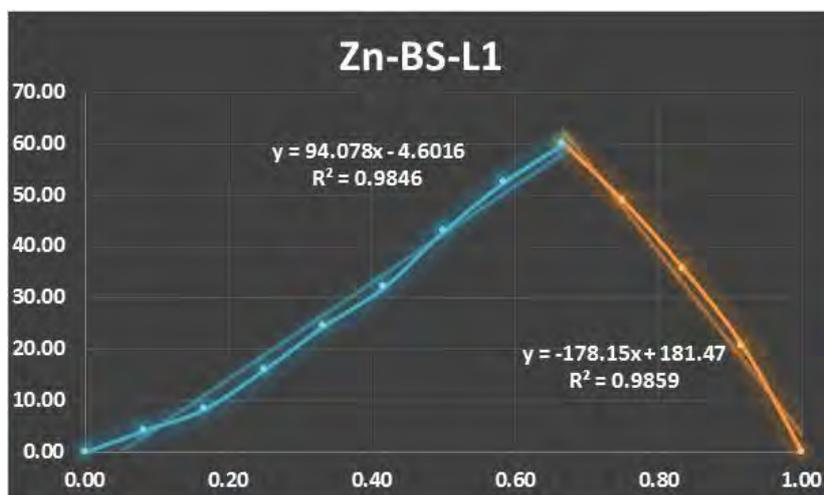


Figura 68. Gráfica de Job de intensidad fluorescente vs fracción molar [Ligando]/[Ligando+Metal] del complejo **Zn-BS-L1**.

Para el ligando, **BS-L2**, los parámetros utilizados fueron: $\lambda_{\text{ex}} = 490 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 575 \text{ nm}$. Como se observa en la **Figura 69** el valor experimental de la fracción molar fue de 0.68, al igual que para el primer complejo.

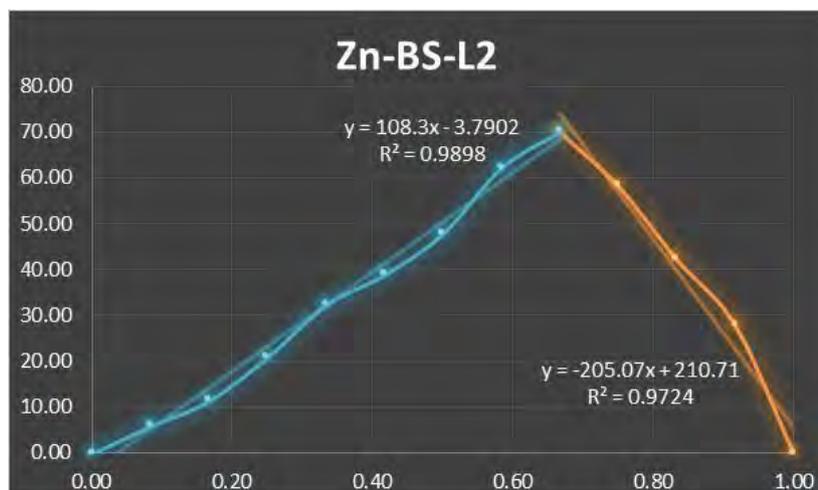


Figura 69. Gráfica de Job de intensidad fluorescente vs fracción molar [Ligando]/[Ligando+Metal] del complejo **Zn-BS-L2**.

Los resultados obtenidos sugieren que el complejo formado en solución presenta una estequiometría ligando/metal 2:1.

8. PROPUESTA ESTRUCTURAL

En base a los resultados obtenidos por las técnicas de UV-Vis y fluorescencia se propondrán posibles estructuras para los complejos fluorescentes de Zn(II) formados en solución.

En los espectros de absorción UV-Vis de los ligandos en presencia de Zn²⁺ se observó la formación de la banda de transferencia de carga ligando-metal lo que indica una complejación efectiva por parte de los tres ligandos. Asimismo, los espectros UV-VIS obtenidos al cambiar la fuente del metal no mostraron ningún cambio, lo que permite concluir que este último no formaría parte de la esfera de coordinación de dichos complejos.

Además, el hecho que la coordinación al Zn(II) aumente considerablemente la intensidad de la emisión fluorescente de los ligandos **BS-L1** y **BS-L2** en presencia de este metal respecto a aquella del ligando libre, permitió en estos casos aplicar el método de Job por el cual se determinó la relación molar ligando/metal en dichos complejos. El valor 0.68 obtenido es muy cercano al teórico de 0.66 para una relación molar 2:1 ligando-metal.

Se proponen tres posibles estructuras para los complejos **BS-L1** y **BS-L2**. Si el sensor sintetizado actuara como un ligando bidentado, vía N imino y el O⁻, podrían darse dos estructuras, la primera correspondería a un complejo tetraédrico (**Figura 70A**) y la segunda a uno octaédrico (**Figura 70B**). En esta última dos moléculas de agua del solvente completarían la esfera de coordinación. En ambos casos, la coordinación al Zn²⁺ vía N y O⁻ daría lugar a un complejo neutro. Cabe destacar, que dicha coordinación inhibiría los dos mecanismos de desactivación y promovería la fluorescencia como se ha comprobado experimentalmente.

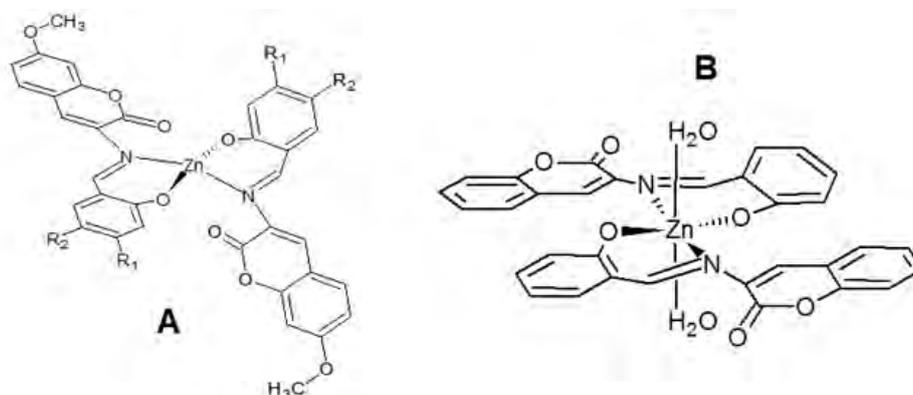


Figura 70. (A) Complejo tetraédrico de Zn(II). (B) Complejo octaédrico de Zn(II).

Por otro lado, si el sensor actuara como un ligando tridentado la única geometría posible sería la octaédrica, en la cual cada uno de los dos ligandos ocuparía tres posiciones coplanares en dicho arreglo, tal como se observa en la **Figura 71**. De esta manera al estar involucrados también el N y el O⁻ en la coordinación, se promovería el efecto *turn on* y el complejo resultante sería neutro.

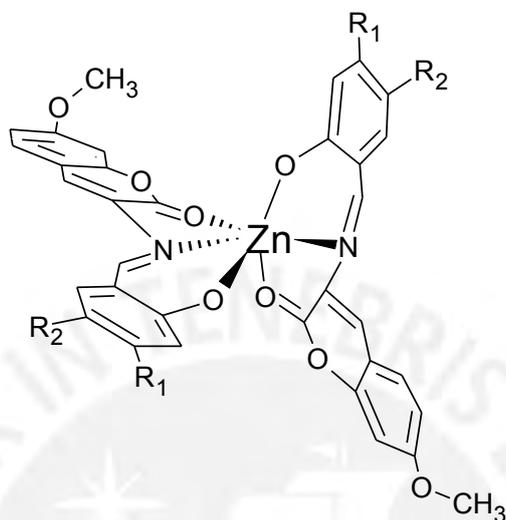


Figura 71. Complejo octaédrico de Zn(II) con ligando tridentado.

Esta última estructura concuerda con la propuesta mediante modelación computacional por Mondal¹³ y colaboradores para un complejo de Zn(II) 2:1 con un sensor cumarínico base de Schiff relacionado.

Por otro lado, cabe mencionar que tanto Wang como Xi proponen en cambio una estequiometría 1:1 para otros sensores bases de Schiff cumarínicos relacionados; sin embargo, dichos autores no la determinan por el método de Job sino por titulación fotométrica.^{15,16}

9. CONCLUSIONES

- Se sintetizaron por un procedimiento optimizado tres ligandos bases de Schiff derivados de la 7-metoxi-3-aminocumarina, dos de los cuales no se encuentran reportados en la literatura. Además, se logró incrementar el rendimiento reportado por Kudale para el precursor 7-metoxi-3 acetoamidocumarina de 20 a 40%.
- Las mediciones fluorescentes se realizaron en un medio predominantemente acuoso (DMF/H₂O 1:9 v/v), lo que es conveniente para una posible aplicación de estos sensores a nivel biológico.
- El sensor 7-metoxi-3-(4-metoxi-salicildeneamino)cumarina exhibió mayor intensidad fluorescente en presencia de Zn²⁺ con un factor de aumento de 14 veces respecto al ligando libre, inferior al de 30 veces mostrado por el sensor 7-metoxi-3-(salicildeneamino)cumarina.
- Ambos sensores presentaron longitudes de onda de excitación y emisión dentro del rango visible. El sensor 7-metoxi-3-(4-metoxi-salicildeneamino)cumarina presentó una emisión fluorescente a 575 nm a una λ_{ex} de 490 nm y con un desplazamiento de Stokes de 140 nm, mientras que la emisión del 7-metoxi-3-(salicildeneamino)cumarina se produce a 625 nm a una λ_{ex} de 460 nm y con un desplazamiento de Stokes de 165 nm.
- El efecto fluorescente **turn on** no fue observado en presencia de otros cationes metálicos propuestos que son de interés biológico. Este efecto **turn on** solo se ve inhibido cuando el Zn²⁺ compite por el sensor con los iones Fe²⁺, Co²⁺, Ni²⁺ y Cu²⁺.
- Se comprobó el efecto fluorescente **turn on** esperado por coordinación al Zn²⁺ en dos de los tres sensores cumarínicos bases de Schiff propuestos.
- Se comprobó la complejación efectiva de los tres ligandos al Zn²⁺ por la aparición de la banda de transferencia de carga ligando-metal en los espectros de absorción UV-Vis.
- Se determinó una relación molar 2:1 ligando/metal por el método de Job para los complejos fluorescentes de Zn(II) formados en solución.
- Se comprobó que la extensión en la conjugación de la 3-aminocumarina produce un fuerte desplazamiento hacia el rojo de las λ_{ex} ($\Delta = 100$ nm) y λ_{em} ($\Delta = 150-220$ nm) y, además, disminuye la intensidad fluorescente. Ambos factores resultan convenientes para que tenga lugar el efecto **turn on**.

10. RECOMENDACIONES

- Sintetizar los complejos de Zn(II) con los tres ligandos bases de Schiff y caracterizarlos por las técnicas espectroscópicas (FTIR, RMN, MS) y analíticas (TG, AAS, análisis elemental) usuales.
- Realizar ensayos de cristalización para los complejos de Zn(II) correspondientes.
- Explorar otros posibles receptores que incorporen en su estructura dos anillos condensados y que ofrezcan un sitio de coordinación capaz de mejorar la selectividad por el Zn(II).



11. BIBLIOGRAFÍA

1. Lim, N.; Freake, H.; Brückner, C.; *Illuminating Zinc in Biological Systems*, Chem. Eur. J. 2005, 11, 38-49.
2. Bowman, B.; Russel, R.; *Conocimientos actuales sobre nutrición*, 8va Edición, 2003, pp 360-373.
3. Li, H.; Gao, S.; Xi, Z.; *A colorimetric and "turn on" fluorescent chemosensor for Zn(II) based on coumarin Schiff-base derivative*, Inorg. Chem. Commun. 2009, 12, 300-303.
4. Kimura, E.; Aoki, S.; *Chemistry of Zinc (II) fluorophore sensor*, BioMetals 2001, 14, 191-204.
5. Xu, Z.; Yoon, J.; Spring, D.; *Fluorescent chemosensors for Zn²⁺*, Chem. Soc. Rev. 2010, 39, 1996-2006.
6. Czarnik, A.; *Crosstalk; Desperately seeking sensors*, Chemistry and Biology 1995, 2, 423-428.
7. Wagner, B.; *The Use of Coumarins as Environmentally-Sensitive Fluorescent Probes of Heterogeneous Inclusion Systems*, Molecules, 2009, 14, 210-237.
8. Jung, H.; Ko, K.; *Rationally Designed Fluorescence Turn-On Sensors: A New Design Strategy Based on Orbital Control*, Inorg. Chem., 2010, 49, 8552–8557.
9. Brückner, C.; Lim, N.; *DPA-substituted coumarins as chemosensors for zinc(II): modulation of the chemosensory characteristics by variation of the position of the chelate on the coumarin*, Chem. Commun., 2004, 1094-1095.
10. Yoon, J.; Jung, Y.; Jeon, R.; Kim, J.; Swamy, K.; *New 7-Hydroxycoumarin-Based Fluorescent Chemosensors for Zn(II) and Cd(II)*, Bull. Korean Chem. Soc., 2010, 31,(12), 3611-3616.
11. Guo, Y.; Peng, M.; Lei, G.; Dong, B.; Song, Z.; *Novel selective fluorescent probes for sensing Zn²⁺ ions based on a coumarin Schiff-base*, Tetrahedron Lett., 2013, 54, 4945–4949.
12. Yan, Z.; Li, T.; Yan, M.; *A novel coumarin Schiff-base as a Zn(II) ion fluorescent sensor*, Inorg. Chem., 2011, 14, 463-465.

13. Mondal, T.; Pramanik, A.; Sarkar, D.; *Coumarin based fluorescent 'turn-on' chemosensor for Zn²⁺: An experimental and theoretical study*, J. Lumin., 2014, 146, 480-485.
14. Su, Z.; Chen, K.; Guo, Y.; Qi, H.; Yang, X.; Zhao, M.; *A Coumarin-Based Fluorescent Chemosensor for Zn²⁺ in Aqueous Ethanol Media*, L. Fluoresc., 2010, 20, 851-856.
15. Wu, J.; Liu, W.; Zhuang, X.; Wang, F.; Wang, P.; Tao, S.; Zhan, X.; Wu, S.; Lee, S.; *Fluorescence Turn On of Coumarin Derivatives by Metal Cations: A New Signaling Mechanism Based on C=N Isomerization*, Org. Lett. 2007, 9, 33-36.
16. Li, H.; Gao, S.; Xi, Z.; *A colorimetric and "turn on" fluorescent sensor*, Biometals, 2001, 14, 191-204.
17. Pechin, G.; *Absorción, metabolismo y homeostasis del zinc en los animales y el hombre*, Ciencia Veterinaria, 2012, 14, (1), 93-125.
18. Chasapis, C.; Loutsidou, A.; *Zinc and human health: an update*, Arch Toxicol, 2012, 86, 521-534.
19. Alarcón-Corredor, O.; *Los elementos traza*, Revista Médica de la Extensión Portuguesa, 2009, 4, 3, 107-124.
20. Oh, D.; Shin, S.; Lee, S.; Kang, J.; Kim, S.; Ryu, P.; Hahm, K.; Kim, Y.; *Biochemistry*, 2000, 39, 11855-11864.
21. Chausmer, A.B.; *Zinc, Insulin and Diabetes*, Journal of the American College of Nutrition, 1998, 17, (2), 109-115.
22. Sakurai, H.; Adachi, Y.; *Oral Administration of Zinc Complex improves Type 2 Diabetes and Metabolic Syndromes*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 2006, 351, 165-170.
23. Jansen, J.; Karges, W.; Rink, L.; *Zinc and diabetes – clinical links and molecular mechanisms*, The Journal of Nutritional Biochemistry, 2009, 20, 399-417.

24. Cuevas, J.; De Eusebio, E.; Díez, E.; Castiñeira I.; *Cirugía de Mohs: Aplicación de la técnica a neoplasias del pene*, Actas Urol Esp., 2007, 31, 9, 1076-1081.
25. Skoog, D.A.; Holler, F.J.; Nieman, T.A.; *Principles of Instrumental Analysis*, 5th Edition, Saunders College Pub, 1998, pp. 355-376.
26. Valeur, Bernard; *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*, Wiley-VCH Verlag GmbH, 2001, pp. 273-307.
27. Kim, J.; Quang, D.; *Calixarene-Derived Fluorescent Probes*, 2007, 170, 3780-3799.
28. Kachkovski, O.; Tolmachev, O.; Kobryn, L.; Bila, E.; Ganushchak, M.; *Absorption spectra and nature of electron transitions in azomethine dyes as 6-derivatives of 2H-2-chromenone*, Dyes and Pigments 2004, 63, 203-211.
29. Lock, O.; *Investigación Fotoquímica: Métodos en el estudio de Productos Naturales*, Fondo Editorial PUCP, 1998, pp. 146-147.
30. Tang, L.; Yu, J.; Leng, Y.; Feng, Y.; Yang, Y.; Ji, R.; *Synthesis and Insulinsensitizing Activity of a Novel Kind of benzopyran derivative*, Bioorg. Med. Chem. Lett. 2003, 13, 3437-3440.
31. Lim, N.; Schuster, J.; Porto, M.; Tanudra, M.; Yao, L.; Freake, H.; Brückner, C.; *Coumarin-Based Chemosensors for Zinc(II): Toward the Determination of the Design Algorithm for CHEF-Type and Ratiometric Probes*, Inorg. Chem., 2005, 44, 2018-2030.
32. Czarnik, A.; Crosstalk; *Desperately seeking sensors*, Chemistry and Biology, 1995, 2, 423-428.
33. Li, H.; Cai, L.; Chen, Z.; *Coumarin-Derived Fluorescent Chemosensors*, Advances in Chemical Sensors, Wen Wang Ed., 2012, pp. 121-150.
34. Johnson, J. E.; Morales, N. M.; Gorczyca, A. M.; Dolliver, D. D.; McAllister, M. A.; *Mechanism of Acid-Catalyzed Z/E Isomerization of Imines*, J. Org. Chem., 2001, 66, 7979-7985.
35. Traven, V. F.; Ivanov, I. V.; Panov, A. V.; Safranova O. B.; Chibisova, T. A.; *Solvent-induced E/Z(C=N)-isomerization of imines of some hydroxy-substituted formylcoumarins*, Russ. Chem. Bull., Int. Ed., 2008, 57, 9, 1989-1995.

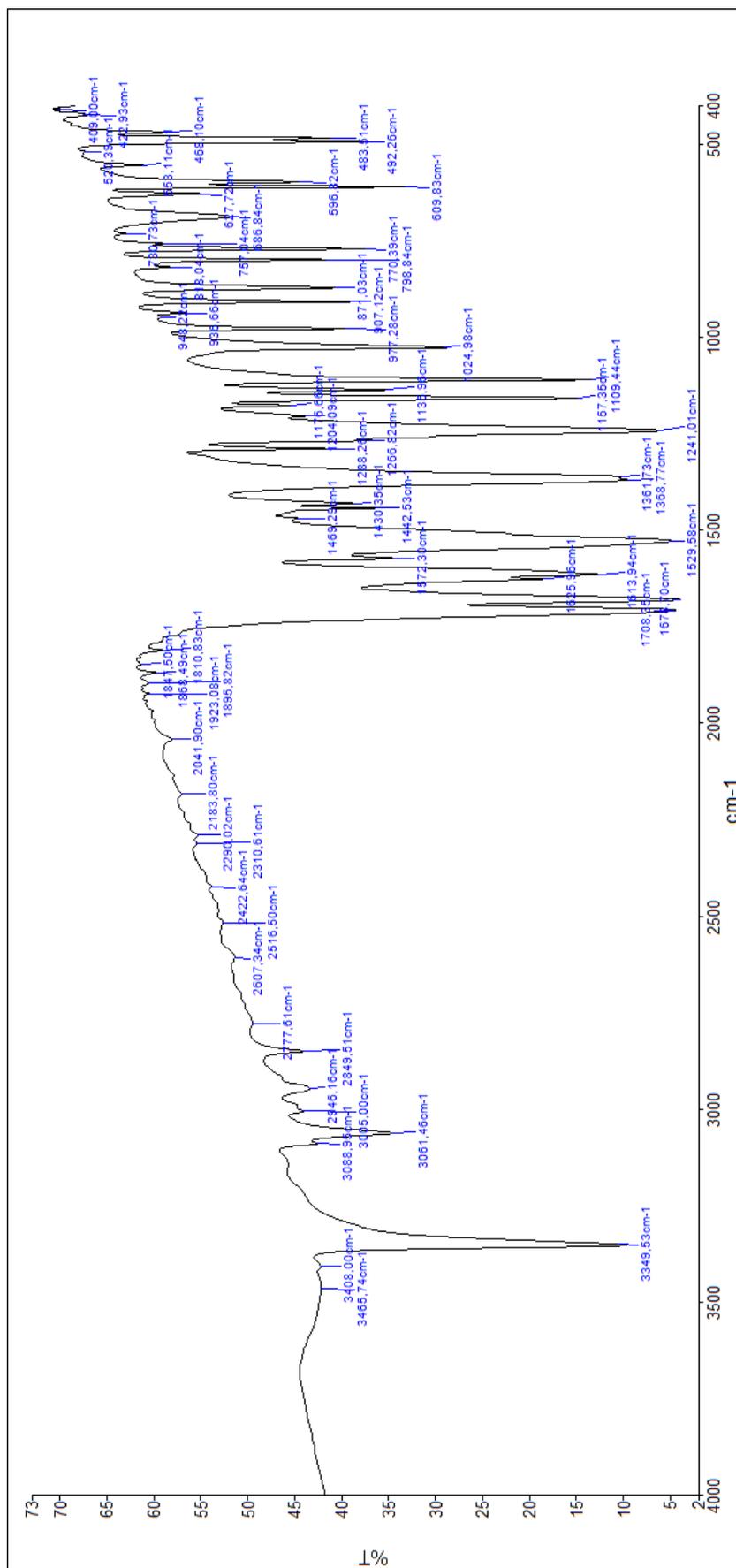
36. Sarkar, D.; Kumar, A.; Kumar, T.; *Coumarin based fluorescent 'turn-on' chemosensor for Zn²⁺: An experimental and theoretical study*, Journal of Luminescence, 2014, 146, 480–485.
37. Lv, Y.; Cao, M.; Li, J.; Wang, J.; *A Sensitive Ratiometric Fluorescent Sensor for Zinc(II) with High Selectivity*, Sensors, 2013, 13, 3131-3141.
38. Yang, Z.; Li, S.; Li, C.; *Development of a coumarin-furan conjugate as Zn²⁺ ratiometric fluorescent probe in ethanol-water system*, Spectrochim. Acta A, 2017, 174, 214-222.
39. Pershagen, E.; *Development and Multicolor Imaging Applications of Lanthanide-Based Luminescent Probes*, Uppsala Universitet, Acta Universitatis Upsaliensis Uppsala 2014, 15-16.
40. Kudale, A.; Kendall, J.; Warford, C.; Wilkins, N.; Bodwell, G.; *Hydrolysis-free Synthesis of 3-Aminocoumarins*, Tetrahedron Lett., 2007; 48(29), 5077-5080.
41. Maddi, V.; Mamledesai, S.N.; Satyanarayana, D.; Swamy, S.; *Synthesis and Antiinflammatory Activity of Substituted (2-oxochromen-3-yl)benzamides*, Indian J. Pharm. Sci., 2007, 69, 6, 847-849.
42. Creaven, B.S.; Devereux, M.; Karcz, D.; Kellett, A.; McCann, M.; Noble, A.; Walsh, M.; *Copper (II) complexes of coumarin-derived Schiff bases and their anti-Candida activity*, J. Inorg. Biochem. 2009, 103, 1196-1203
43. Connor, D. T. (1981). *U.S. Patent No. US 4287126A*. Washington,DC: U.S.
44. García-Beltrán, O.; Aliaga, M.; *Coumarin-Based Fluorescent Probes for Dual Recognition of Copper(II) and Iron(III) Ions and Their Application in Bio-Imaging*, Sensors, 2014, 14, 1358-1371.
45. Ravinder, V.; Vasam, S.; Goskula, S.; Kotte, S.; *Synthesis and Spectral Characterization of 3-Amino Coumarin based new Schiff base and its Metal Complexes*, J. Chem. Pharm. Sci., 2014, 5, 11-14.
46. Koo, L.; Zhang, Y.; Ng, S.; *7-Methoxy-3-(salicylideneamino)-coumarin*, Acta Cryst., 2000, C56, e350-e351.
47. Creaven, B.; Devereux, M.; Karcz, D.; Kellett, A.; McCann, M.; Noble, A.; Walsh, M.; *Copper(II) complexes of coumarin-derived Schiff bases and their anti-Candida activity*, J. Inorg. Biochem., 2009, 103, 1196-1203.

