



**Universitat de les
Illes Balears**

Facultat de Ciències

Memòria del Treball de Fi de Grau

Síntesi i caracterització de conjugats d'esquaramides d'interès com a sensors

Bartomeu Galmés Sureda

Grau de Química

Any acadèmic 2017-18

Treball tutelat per Antonio Costa Torres

Departament de Química

S'autoritza la Universitat a incloure aquest treball en el Repositori Institucional per a la seva consulta en accés obert i difusió en línia, amb finalitats exclusivament acadèmiques i d'investigació	Autor		Tutor	
	Sí	No	Sí	No
	X		X	

Paraules clau del treball:

Esquaramides, fluoròfors, síntesi orgànica, valoracions espectrofotomètriques, valoracions per ¹H-RMN.

1. INTRODUCCIÓ	4
1.1. LA QUÍMICA SUPRAMOLECULAR	4
1.2. INTERACCIONS INTERMOLECULARS	4
1.2.1. INTERACCIONS ELECTROSTÀTIQUES	5
1.2.2. INTERACCIONS PER ENLLAÇOS D'HIDROGEN	5
1.2.3. INTERACCIONS π	6
1.2.4. INTERACCIONS DE VAN DER WAALS DISPERSIVES	7
1.3. MARCADORS FOTOLUMINISCENTS	7
1.4. SONDES MOLECULARS FLUORESCENTS	8
1.4.1. CLASSIFICACIÓ DELS FLUORÒFORS	8
1.5. MOLÈCULES OBJECTE D'ESTUDI	8
1.5.1. AMINES DERIVADES D'ANTRACENS I DE CUMARINES	8
1.5.2. DERIVATS DE L'ÀCID ESQUÀRIC	10
2. OBJECTIUS	13
3. RESULTATS I DISCUSSIÓ	14
3.1. PRODUCTES DERIVATS D'ANTRACENS	14
3.2. PRODUCTES DERIVATS DE LA CUMARINA FFN102 (3B)	15
3.2.1. ESTUDI DEL POTENCIAL DE L'ESQUARAMIDA (6) PEL SEU ÚS COM A SENSOR	20
4. CONCLUSIONS	25
5. PART EXPERIMENTAL	26
5.1. INFORMACIÓ GENERAL	26
5.2. PREPARACIÓ DELS FLUORÒFORS I DERIVATS	26
5.2.1. 1,8-DIAMINANTRACÈ (1)	26
5.2.2. INTENT DE SÍNTESI DEL DERIVAT BIS-ESQUARAMÍDIC (2) DEL 1,8-DIAMINANTRACÈ	27
5.2.3. 5-((TERT-BUTOXICARBONIL)AMINO)-3-OXOPENTANOAT DE METIL (3A)	27
5.2.4. CLORUR DE 2-(6-CLORO-7-HIDROXI-2-OXO-2H-CUMARIN-4-IL)ETANAMONI (3B)	28
5.2.5. 3-((2-(6-CLORO-7-HIDROXI-2-OXO-2H-CUMARIN-4-IL)ETIL)AMINO)-4-ETOXICICLOBUT-3-È-1,2-DIONA (4)	28
5.2.6. 3-((2-(6-CLORO-7-HIDROXI-2-OXO-2H-CUMARIN-4-IL)ETIL)AMINO)-4-HIDROXICICLOBUT-3-È-1,2-DIONA (5)	29
5.2.7. 3-((2-(6-CLORO-7-HIDROXI-2-OXO-2H-CUMARIN-4-IL)ETIL)AMINO)-4-((3-(DIMETILAMINO)PROPIL)AMINO)CICLOBUT-3-È-1,2-DIONA (6)	29
5.3. CARACTERITZACIÓ PER ESPECTROSCÒPIA UV-VIS I FLUORESCÈNCIA DELS PRODUCTES 3B-6	30
5.4. VALORACIONS ESPECTROFOTOMÈTRIQUES	31
5.5. VALORACIONS PER RMN	32

1. Introducció

1.1. La química supramolecular

La química supramolecular -definida pel Premi Nobel de Química de l'any 1987, Jean Marie Lehn-com "la química més enllà de les molècules", és aquella part de la química basada en les forces intermoleculares. Inclou l'estudi de les estructures i funcions de les entitats formades a partir de l'associació no covalent de dues o més espècies químiques¹. El disseny i la síntesi de molècules amb la capacitat d'establir associacions amb altres espècies químiques a través d'enllaços intermoleculares constitueix el camp conegut com a *Reconeixement molecular*. D'altra banda, quan s'estableixen associacions intermoleculares entre moltes espècies químiques, iguals o distintes, es parla d'*agregats supramoleculares* dels quals es troben nombrosos exemples a la natura (bicapes lipídiques, micel·les, estructura quaternària de proteïnes). A nivell tecnològic l'estudi de sistemes supramoleculares es troba a l'avantguarda de la recerca científica, on Jean-Pierre Sauvage, Sir J. Fraser Stoddart i Bernard L. Feringa obtingueren el Premi Nobel de Química de 2016 pel disseny i la síntesi de màquines moleculares².