48. Ravinder, V.; Vasam, S.; Srikanth, G.; Shylaja, K.; *Synthesis of physico-chemical characterization and antimicrobial activity of Cobalt(II), Nickel(II) and Zinc(II) complexes with new Schiff base ligand of 3-amino coumarin*, Int. J. Modern Chem. Appl. Sci., 2016, 3, (1), 301-305.
49. Cho, B.; Lim, C.; Pradhan, T.; Lee, J.; Bhuniya, S.; Kim, J.; Kim, S.; Lee, S. *Fluorescent turn-on Zn²⁺ sensing in aqueous and cellular media*, Sens. Actuator B-Chem, 2011, 160, 1489-1493.
50. Chang, C.; He, Q.; Dodani, S.; *A Turn-On Fluorescent Sensor for Detecting Nickel in Living Cells*, J. Am. Chem. Soc., 2009, 131, 18020-18021.
51. WO 2010093726 A2, 2017.07.15, párrafo [0032]

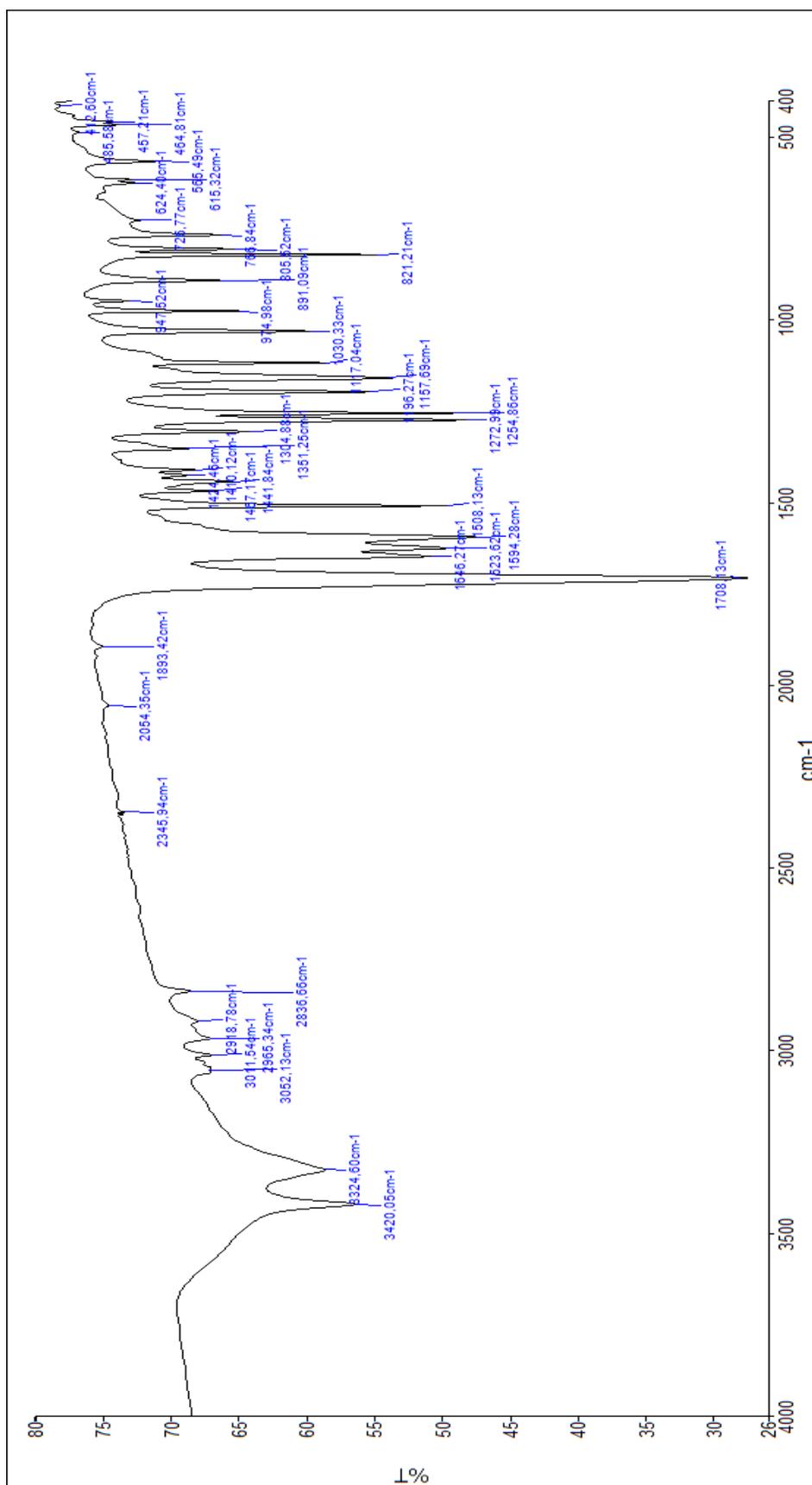


ANEXO 12.1

ESPECTROS FTIR DE LOS PRECURSORES CUMARÍNICOS



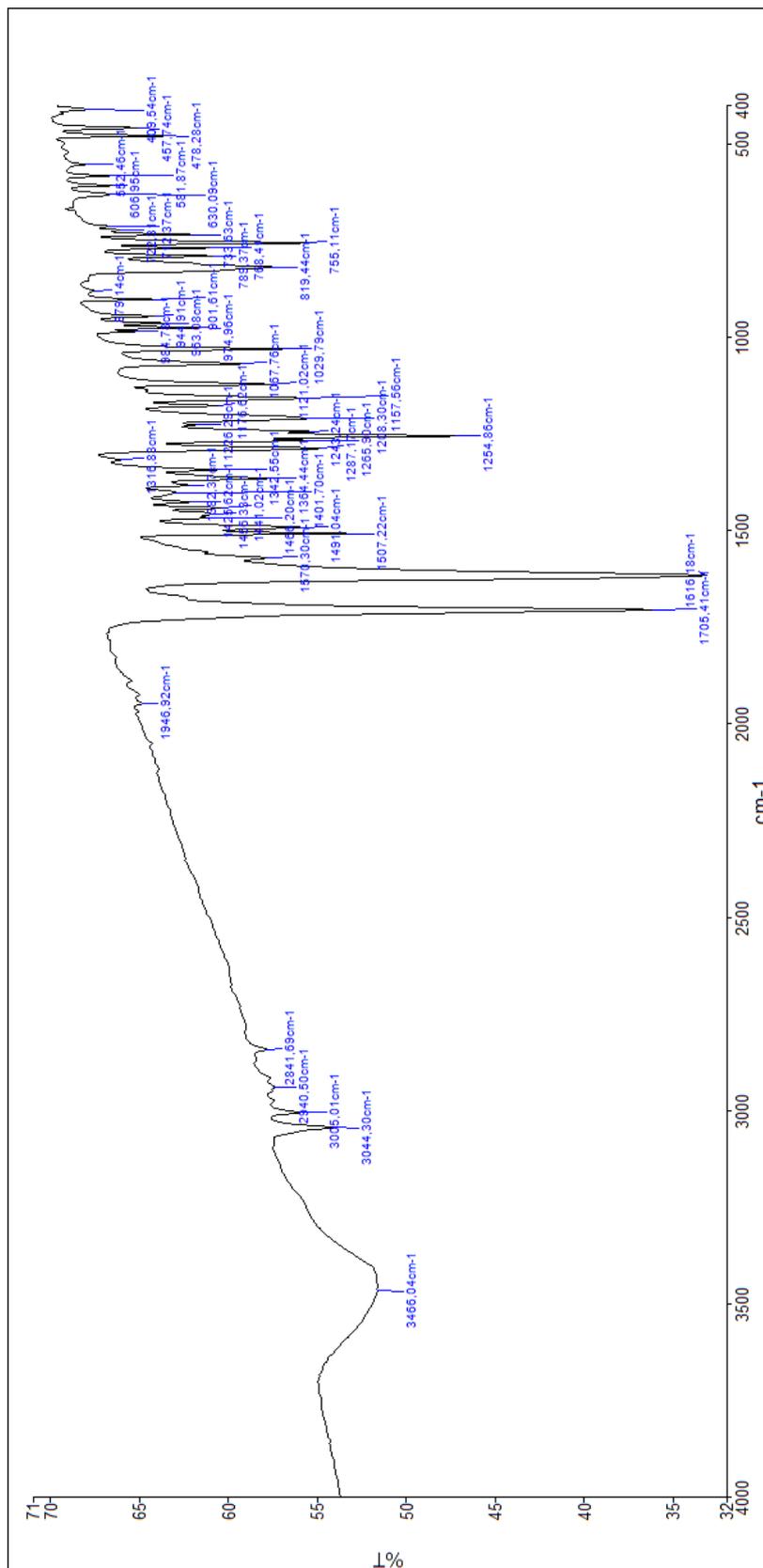
12.1.1 Espectro FTIR del precursor 7-metoxi-3-acetoamidocumarina (Prec-3AA).



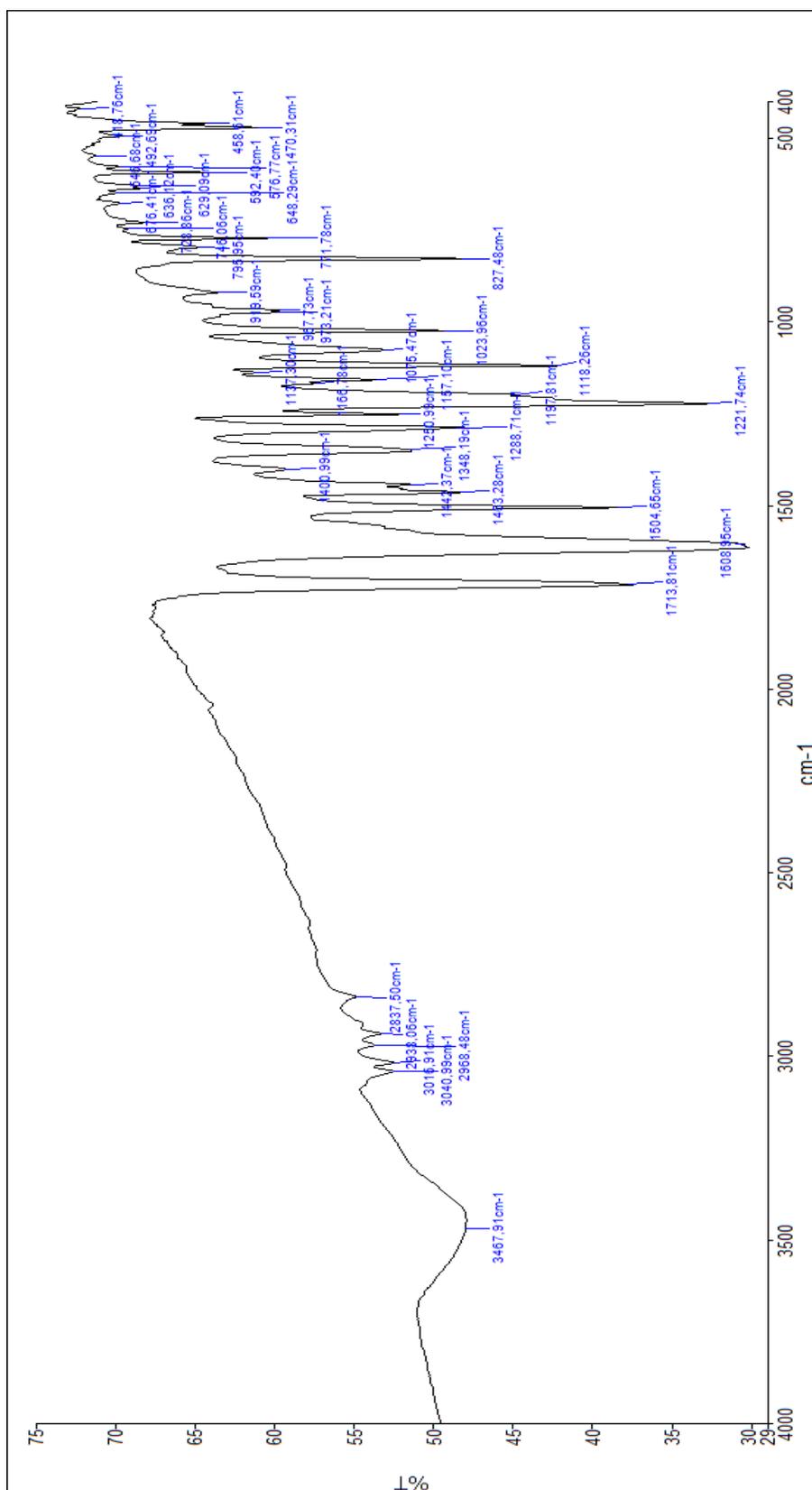
12.1.2 Espectro FTIR del precursor 7-metoxi-3-aminocumarina (Prec-3A).

ANEXO 12.2

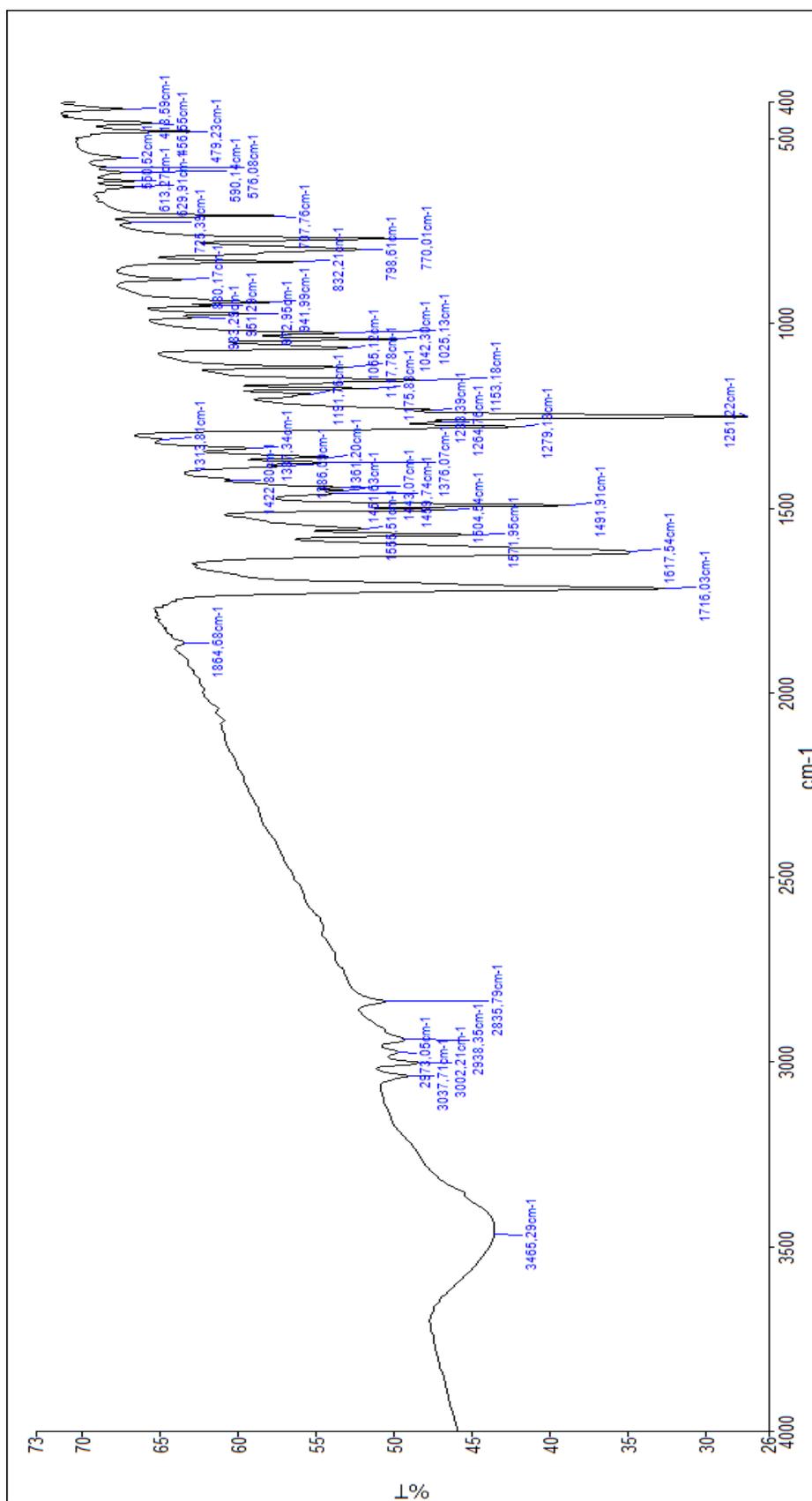
ESPECTROS FTIR DE LOS LIGANDOS BASES DE SCHIFF



12.2.1 Espectro FTIR del ligando 7-metoxi-3-(salicilidencamino)cumarina (BS-L1).



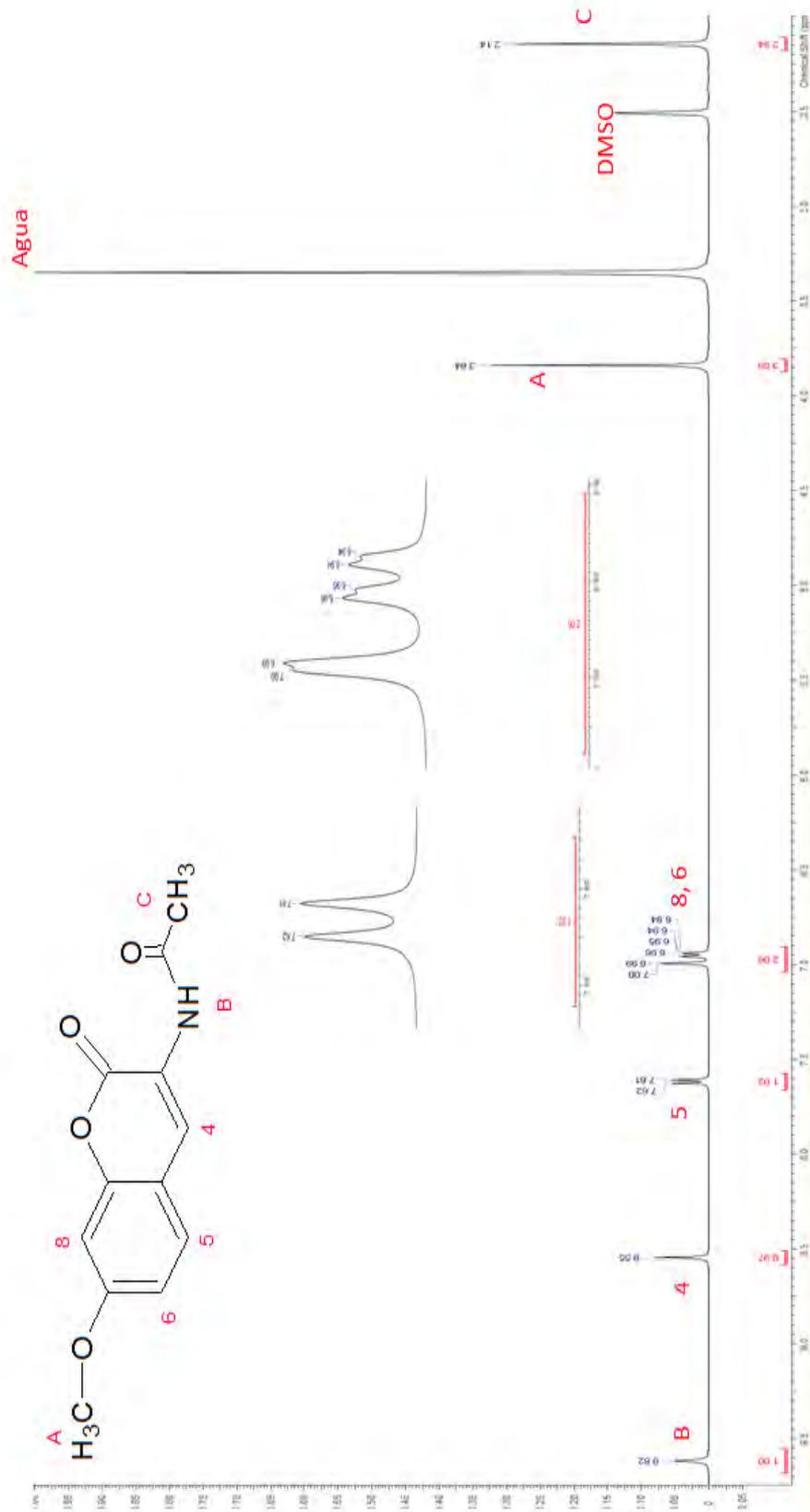
12.2.2 Espectro FTIR del ligando 7-metoxi-3-(4-metoxi-saligideneamino)cumarina (BS-L2).



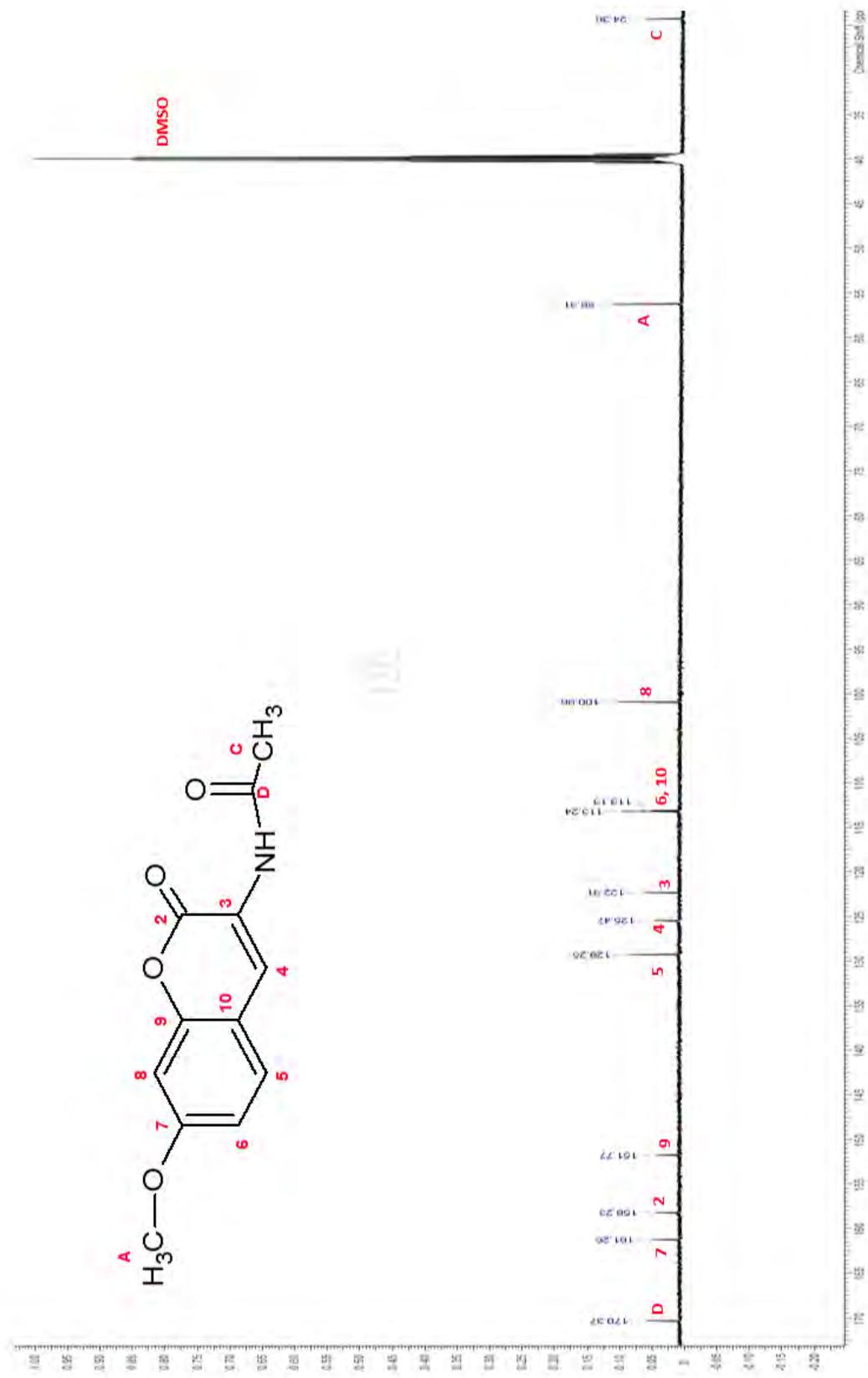
12.2.3 Espectro FTIR del ligando 7-metoxi-3-(5-metoxi-salicylideneamino)cumarina (BS-L3).

ANEXO 12.3

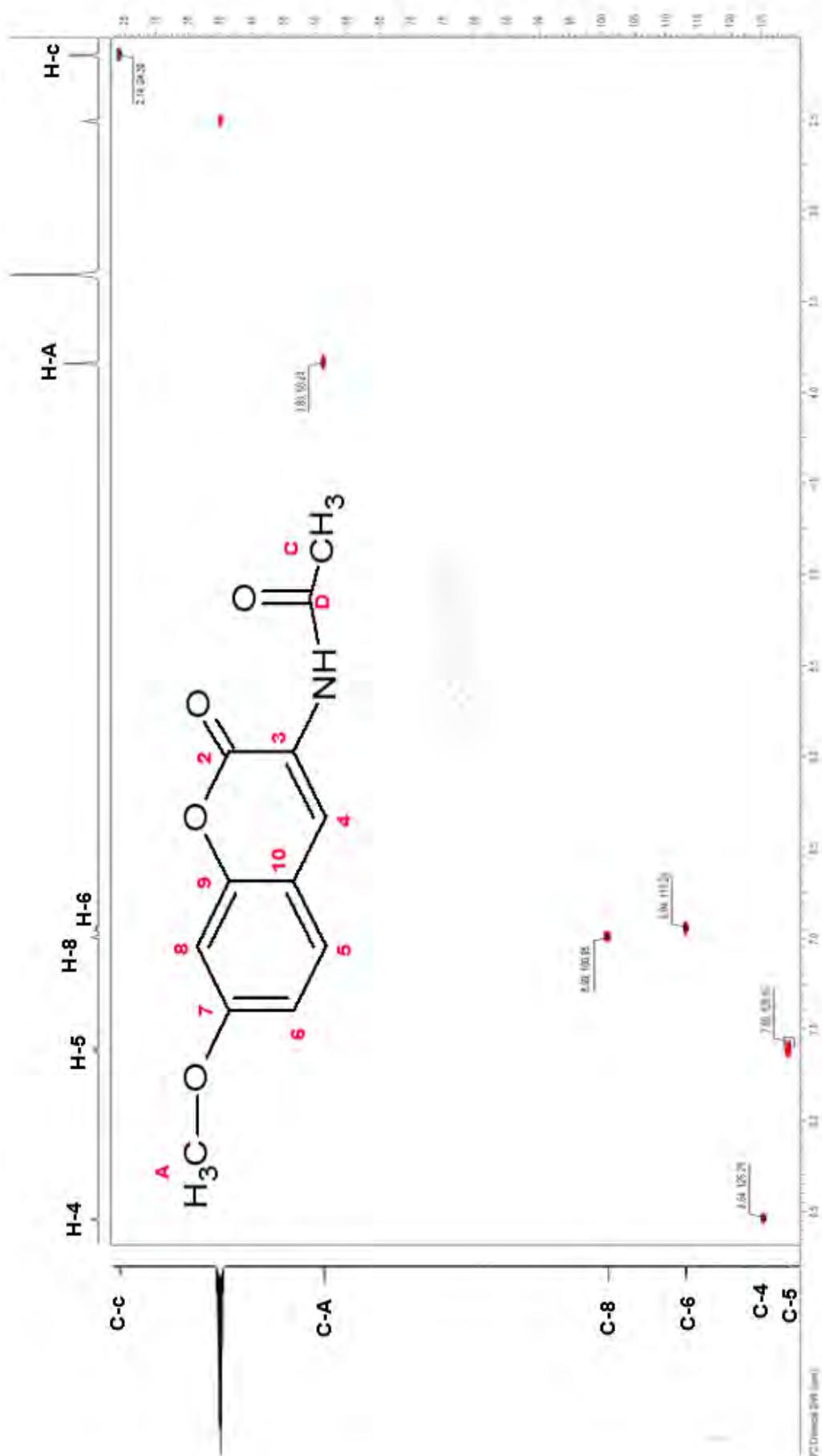
ESPECTROS RMN DE LOS PRECURSORES CUMARÍNICOS



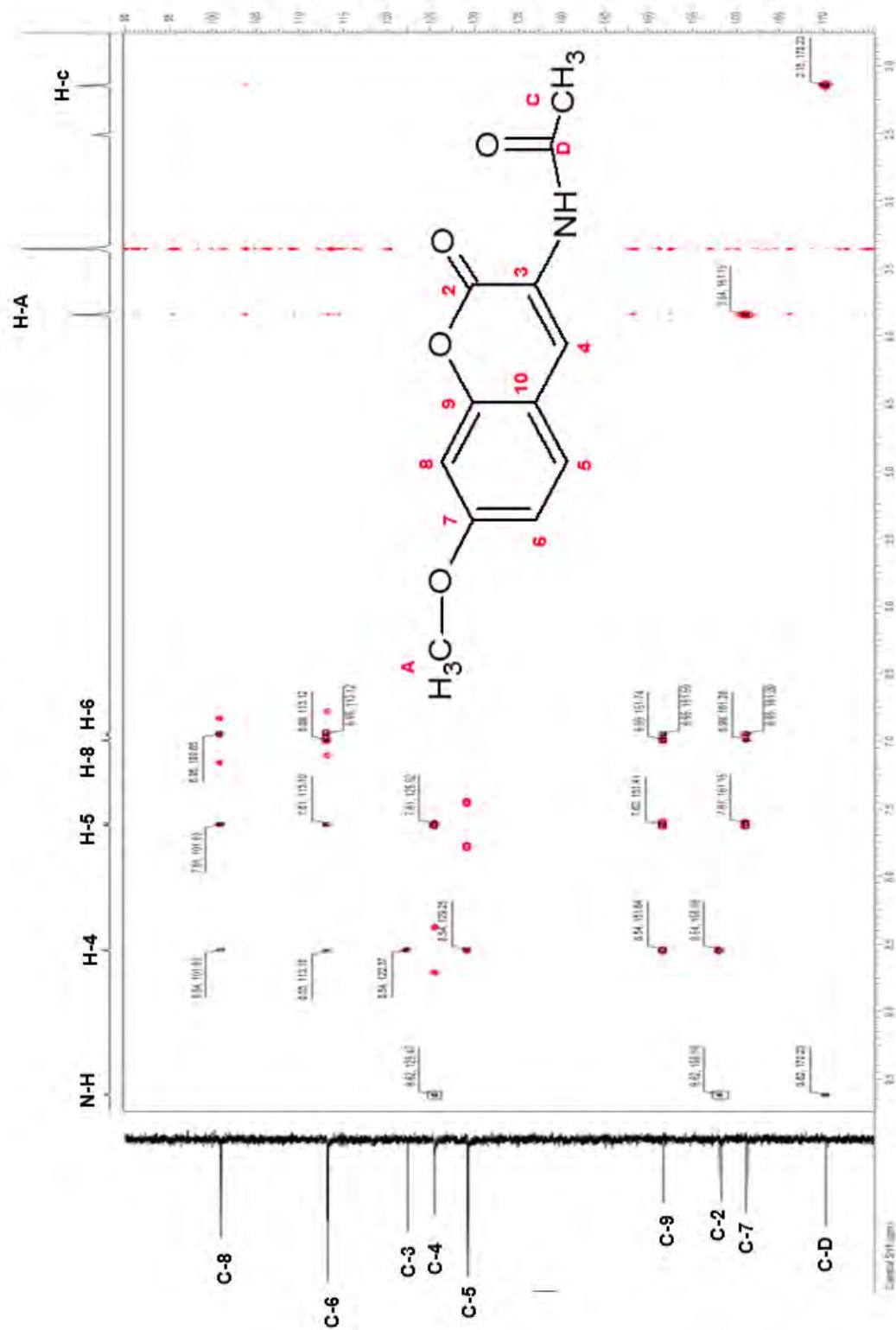
12.3.1 Espectro ¹H-RMN del precursor 7-metoxi-3-acetamidocumarina (Prec-3AA).



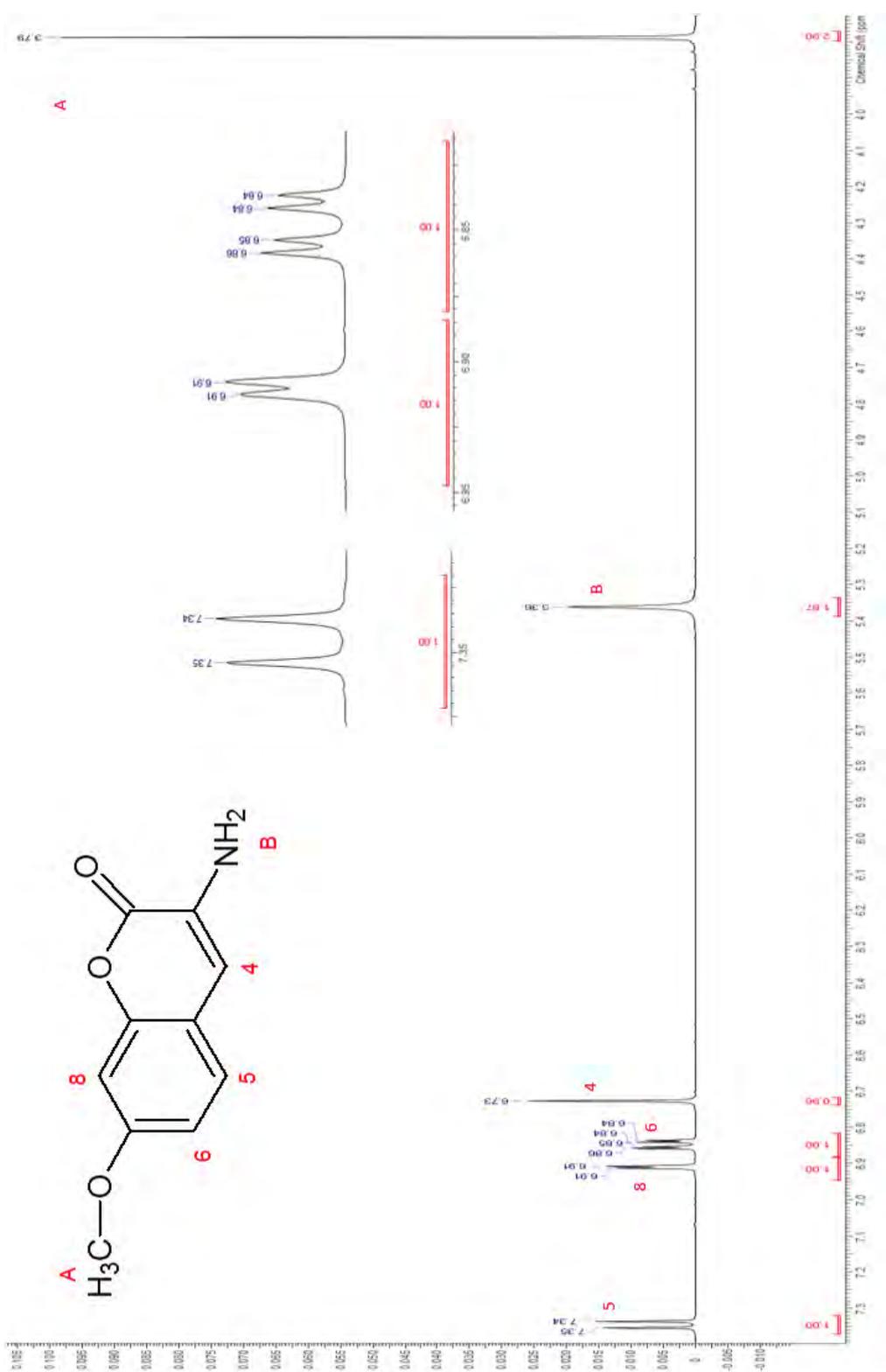
12.3.2 Espectro ¹³C-RMN del precursor 7-metoxi-3-acetoamidocumarina (Prec-3AA).



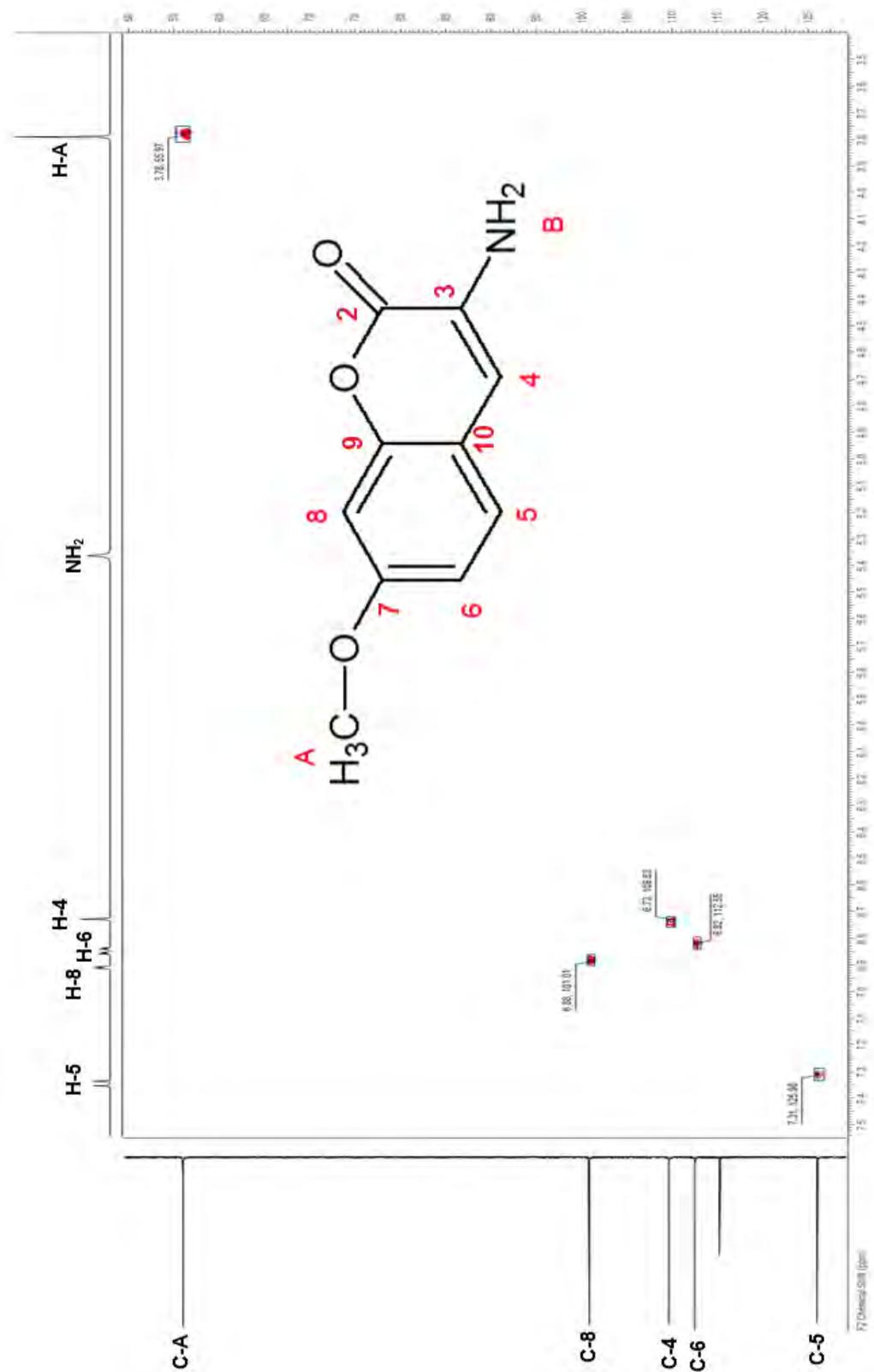
12.3.3 Espectro HSQC-DEPT del precursor 7-metoxi-3-acetoamidocumarina (Prec-3AA).