La formació d'entitats supramoleculares té lloc sota un control termodinàmic, ja que que els diferents components una vegada mesclats, donen lloc al producte més estable a causa de les interaccions intermoleculares reversibles que s'estableixen entre ells. A continuació, s'exposaran les diferents interaccions que poden donar lloc a aquestes supramolècules.

1.2. Interaccions intermoleculares³

La unió d'una molècula hoste a una altra molècula que per les seves característiques estereoelectròniques pot actuar de receptor de la primera, ocorre mitjançant un reconeixement estèric i electrònic. L'afinitat d'unió es determina experimentalment a partir de la constant d'associació, K_i .

$$\Delta G = -RT \ln K_i = \Delta H - T\Delta S \quad Eq. 1$$

La constant d'associació es relaciona amb l'energia lliure de Gibbs d'unió i mesura l'afinitat d'un receptor per a una determinada molècula hoste en formar un complex supramolecular.

¹Dietrich, B.; Lehn, J. M.; Sauvage, J. P. Les crysptates. *Tet. Lett.* **1969**, *10*, 2889-2892.

²D. A. Leigh, *Angew. Chem. Int. Ed., Genesis of nanomachines: The 2016 Nobel Prize in Chemistry.* **2016**, *55*, 14506. DOI: 10.1002/anie.201609841

³Anslyn, E. V.; Dougherty, D. A.; "Modern Physical Organic Chemistry" University Science Books (2006) Chapter 3, 162-170 pp. ISBN:1-891389-31-9

Aquestes entitats supramoleculares poden obtenir-se per la formació d'una o més interaccions no covalents de forma cooperativa entre molècules complementàries. La sinèrgia entre les diferents interaccions establertes permet augmentar la selectivitat i estabilitat dels complexos formats.

En general, les interaccions intermoleculares implicades en la formació d'aquests complexos supramoleculares són del tipus electrostàtic, enllaços d'hidrogen, interaccions π - π , interaccions catió/anió- π o forces de Van der Waals.

1.2.1. Interaccions electrostàtiques

Les interaccions electrostàtiques inclouen les ió-íó, ió-dipol i dipol-dipol. Les ió-íó són les més energètiques de la categoria (50-300 kJ/mol) i es basen en interaccions no direccionals basades en l'atracció Coulombiana entre càrregues de distint signe. En el cas de les ió-dipol i les dipol-dipol, presenten una elevada direccionalitat, ja que el dipol ha d'estar correctament orientat per a una interacció òptima. Les ió-dipol són més energètiques que les dipol-dipol amb energies entre 50-200 kJ/mol i 5-50 kJ/mol, respectivament.

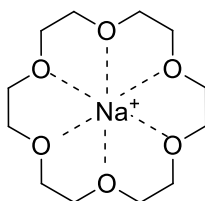


Figura 1. Estructura d'èter corona amb interacció electrostàtica del tipus ió-dipol

1.2.2. Interaccions per enllaços d'hidrogen

L'enllaç d'hidrogen és un tipus concret d'interacció dipol-dipol que pot presentar un ampli rang d'energia d'enllaç (4-120 kJ/mol). S'estableix entre un hidrogen acceptor enllaçat a un àtom electronegatiu (N, O, S o Halògens), que condueix a la polarització de l'enllaç, augmentant així el caràcter electropositiu de l'hidrogen. D'aquesta manera, aquest hidrogen electropositiu pot ser atret per un àtom proper amb electrons desaparellats conduint a la formació de la interacció per enllaç d'hidrogen. L'enllaç resultant és relativament feble, però l'acumulació d'aquests, juntament amb forces de van der Waals, permet la formació de complexos molt estables amb constants d'associació molt elevades. En el camp de la química supramolecular, l'enllaç d'hidrogen és un tipus d'interacció no covalent molt utilitzada per a la creació d'una àmplia varietat d'estructures supramoleculares.

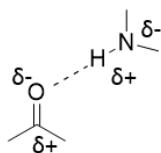


Figura 2. Representació d'un enllaç d'hidrogen entre un oxigen carbonílic i l'hidrogen d'una amina secundària.

1.2.3. Interaccions π

Principalment, existeixen tres tipus d'interaccions que involucren sistemes π : les interaccions π - π , les catió- π i les anió- π .

Les interaccions π - π s'estableixen entre dos sistemes aromàtics (10 kJ/mol) en el que un és ric en electrons i l'altre es troba electrònicament empobrit. Els sistemes aromàtics poden interaccionar mitjançant diferents orientacions. La **Figura 3** mostra algunes de les més comuns.