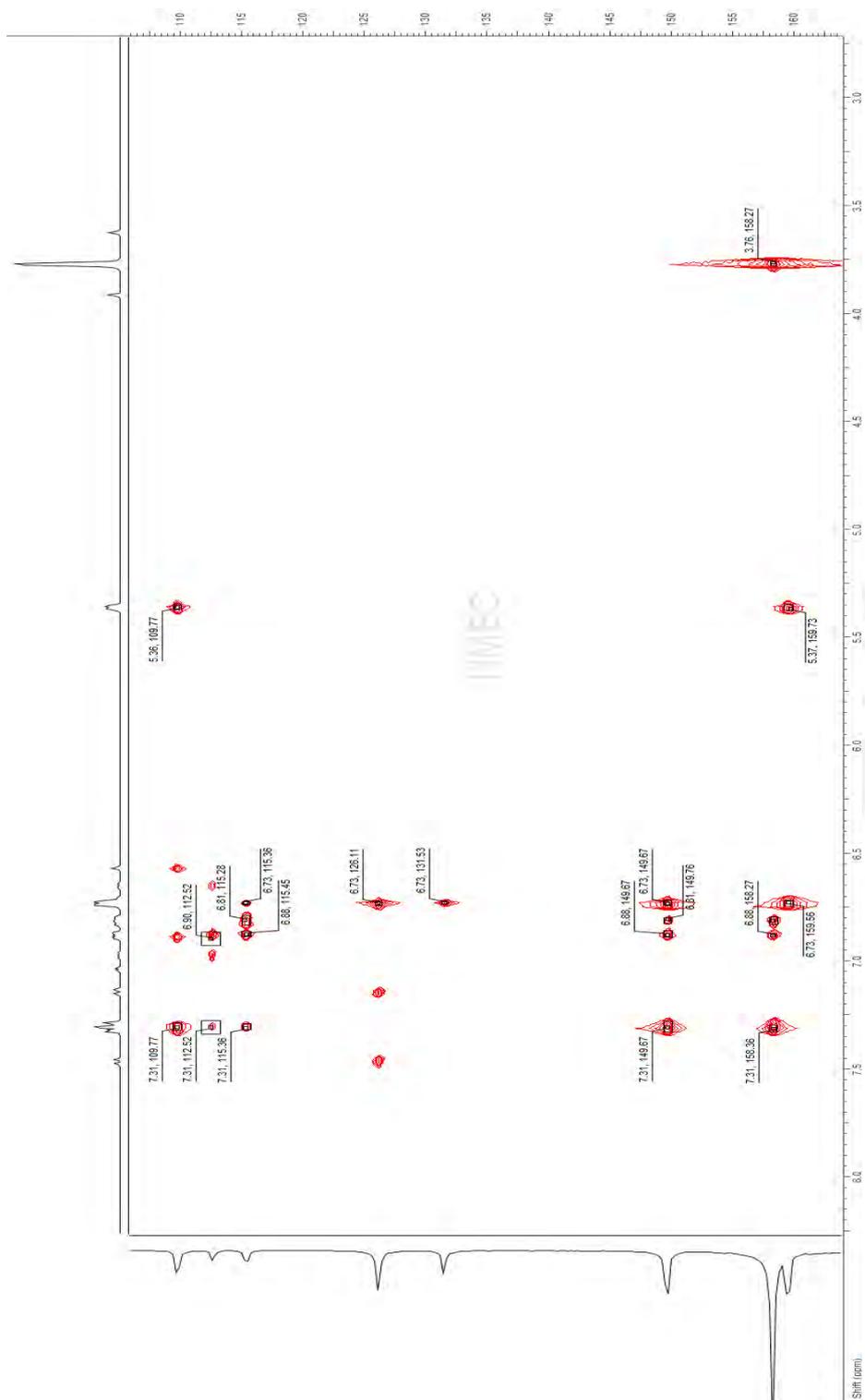
12.3.4 Espectro HMBC del precursor 7-metoxi-3-acetoamidocumarina (Prec-3AA).



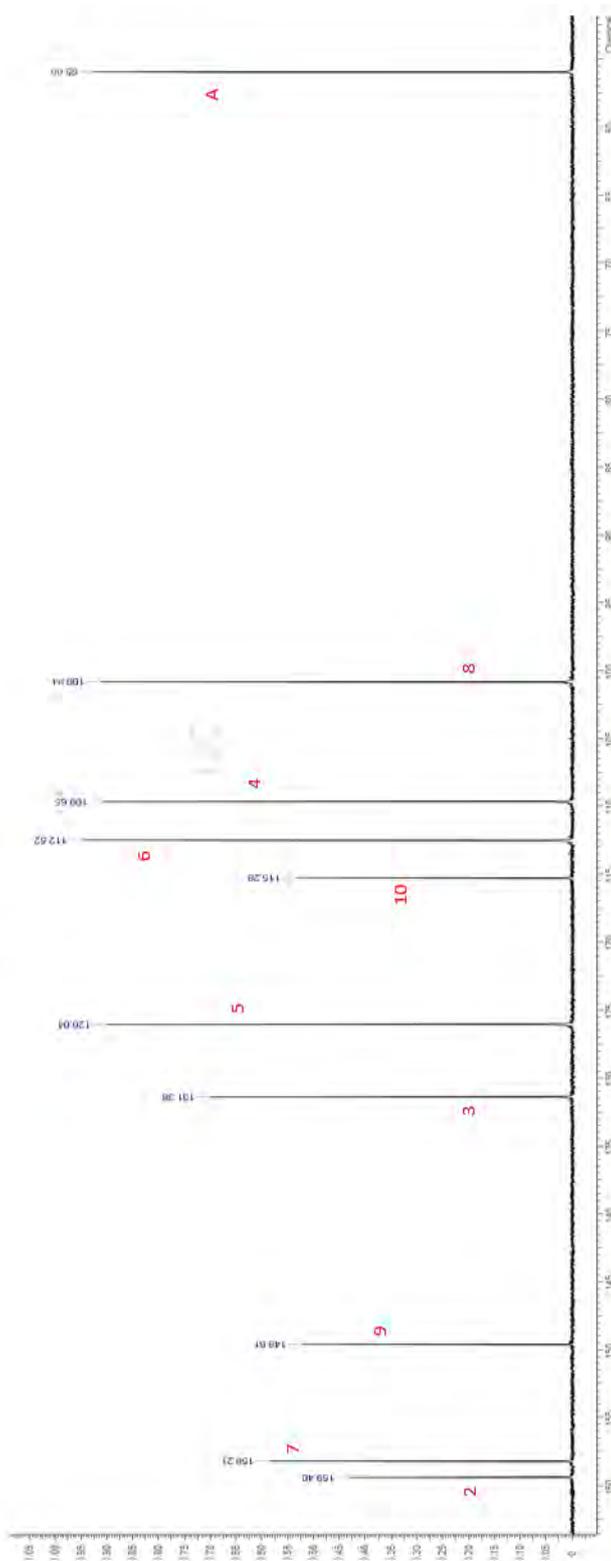
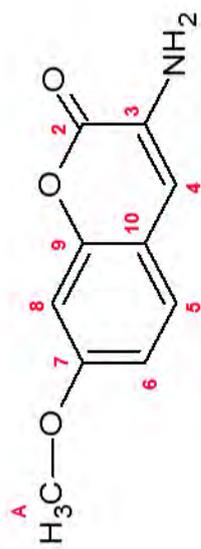
12.3.5 Espectro ¹H-RMN del precursor 7-metoxi-3-aminocumarina (Prec-3A).



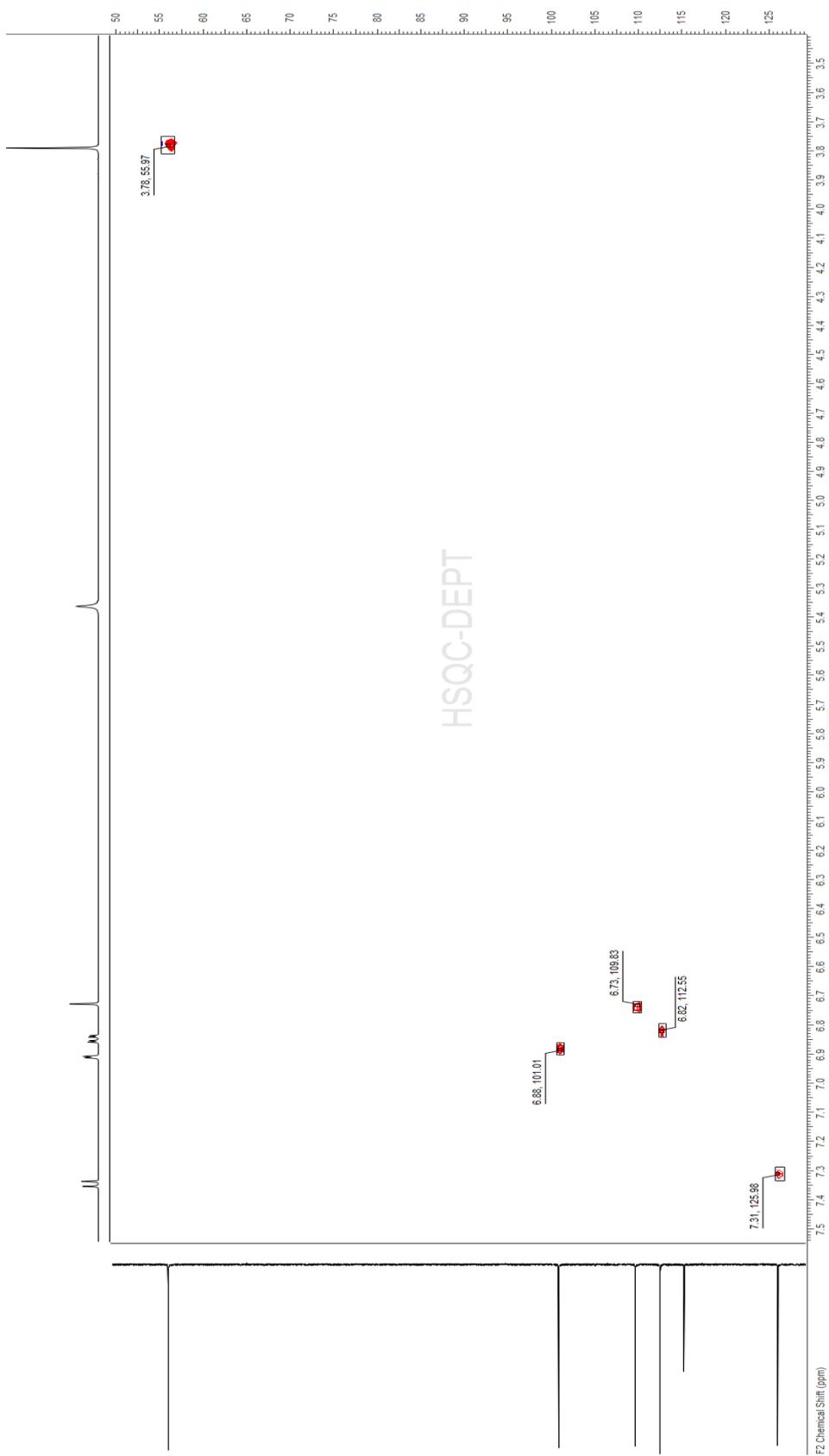
12.3.6 Espectro HSQC-DEPT del precursor 7-metoxi-3-aminocumarina (Prec-3A).



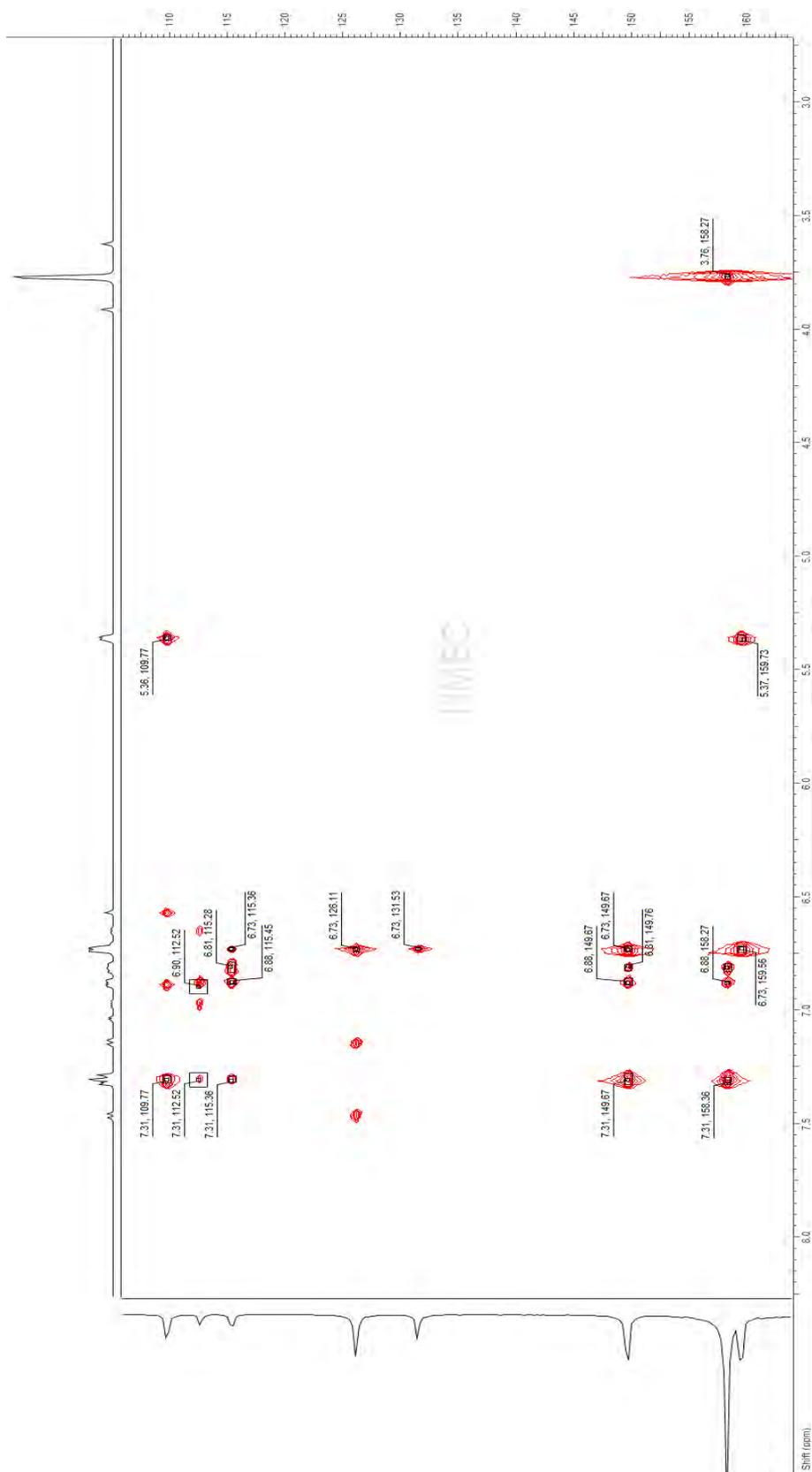
12.3.7 Espectro HMBC del precursor 7-metoxi-3-aminocarbazona (Prec-3A).



12.3.8 Espectro ¹³C-RMN del precursor 7-metoxi-3-aminocumarina (Prec-3A).



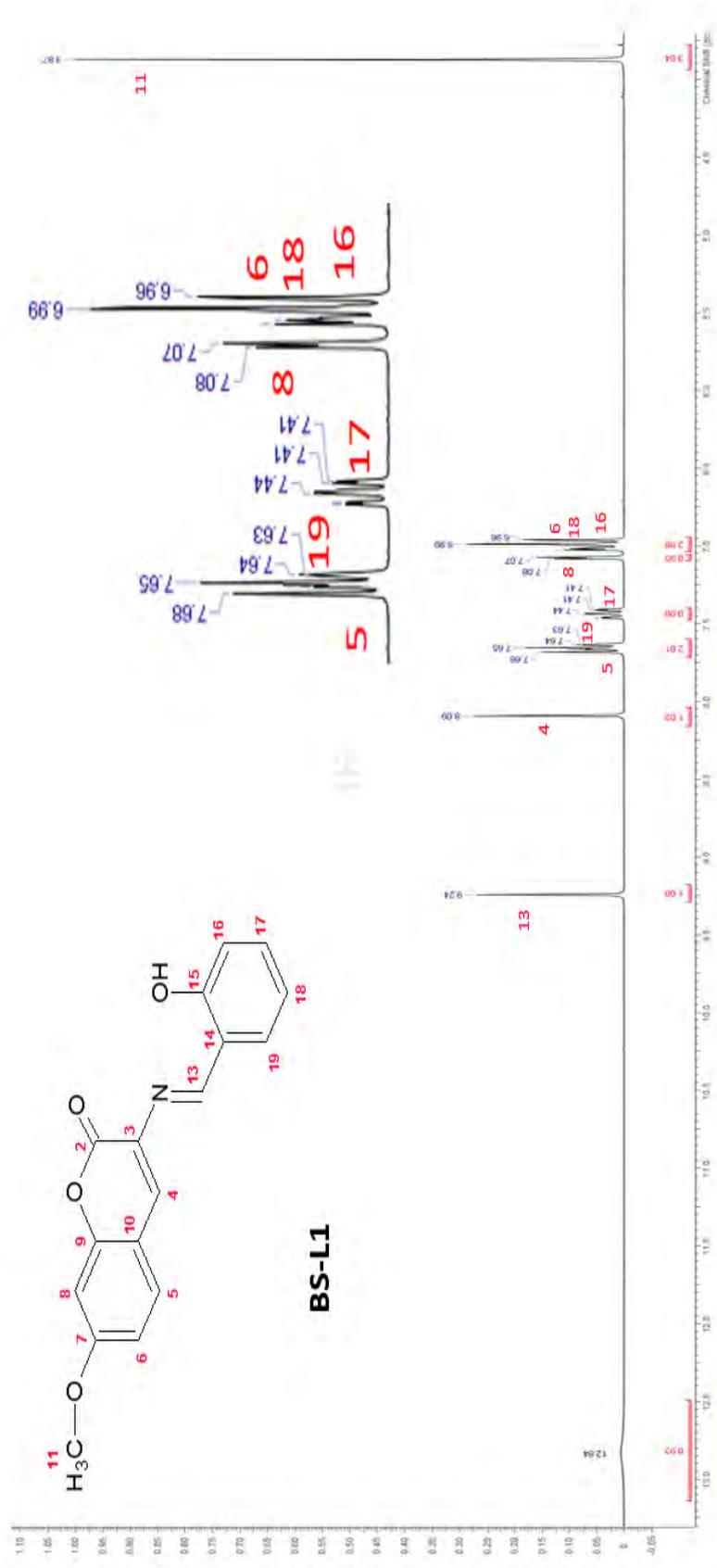
12.3.9 Espectro HSQC-DEPT del precursor 7-metoxi-3-aminocumarina (Prec-3A).



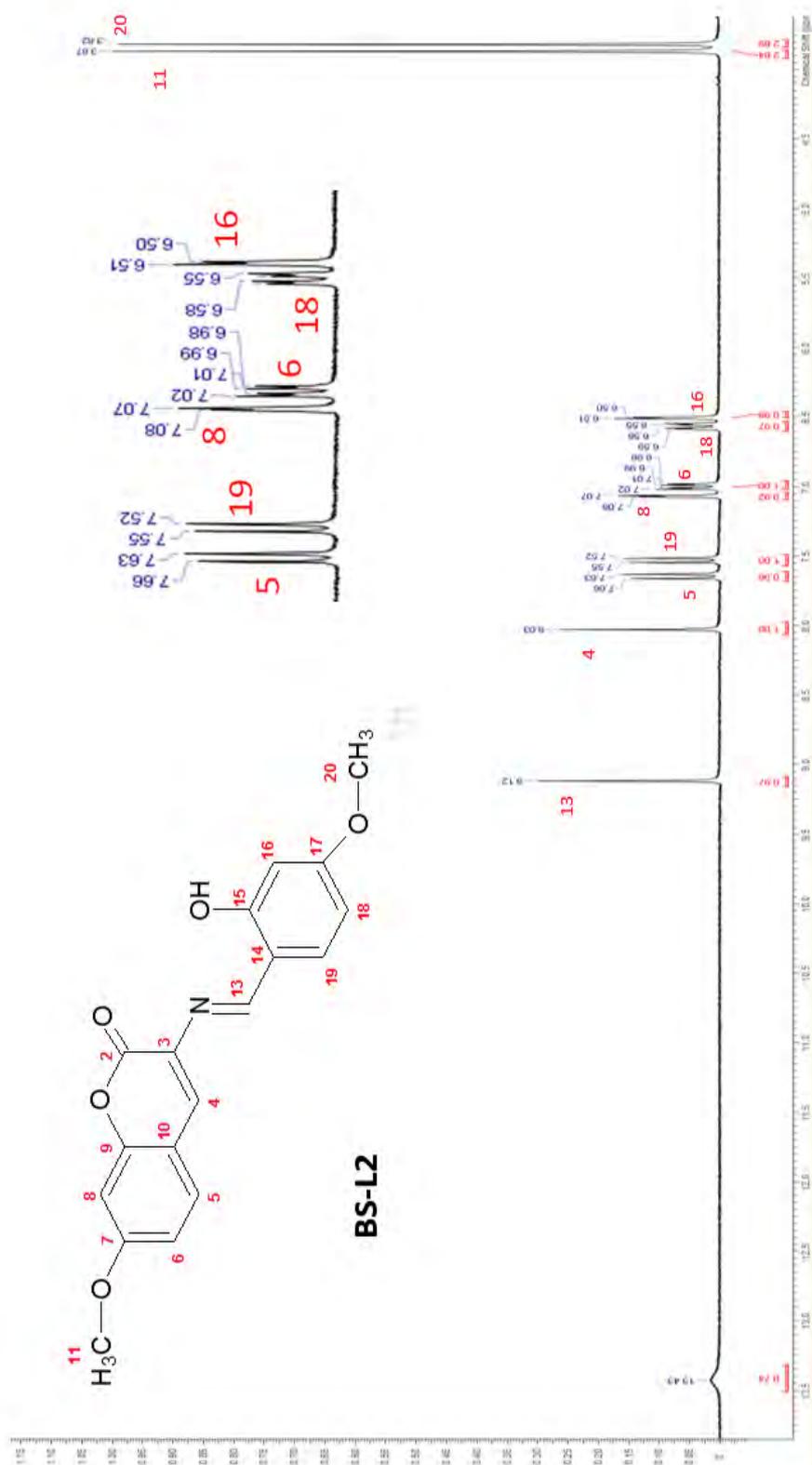
12.3.10 Espectro HMBC del precursor 7-metoxi-3-aminocumarina (Prec-3A).