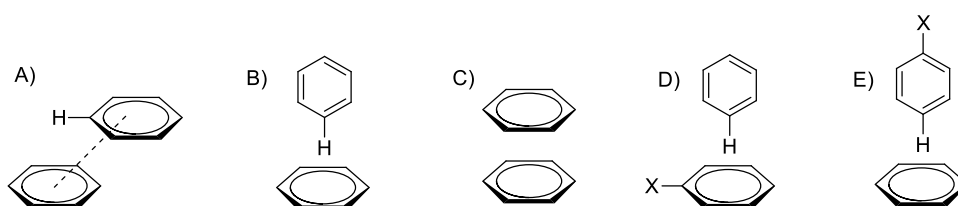


Figura 3. A) Interacció paral·lela desplaçada "parallel-displaced" entre dos benzens. B) Interacció en forma de T "T-shaped" entre dos benzens. C) Interacció cara a cara "face to face" entre dos benzens. D) i E) interaccions en forma de T en arens substituïts

Les interaccions catió- π constitueixen una força intermolecular que s'estableix entre un catió i una de les cares del sistema π d'un anell aromàtic. Resulten importants per al reconeixement molecular a nivell biològic. Estan presents en les estructures proteiques en les que residus de Lys i Arg protonats, interactuen amb sistemes aromàtics de fenilalanines, tirosines o triptòfans.

Taula 1. Energies d'associació entre cations alcalins i benzè en fase gas⁴.

Catió (M^+)	ΔG^0 (kJ/mol)
Li ⁺	-165
Na ⁺	-102
K ⁺	-80
Rb ⁺	-66

⁴ Kumpf, R. A.; Dougherty, D. A.; A mechanism for ion selectivity in potassium channels: computational studies of cation- π interactions. *Science*, **1993**, *261*, 1708-1710

Les interaccions anió- π pot pensar-se que hagin de ser repulsives perquè requereixen de la interacció entre un anió i un núvol d'electrons π . Malgrat això, s'ha descrit aquest tipus d'interacció en anells aromàtics que presenten deficiència electrònica. Aquesta interacció presenta una contribució de polarització induïda per l'anió i pels electrons, així com una contribució per interaccions dispersives.

1.2.4. Interaccions de Van der Waals dispersives

Es tracta d'interaccions atractives no direccionals entre dipols induïts. Es produeixen per la polarització del núvol electrònic de molècules veïnes resultant en una interacció dèbil (<2 kJ/mol)⁵. Aquestes interaccions són el resultat de dues contribucions. Les forces de dispersió de London en les que la interacció té lloc entre dos dipols induïts, o les forces de Debye que consisteixen en la interacció entre un dipol permanent i un dipol induït.

1.3. Marcadors fotoluminiscents

La fotoluminescència engloba els processos pels quals l'emissió de fotons es genera a partir d'una excitació prèvia induïda per fotons i inclou tant la fluorescència com la fosforescència. D'aquestes, la tècnica més emprada en els darrers anys per al marcatge de sistemes biològics ha estat la fluorescència on s'ha anat aconseguint una millora en la qualitat de la instrumentació permetent una major capacitat de manipulació i anàlisi i una millor resolució espacial⁶. És a l'any 2014 quan els esforços en la investigació en aquest camp culminen amb la concessió del premi Nobel de Química als investigadors E. Betzig, S.W. Hell i W.E. Moerner, pels seus avanços en el camp de la microscòpia de fluorescència. Això ha permès el desenvolupament d'aplicacions com la detecció de la interacció entre proteïnes, l'acumulació de determinats metabòlits en òrgans o la localització espacial dels diferents orgànuls cel·lulars mitjançant anticossos específics. A més, la varietat existent de fluoròfors i la possibilitat de modificacions d'alguns d'aquests permet la modulació de les propietats espectroscòpiques per adaptar-les a les condicions de cada aplicació concreta. Així doncs, gràcies a la fluorescència i a la seva capacitat per aportar protocols ràpids i de cost reduït, en la dècada de 1980 es desenvoluparen aplicacions tan importants en la biologia com la seqüenciació de l'ADN⁷, el marcatge de gels d'electroforesi o immunoassajos fluorescents.