ANEXO 12.4

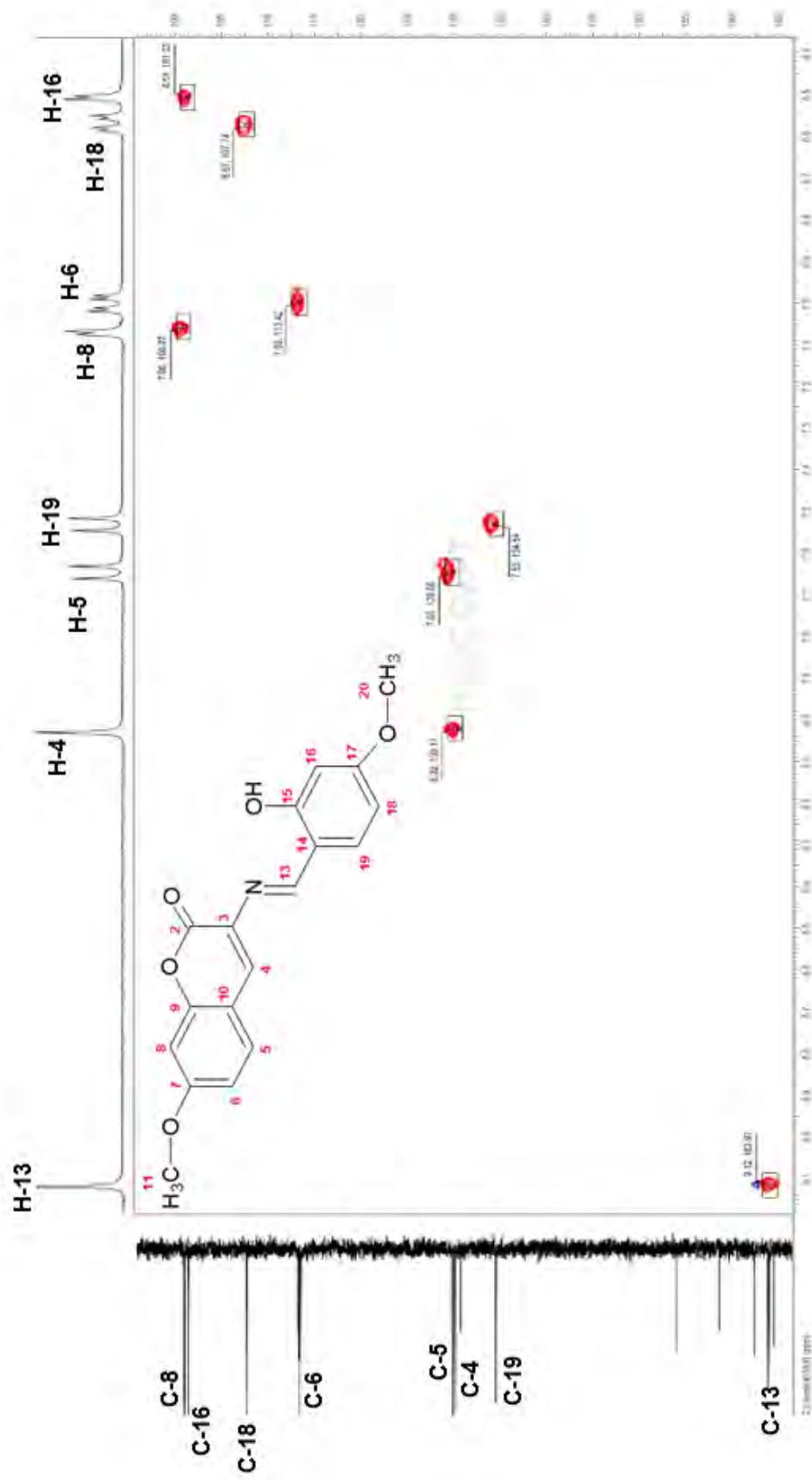
ESPECTROS RMN DE LOS LIGANDOS BASES DE SCHIFF



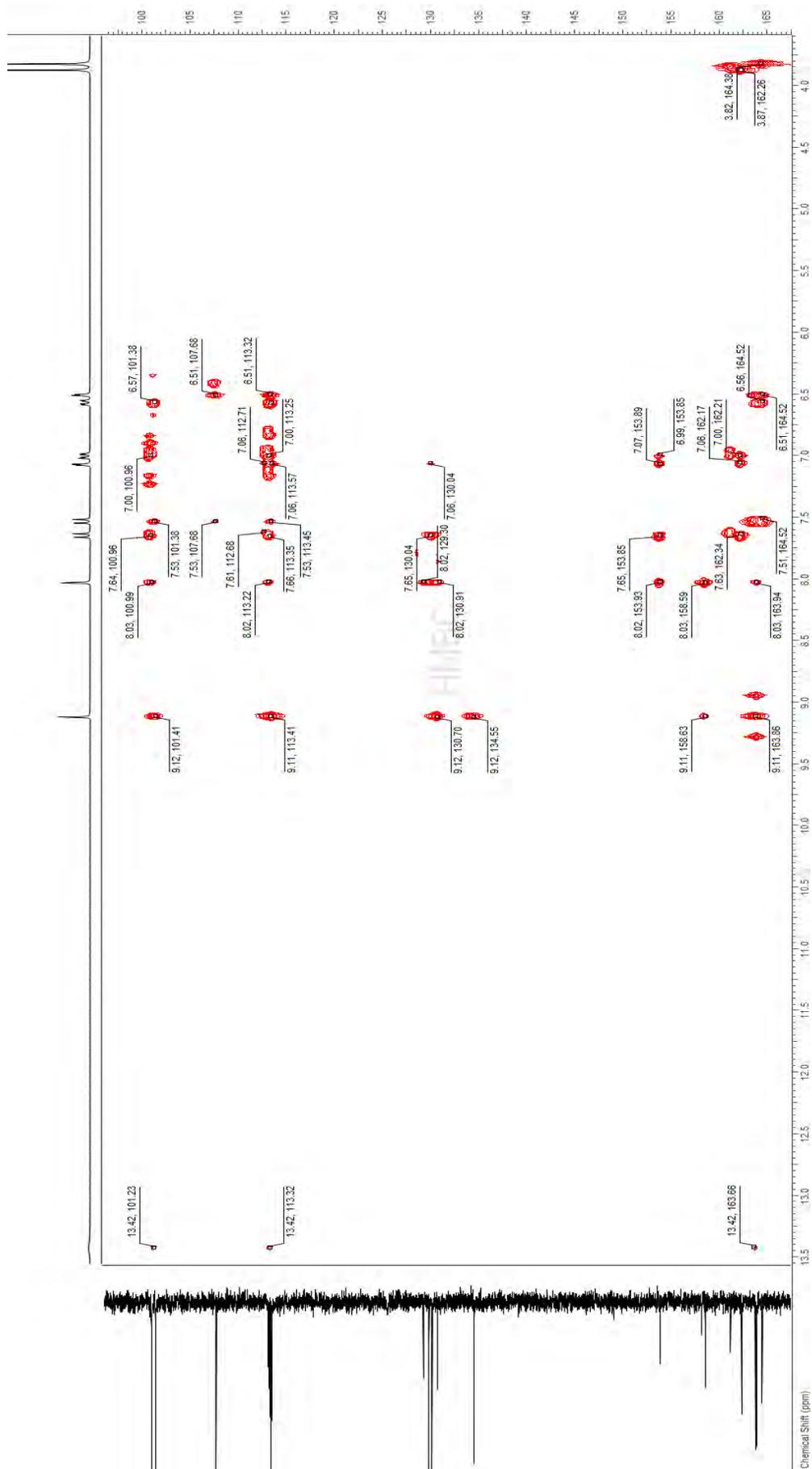
12.4.1 Espectro ¹H-RMN del ligando 7-metoxi-3-(salicideneamino)cumarina (BS-L1).



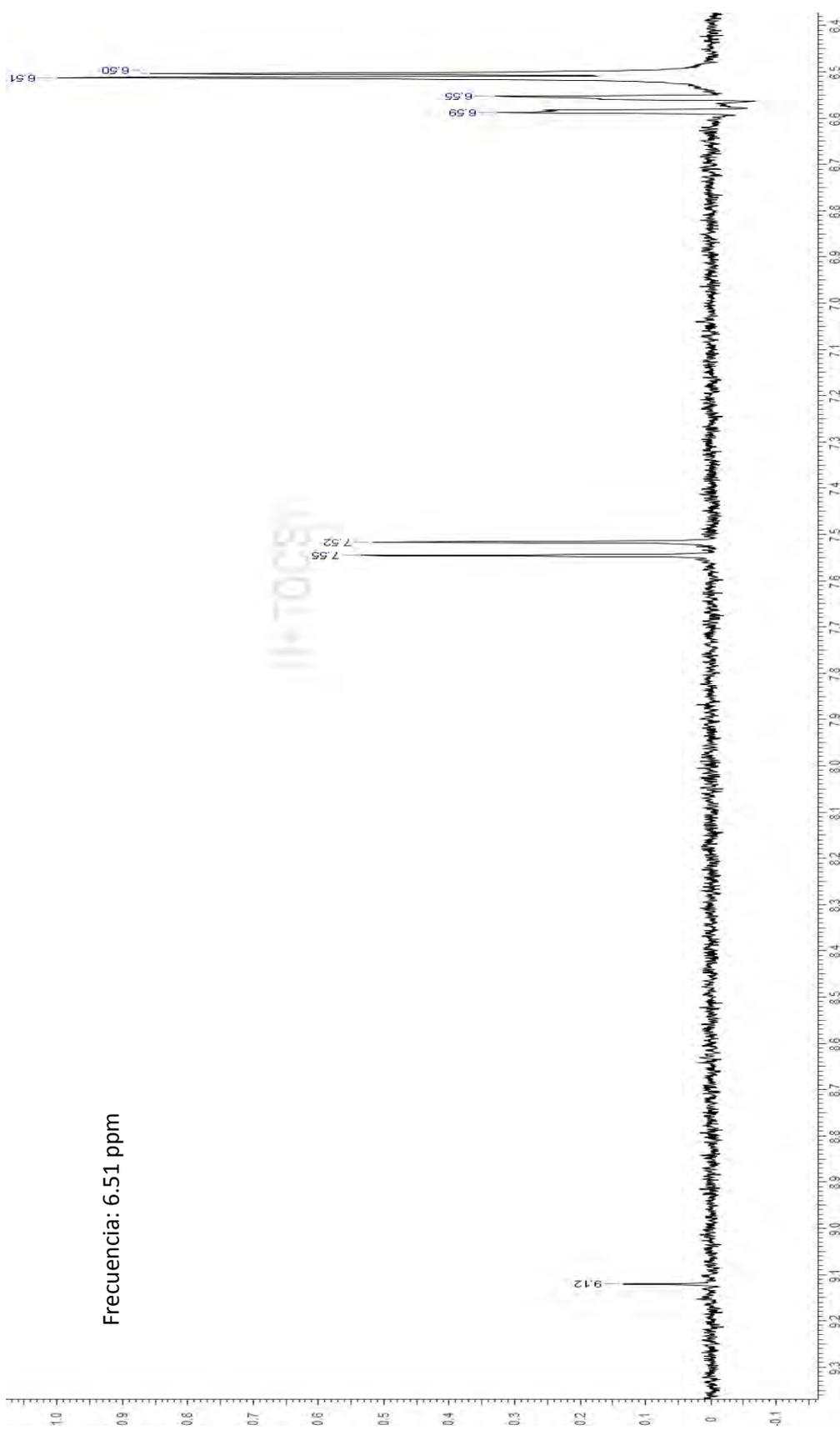
12.4.2 Espectro ¹H-RMN del ligando 7-metoxi-3-(4-metoxi-salicilideneamino)cumarina (BS-L2).



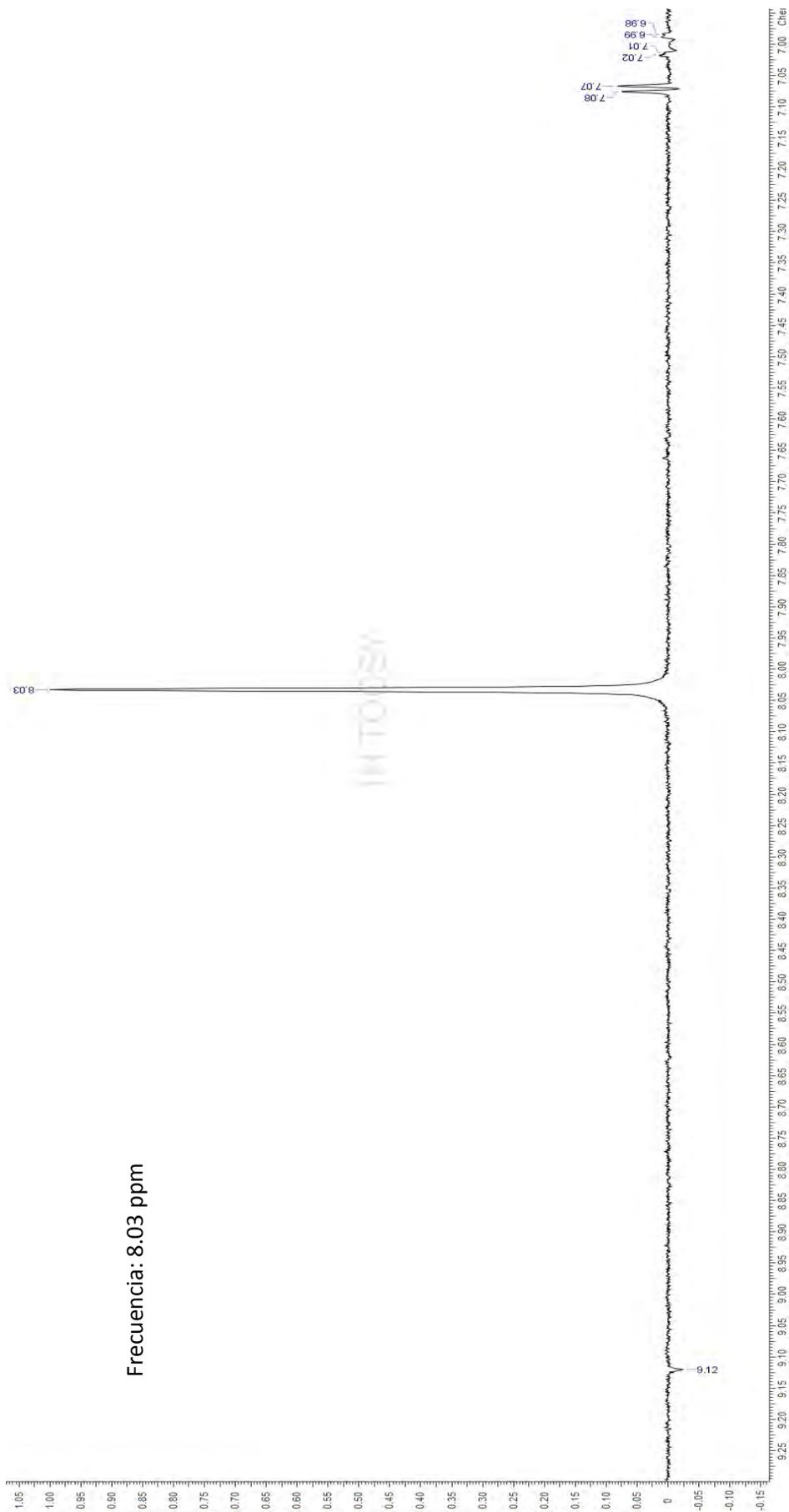
12.4.3 Espectro HSQC-DEPT del ligando 7-metoxi-3-(4-metoxi-salicylideneamino)cumarina (BS-L2).



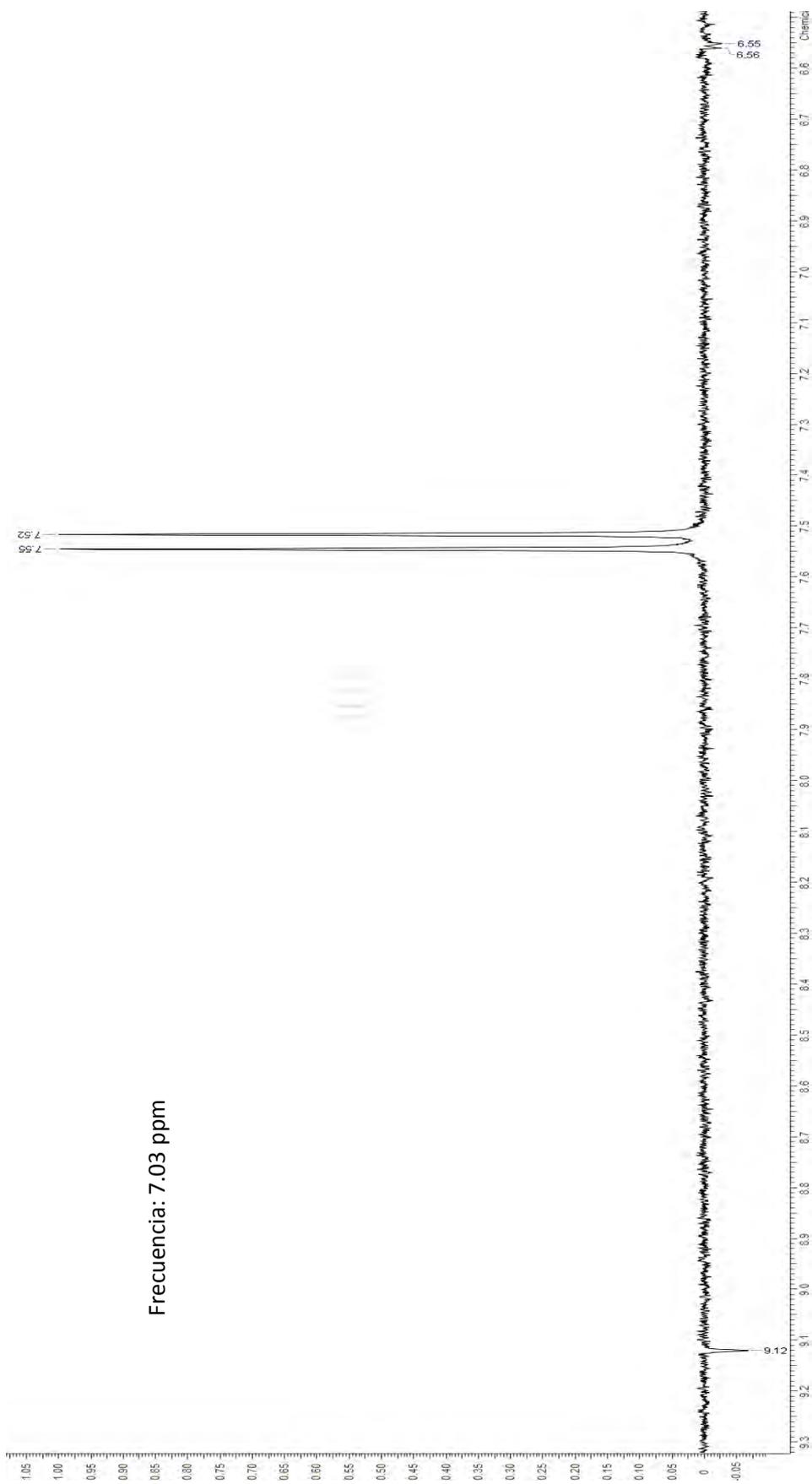
12.4.4 Espectro HMBC del ligando 7-metoxi-3-(4-metoxi-salicilideneamino)cumarina (BS-L2).



12.4.5 Espectro 1D-TOCSY del ligando 7-metoxi-3-(4-metoxi-salicydeneamino)cumarina (BS-L2).

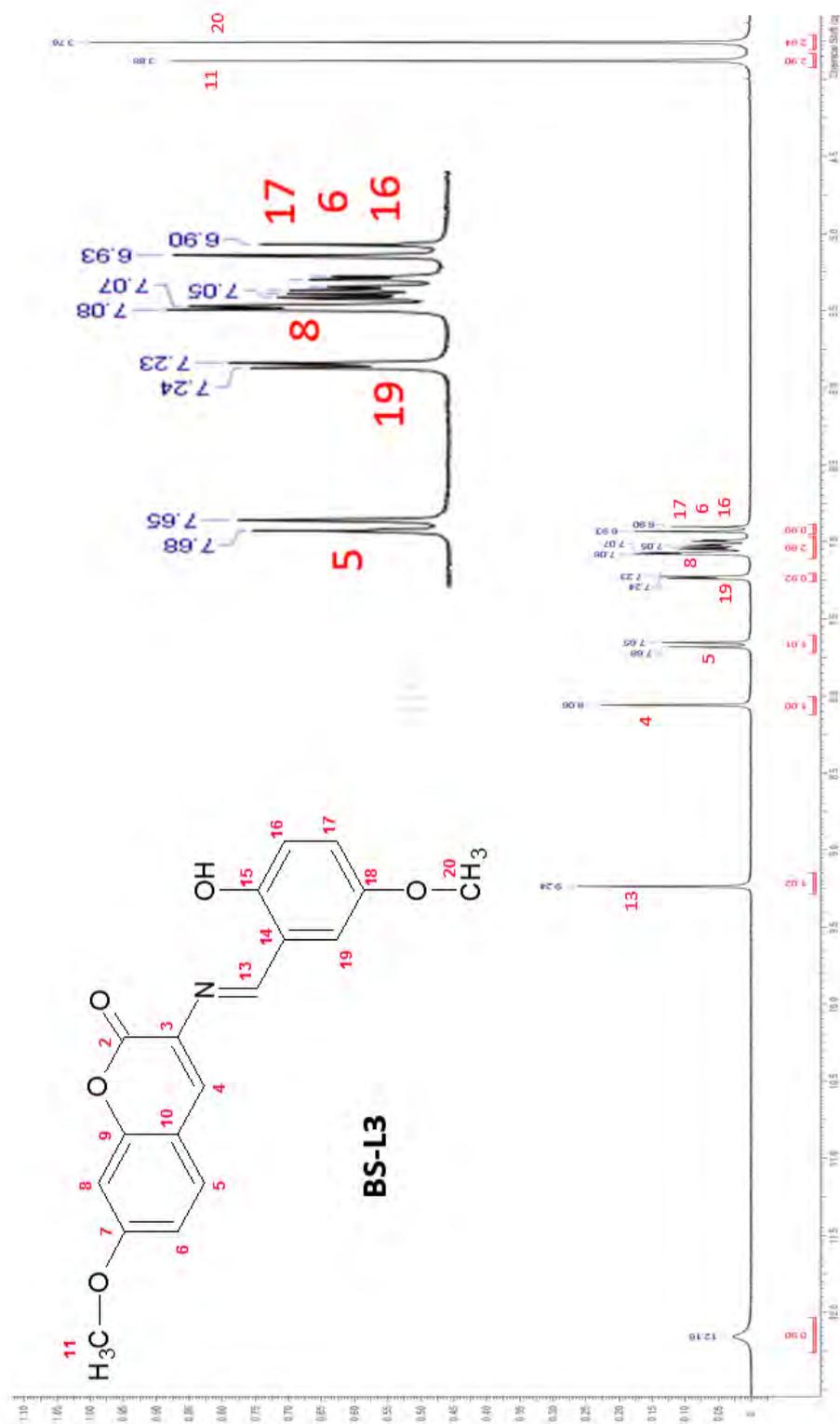


12.4.6 Espectro 1D-TOCSY del ligando 7-metoxi-3-(4-metoxi-salicylideneamino)cumarina (BS-L2).

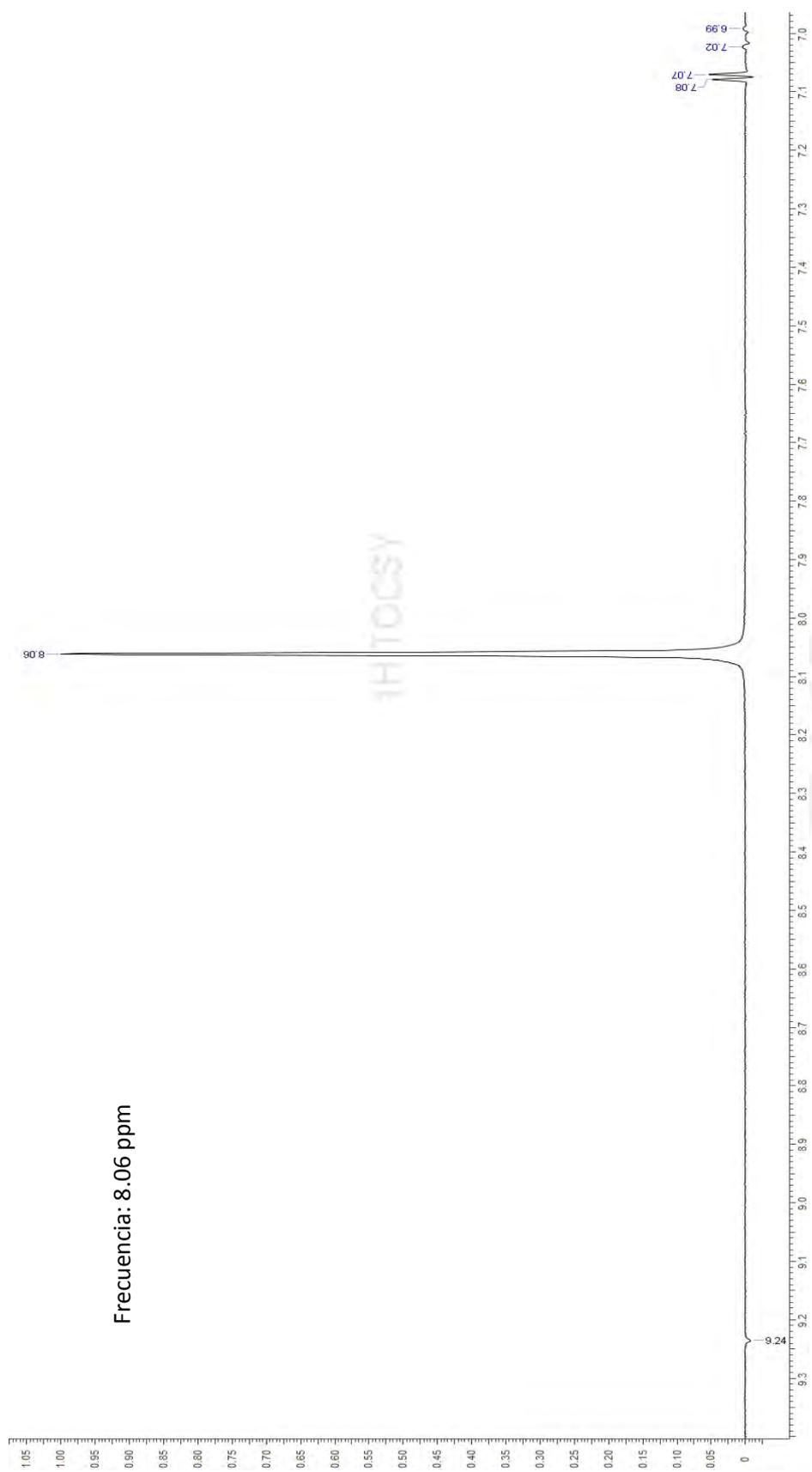


Frecuencia: 7.03 ppm

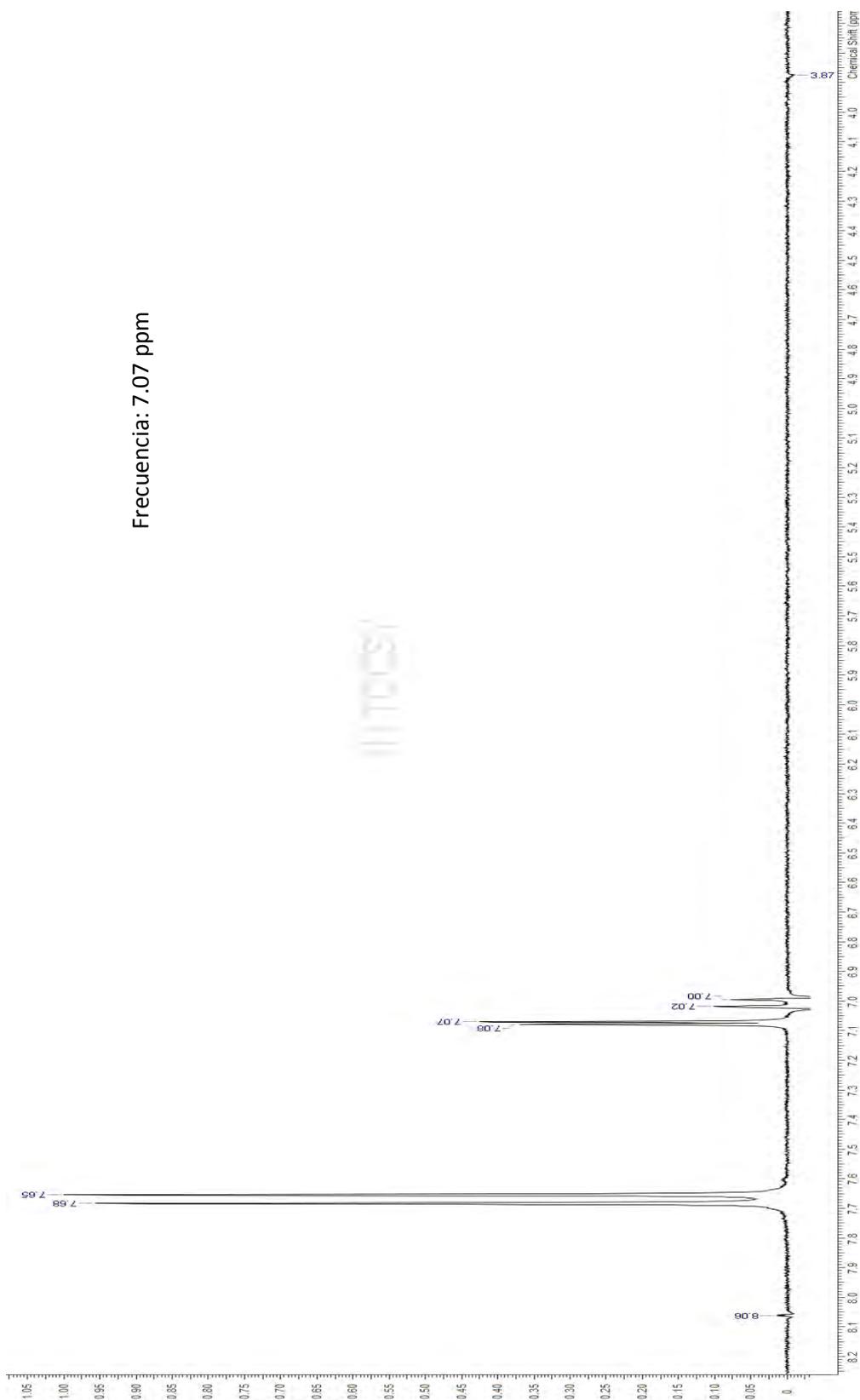
12.4.7 Espectro 1D-TOCSY del ligando 7-metoxi-3-(4-metoxi-salicylideneamino)cumarina (BS-L2).



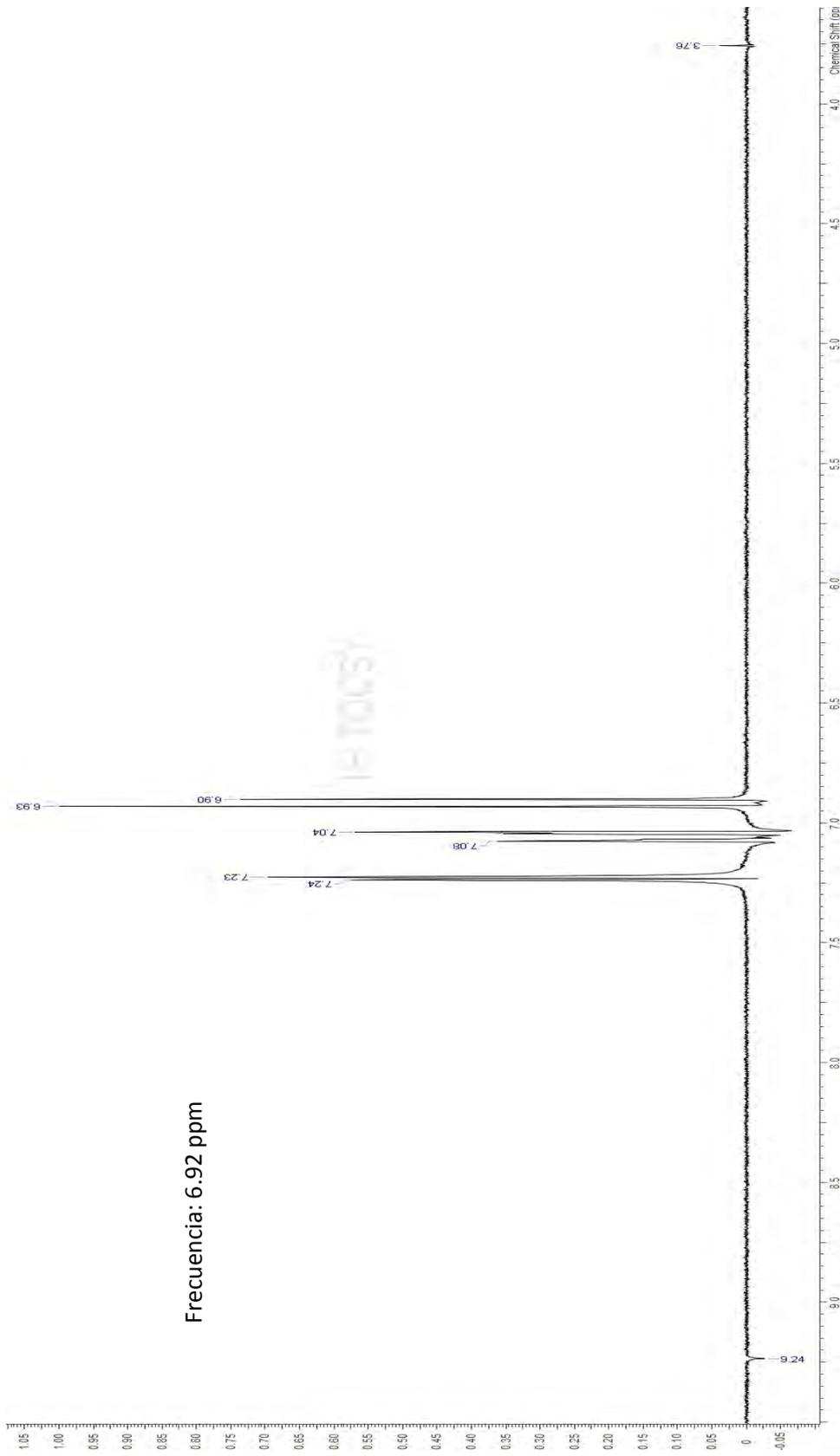
12.4.8 Espectro ¹H-RMN del ligando 7-metoxi-3-(5-metoxi-salicylideneamino)cumarina (BS-L3).



12.4.9 Espectro 1D-TOCSY del ligando 7-metoxi-3-(5-metoxi-salicylideneamino)cumarina (BS-L3).



12.4.10 Espectro 1D-TOCSY del ligando 7-metoxi-3-(5-metoxi-salicylideneamino)cumarina (BS-L3).



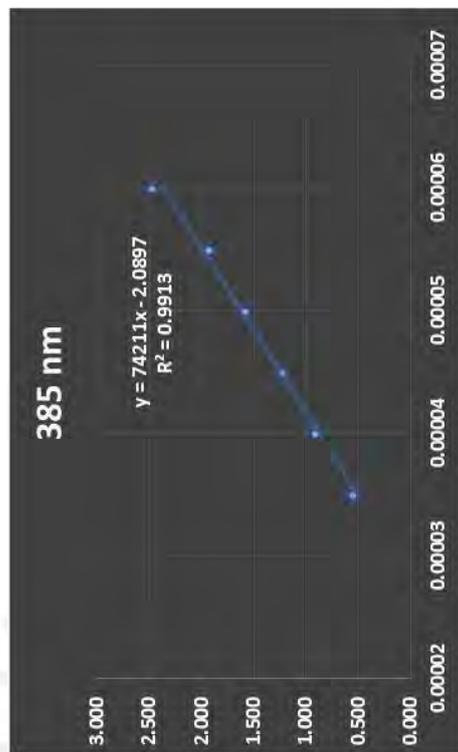
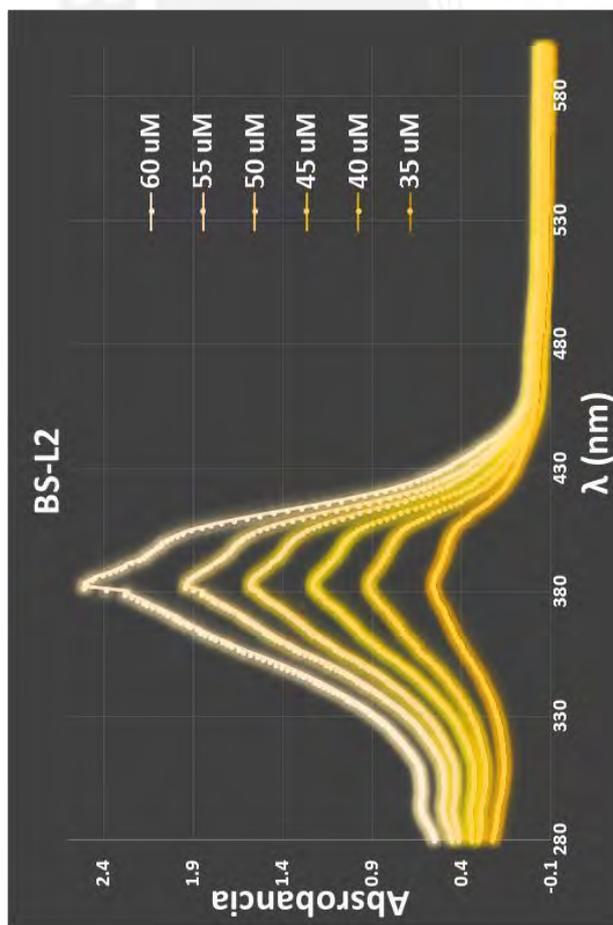
12.4.11 Espectro 1D-TOCSY del ligando 7-metoxi-3-(5-metoxi-salicylideneamino)cumarina (BS-L3).

ANEXO 12.5

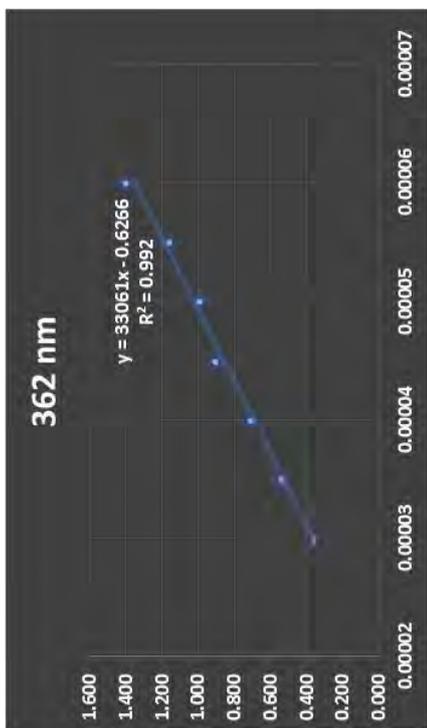
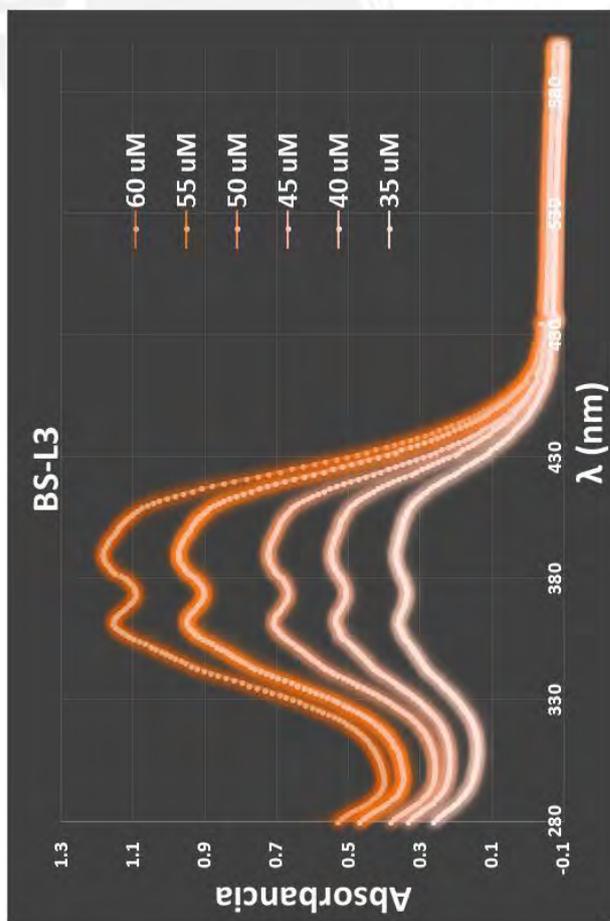
ESPECTROS UV-Vis Y VALORES DE ϵ ($M^{-1}cm^{-1}$) DE LOS LIGANDOS BASES DE SCHIFF



12.5.1 Espectro UV-Vis del ligando 7-metoxi-3-(salicilideneamino)cumarina (BS-L1)



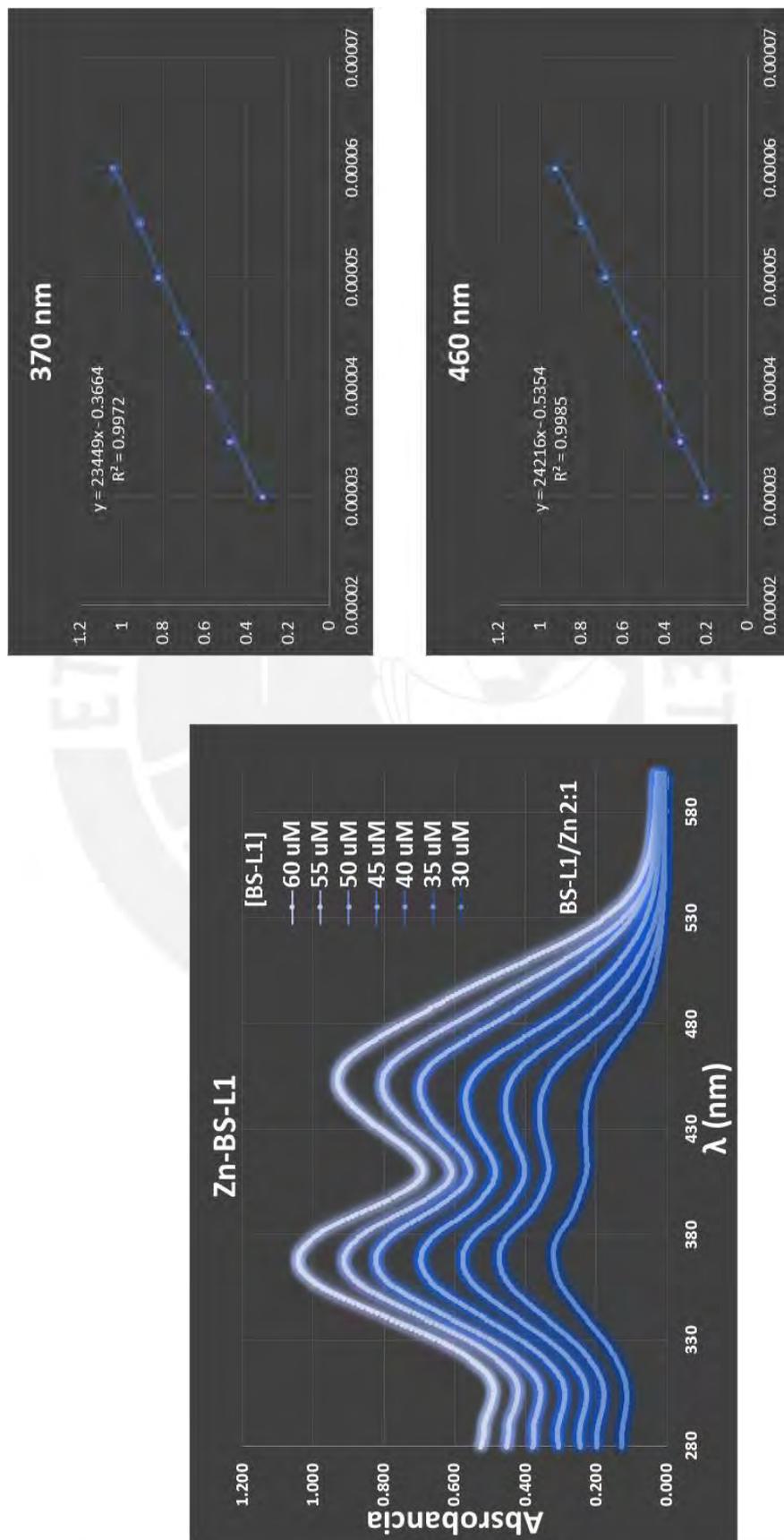
12.5.2 Espectro UV-Vis del ligando 7-metoxi-3-(4-metoxi-salicilideneamino)cumarina (BS-L2)



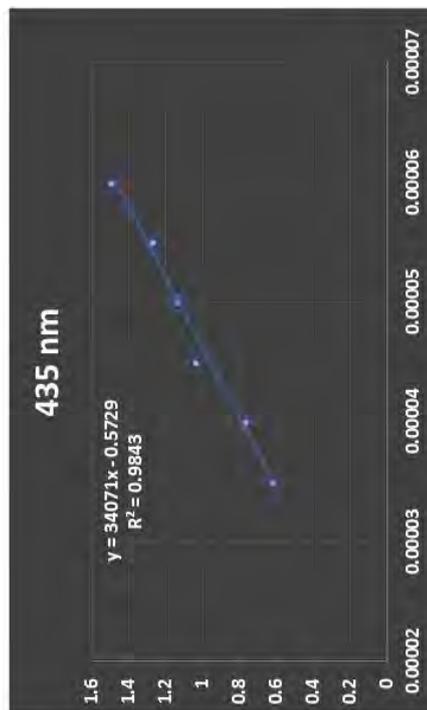
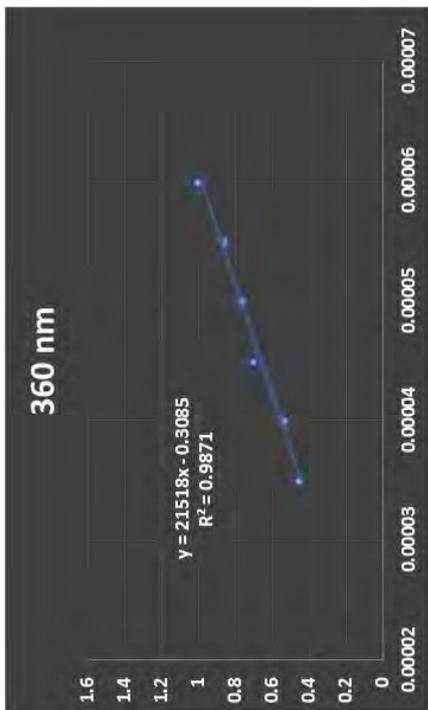
12.5.3 Espectro UV-Vis del ligando 7-metoxi-3-(5-metoxi-salicilideneamino)cumarina (**BS-L3**)

ANEXO 12.6

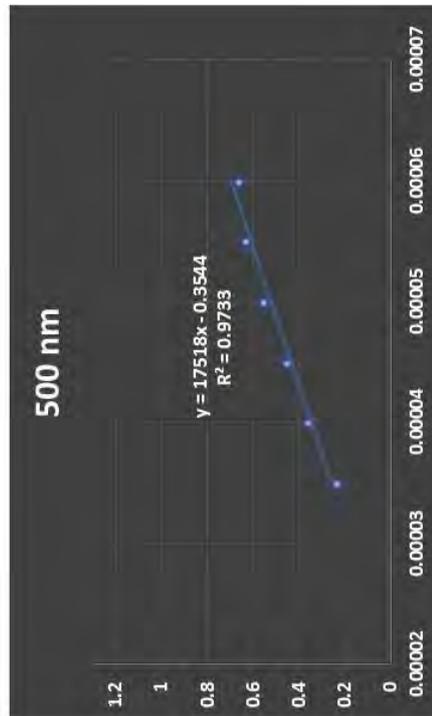
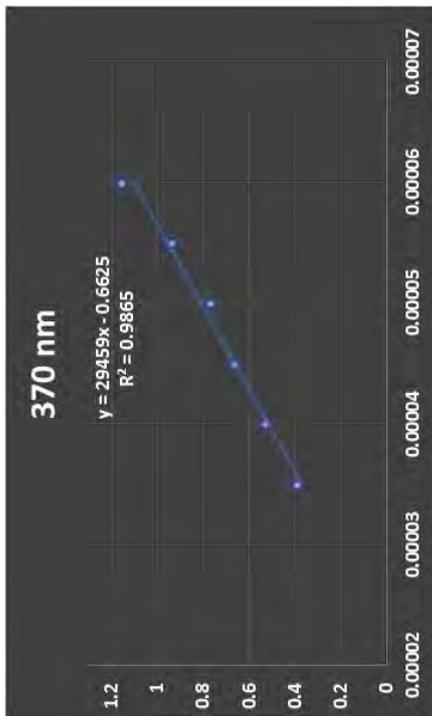
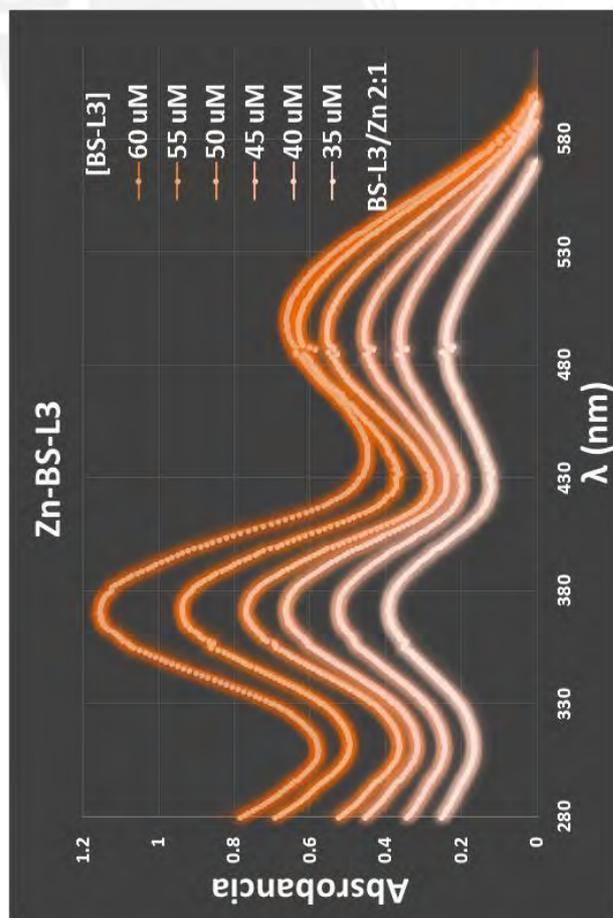
ESPECTROS UV-Vis Y VALORES DE ϵ ($M^{-1}cm^{-1}$) DE LOS COMPLEJOS CON $ZnCl_2$



12.6.1 Espectro UV-Vis del complejo Zn-BS-L1 con $ZnCl_2$.



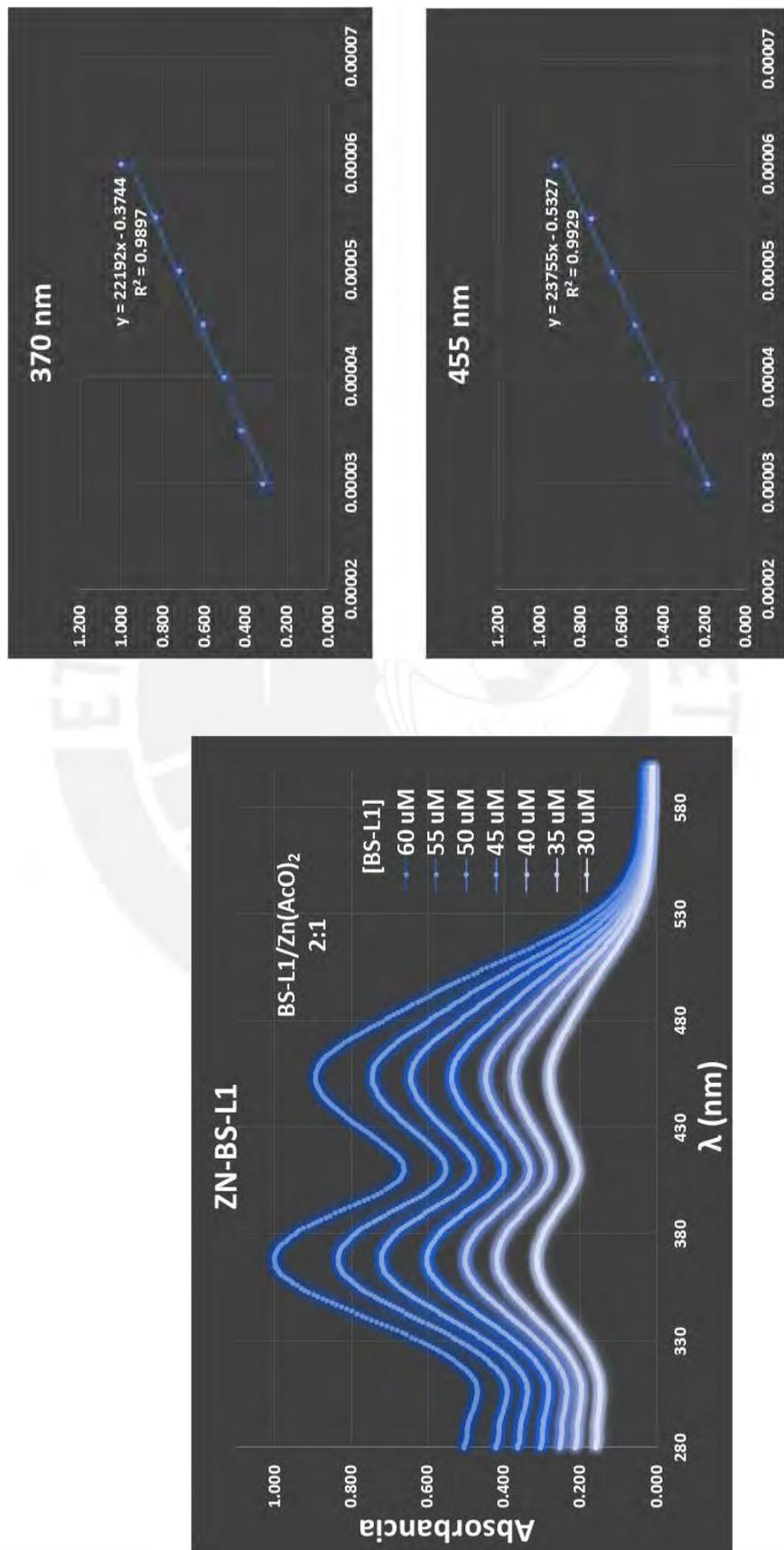
12.6.2 Espectro UV-Vis del complejo **Zn-BS-L2** con ZnCl_2 .



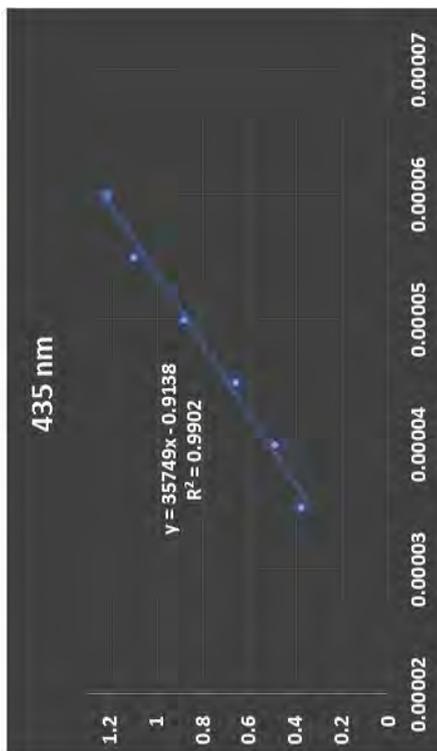
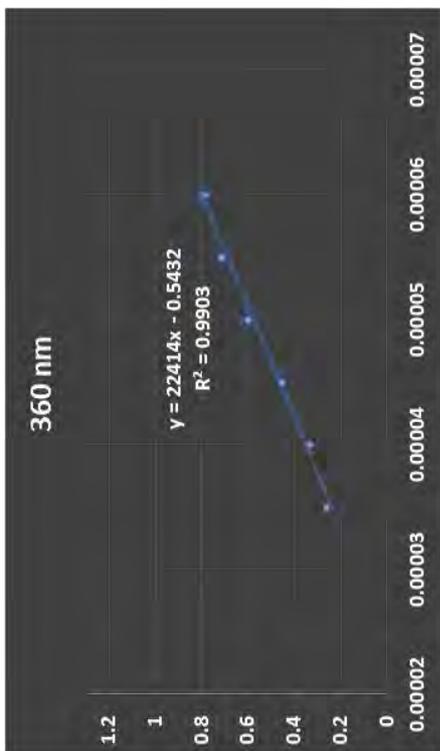
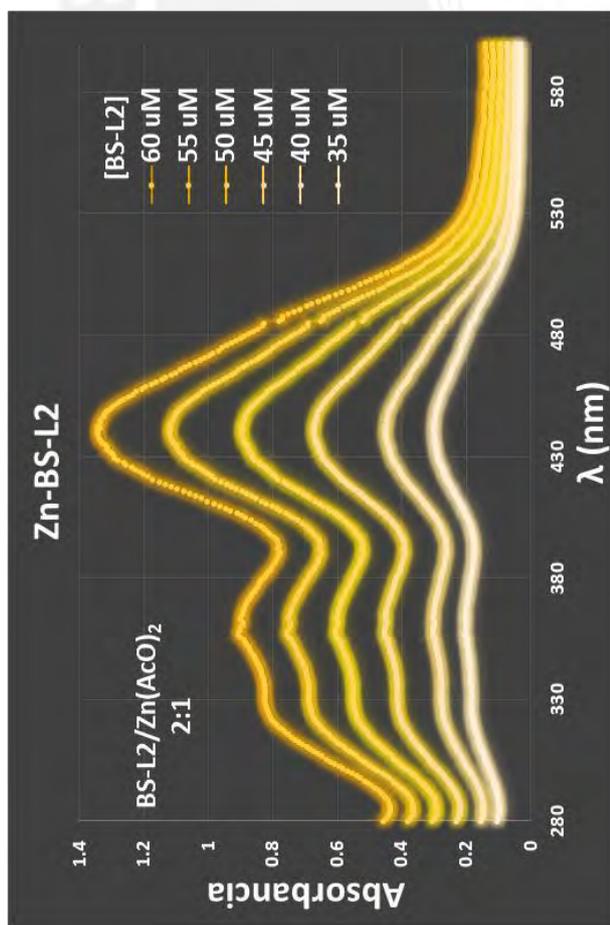
12.6.3 Espectro UV-Vis del complejo Zn-BS-L3 con ZnCl_2 .

ANEXO 12.7

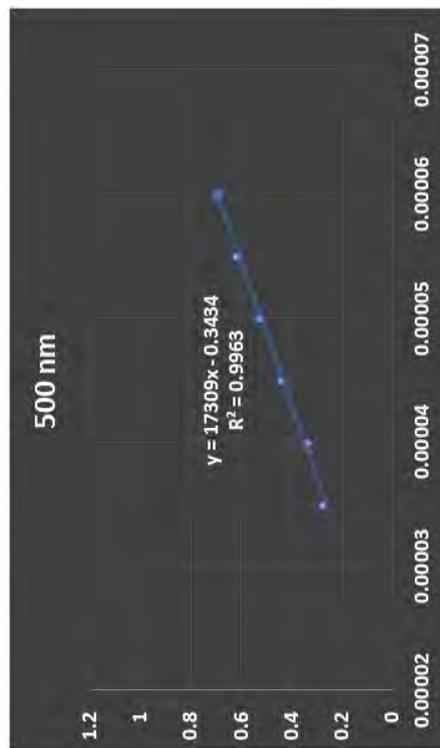
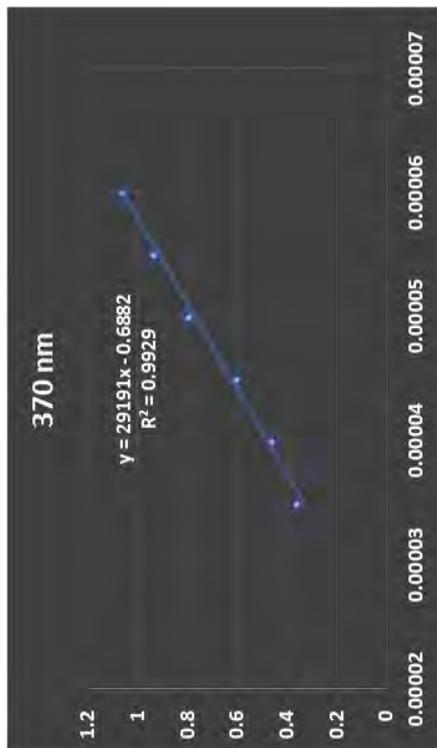
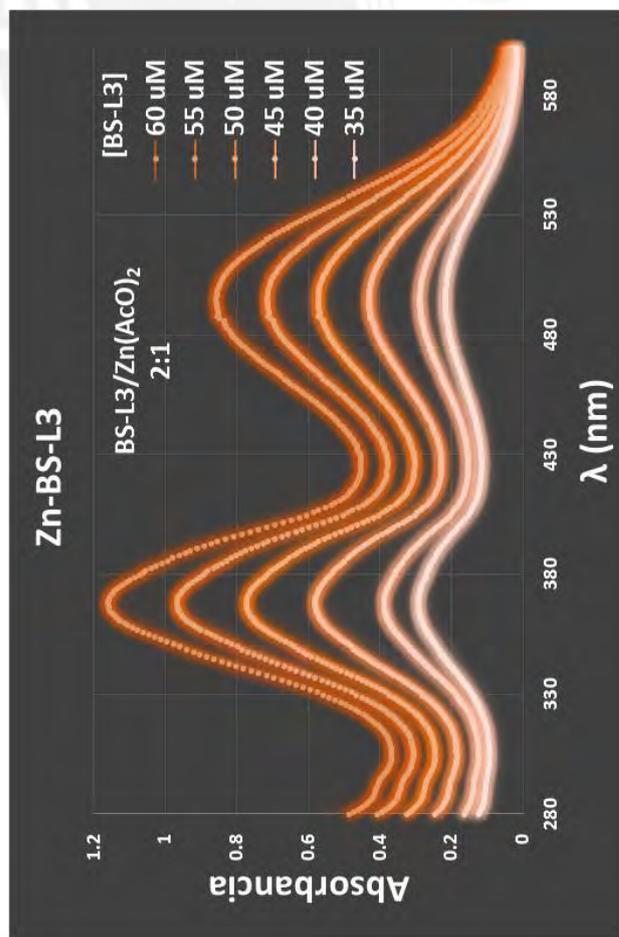
ESPECTROS UV-Vis Y VALORES DE ϵ ($M^{-1}cm^{-1}$) DE LOS COMPLEJOS CON $Zn(OAc)_2$



12.7.1 Espectro UV-Vis del complejo Zn-BS-L1 con $Zn(OAc)_2$.



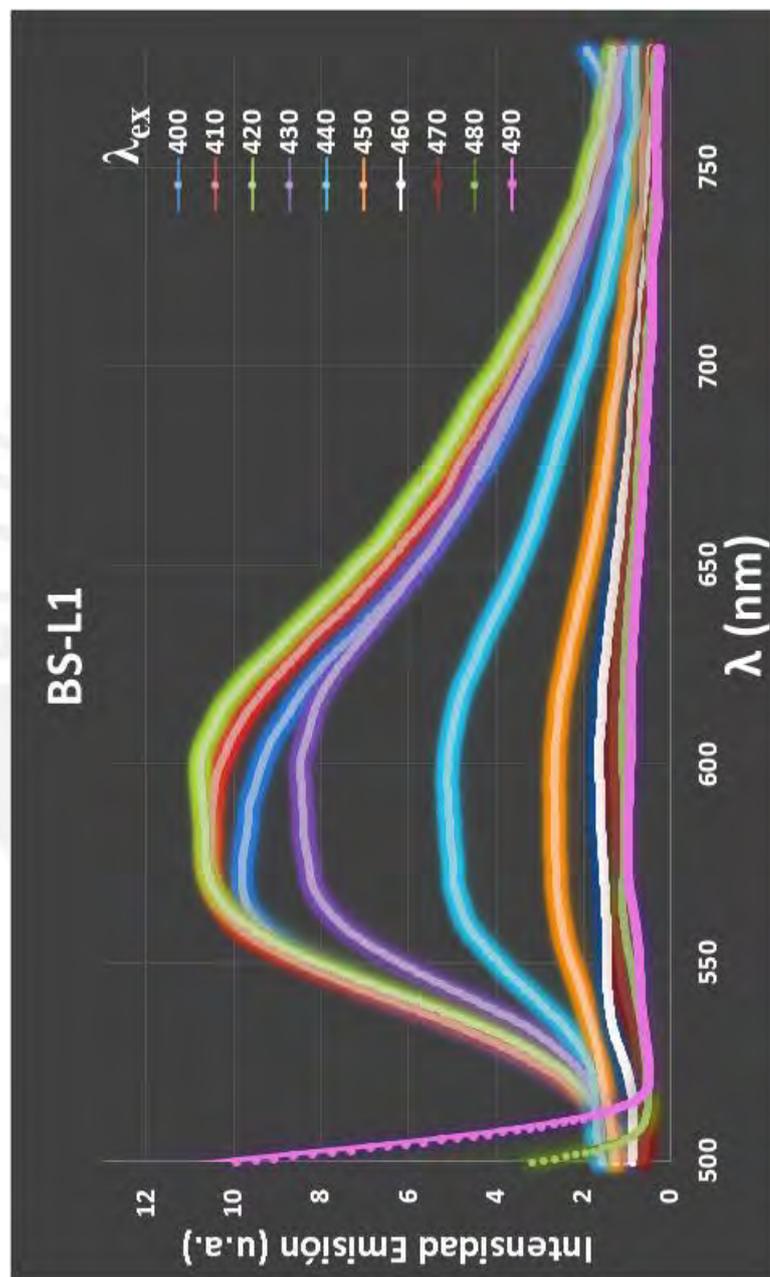
12.7.2 Espectro UV-Vis del complejo Zn-BS-L2 con Zn(OAc)₂.



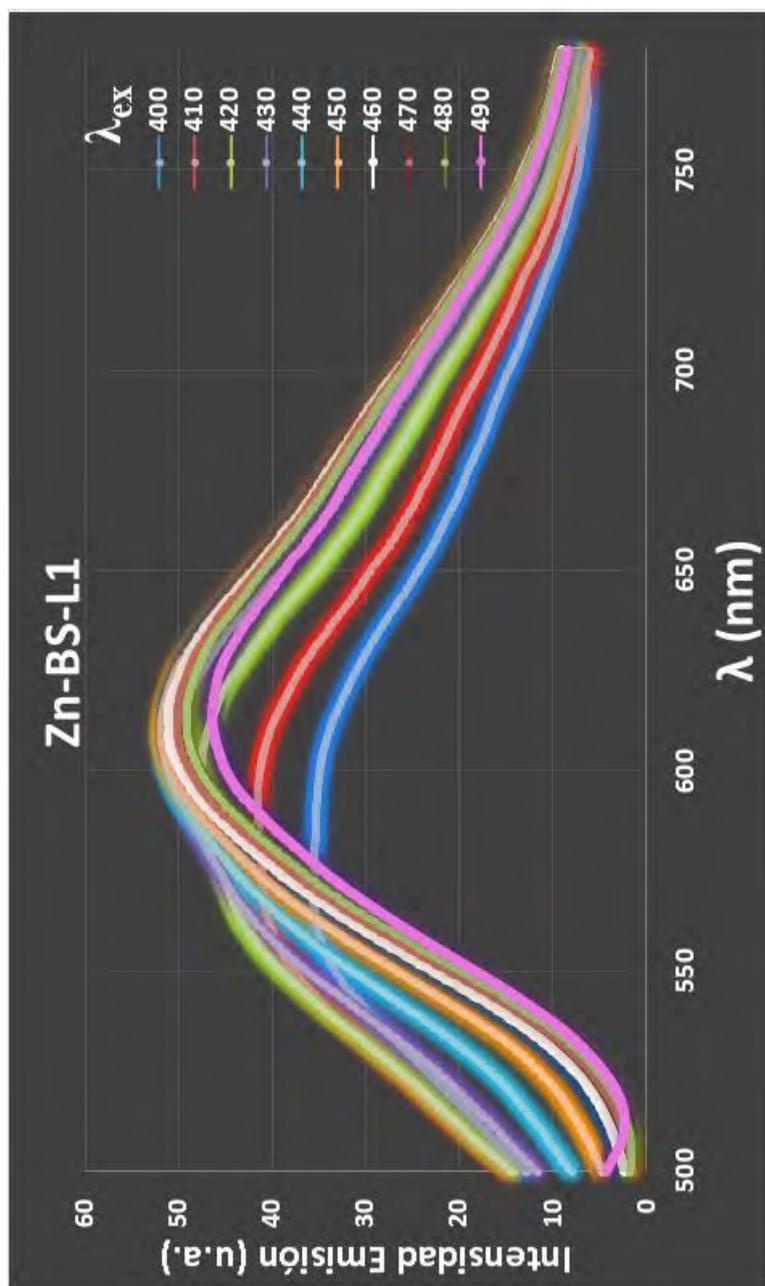
12.7.3 Espectro UV-Vis del complejo **Zn-BS-L3** con $\text{Zn}(\text{OAc})_2$.

ANEXO 12.8

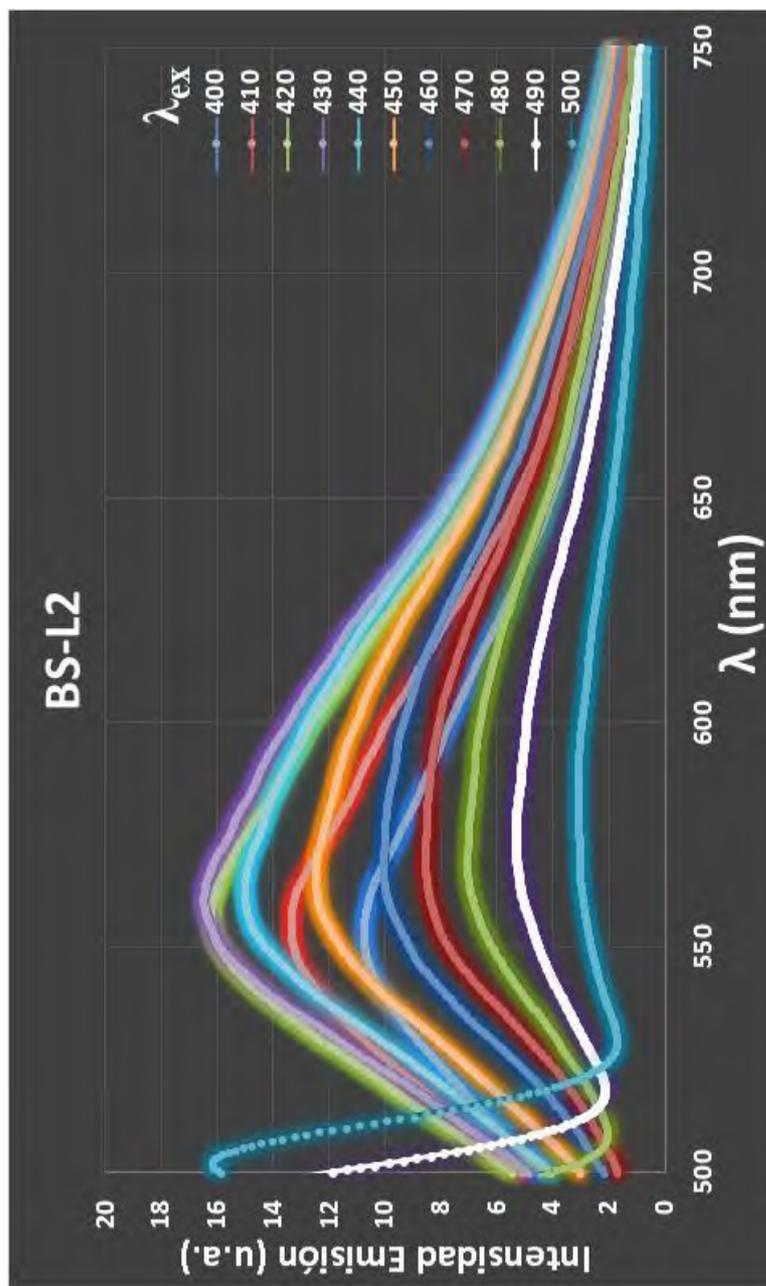
ESPECTROS DE EMISIÓN FLUORESCENTE DE LOS LIGANDOS BASES DE SCHIFF



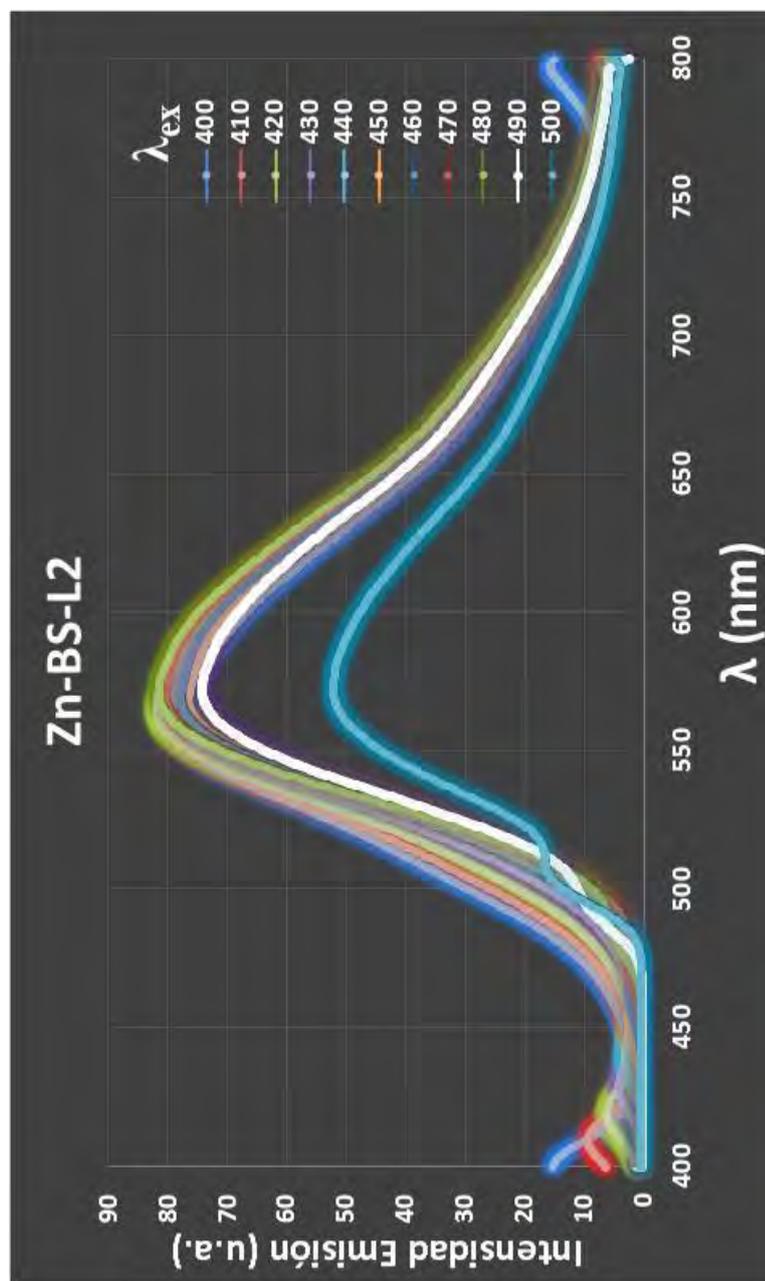
12.8.1 Espectro de emisión del ligando 7-metoxi-3-(salicideneamino)cumarina (BS-L1) a diferentes λ_{ex} .



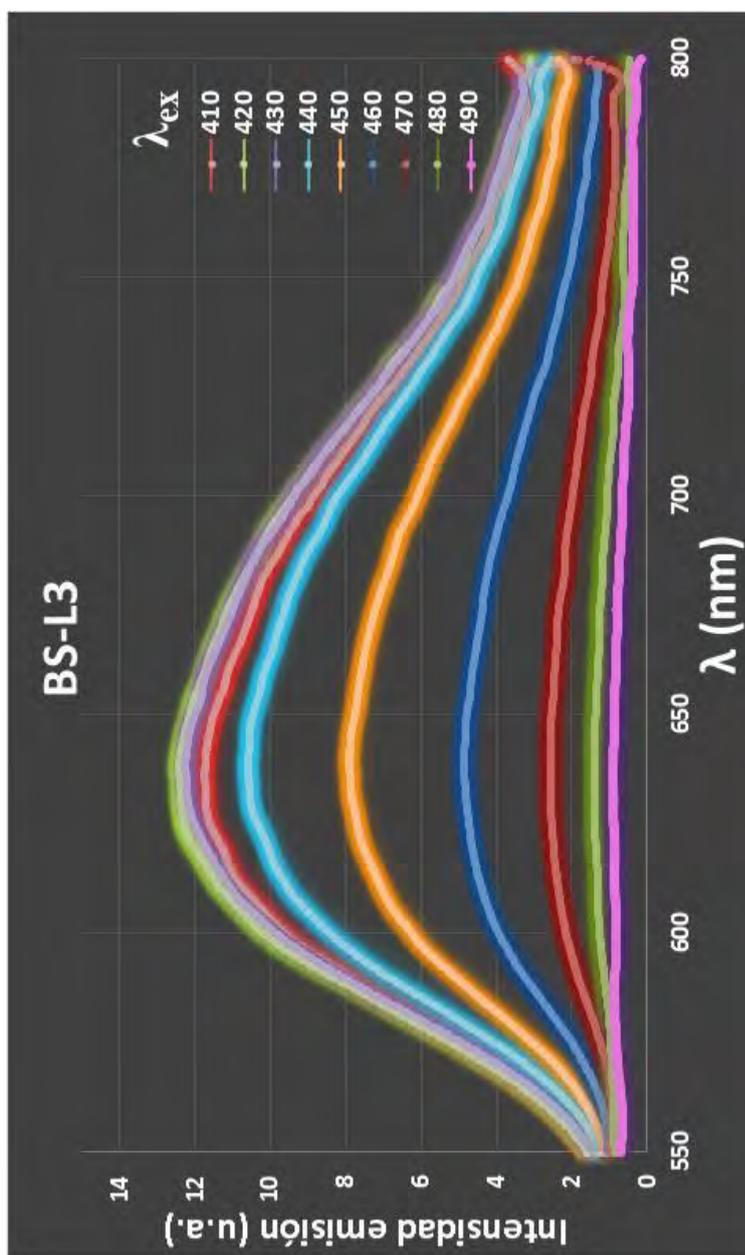
12.8.2 Espectro de emisión del complejo Zn-BS-L1 a diferentes λ_{ex} (Ligando/Zn²⁺ 2:1).



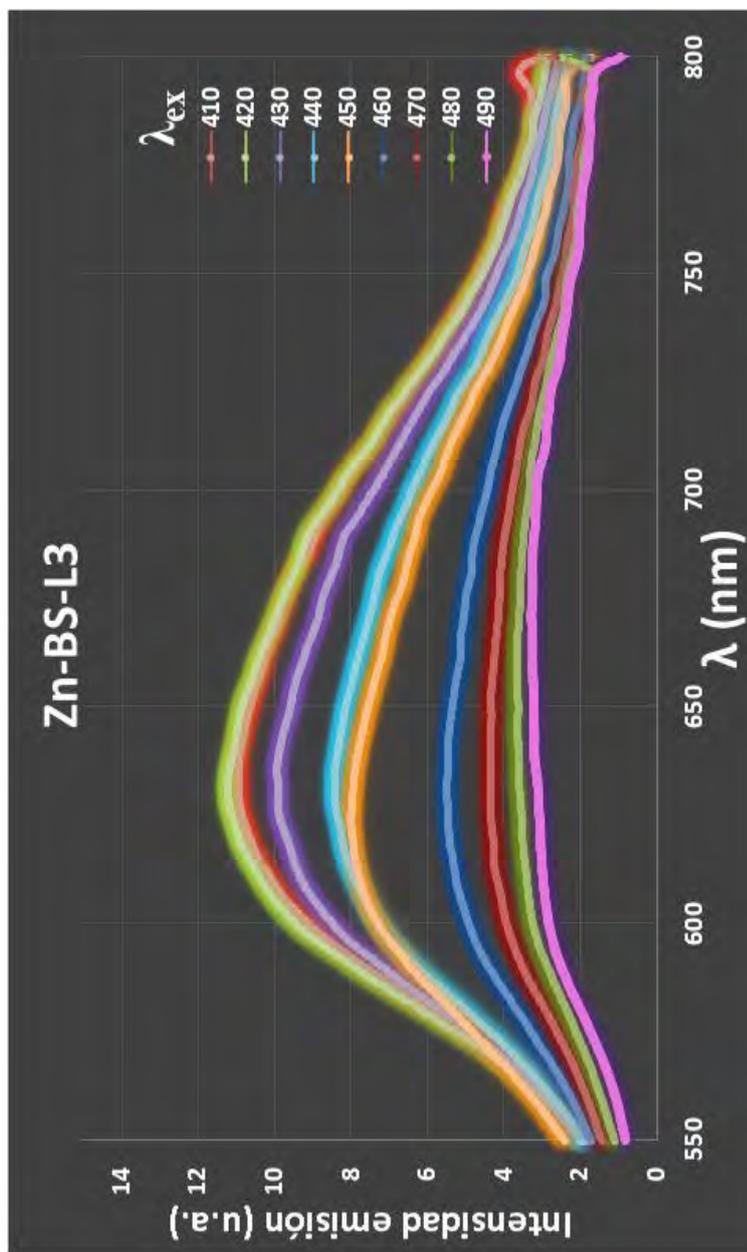
12.8.3 Espectro de emisión del ligando 7-metoxi-3-(4-metoxi-salicylideneamino)cumarina (BS-L2) a diferentes λ_{ex} .



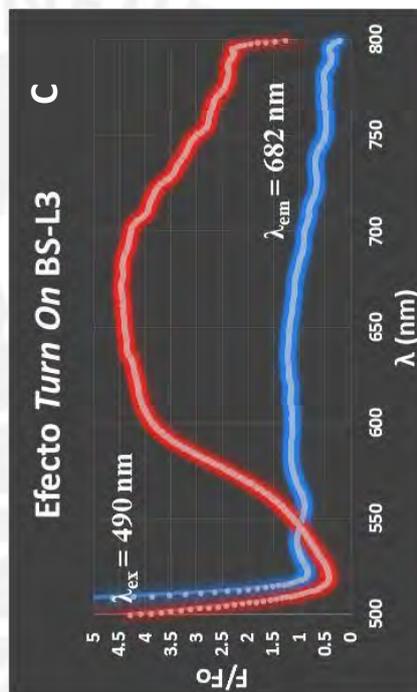
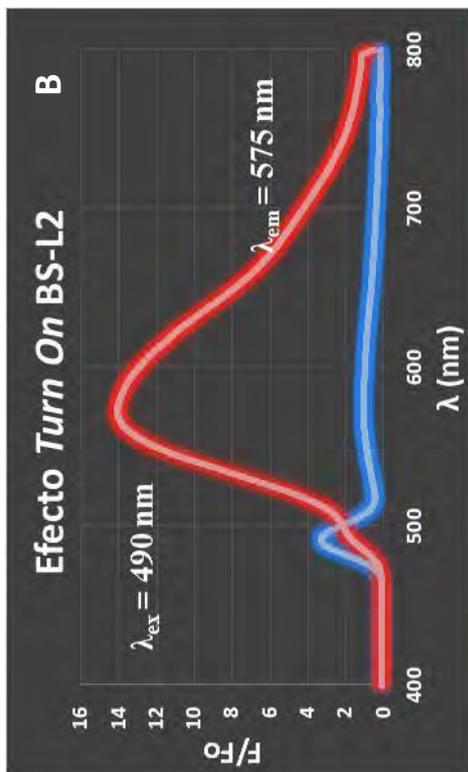
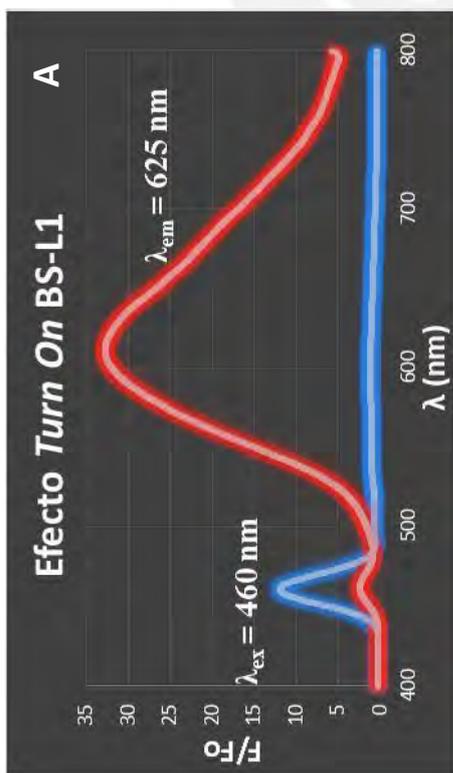
12.8.4 Espectro de emisión del complejo Zn-BS-L2 a diferentes λ_{ex} (Ligando/ Zn^{2+} 2:1).



12.8.5 Espectro de emisión del ligando 7-metoxi-3-(5-metoxi-salicilideneamino)cumarina (**BS-L3**) a diferentes λ_{ex} .



12.8.6 Espectro de emisión del complejo Zn-BS-L3 a diferentes λ_{ex} (Ligando/ Zn^{2+} 2:1).



12.8.7 Efecto **Turn On** de los ligandos en presencia de Zn²⁺; (A) BS-L1; (B) BS-L2; (3) BS-L3