⁵ Echevarría, J.; Aullón, G.; Danovich, D.; Shaik, S.; Alvarez, S. *Nat. Chem.* **2011**, *3*, 323-330

⁶ Lukinavičius, G.; Johnsson, K.; Fluorescence microscopy: Strategic blinking. *Nature Chem.*, **2014**, *6*, 663-664

⁷ Smith, L. M.; Sanders, J. Z.; Kaiser, R. J.; Hughes, P.; Dodd, C.; Connell, C. R.; Heiner, C.; Kent, S. B. H.; Hood, L. E.; Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature*, **1986**, *321*, 674-679

1.4. Sondes moleculars fluorescents

Una sonda fluorescent és tota molècula capaç d'absorbir llum d'una longitud d'ona determinada i emetre radiació de longitud d'ona major, emprada per a l'estudi de mostres biològiques. Els fluoròfors poden unir-se covalentment a fragments moleculars no fluorescent que tenen com a objectiu dirigir el fluoròfor al seu destí en el cas de sondes biològiques, o bé l'encarregada del reconeixement molecular en el cas de sondes analítiques. Poden classificar-se en funció del nucli fluorescent que contenen.

1.4.1. Classificació dels fluoròfors

En termes generals, els fluoròfors es classifiquen segons si es troben naturalment en els organismes vius (intrínsecs) o no (extrínsecs).

En el primer grup trobem exemples com serien les cadenes laterals d'aminoàcids, com el triptòfan o la fenilalanina; o cofactors enzimàtics com flavines o NADH.

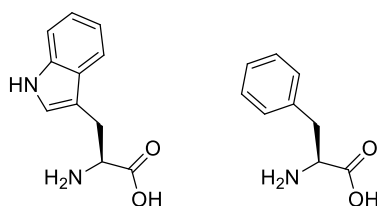


Figura 4. L-triptòfan (esquerra) i L-fenilalanina (dreta)

El grup de fluoròfors amb més interès químic és el dels fluoròfors extrínsecs, ja que permeten l'estudi de processos o estructures que no presenten fluorescència intrínseca com els lípids, o bé aquells en els que la fluorescència intrínseca no és adequada, com l'ADN, que presenta un rendiment quàntic extremadament baix⁸. L'elecció del nucli fluorescent depèn de les propietats que es requereixin, com les longituds d'ona d'excitació-emissió, la sensibilitat del pH o la possibilitat de derivatització, que consistiria en la unió covalent del fluoròfor a una altra estructura molecular encarregada del reconeixement específic del substrat que es vol marcar o detectar.

1.5. Molècules objecte d'estudi

1.5.1. Amines derivades d'antracens i de cumarines

Les amines derivades d'antracens i de cumarines, són agents fluoròfors extrínsecs, susceptibles de derivatització a través dels seus grups amina.

⁸ Markovitsi, D.; Gustavsson, T.; Talbot, F.; Excited states and energy transfer among DNA bases in double helices. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2007**, *6*, 717-724

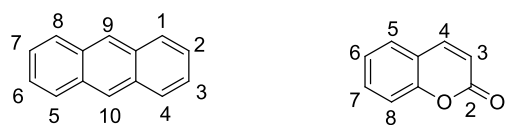


Figura 5. Estructura de l'antracè (esquerra) i de la cumarina (dreta)

En quant als derivats d'antracens, són àmpliament utilitzats per a la producció d'un gran nombre de colorants i el fet de que presentin fluorescència els fa útils per a la síntesi de derivats capaços de reconèixer de forma selectiva altres molècules i donar-ne una resposta mesurable. S'ha descrit a la bibliografia la síntesi de derivats d'antracens amb grups tiourea útils per al reconeixement molecular de mefedrona⁹ o de l'anió acetat.¹⁰

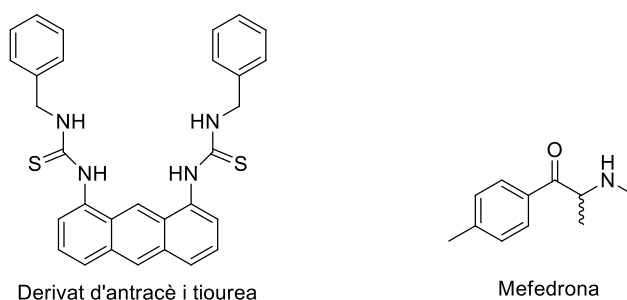


Figura 6. Estructura del derivat de tiourea(referència) i de la mefedrona

L'ús de derivats de cumarines com agents fluoròfors compta amb nombrosos i variats exemples en la bibliografia com són el cas del desenvolupament d'una sonda basada en una cumarina per a la detecció d'enzims desacetiladors d'histones (HDACs)¹¹, o el seu ús per a la comprovació de l'eficàcia d'un sistema d'alliberament controlat de fàrmacs estimulat a través de llum de longitud d'ona corresponent a l'infraroig proper (800-2500 nm)¹². En aquest estudi, concretament s'emprarà la cumarina designada com FFN102 (de l'anglès *Fluorescent False Neurotransmitter*), un fluoròfor sensible al pH i capaç d'acumular-se en vesícules sinàptiques juntament amb altres monoamines neurotransmissores com la dopamina o la epinefrina,

⁹ Kellet, K.; Hugh Broome, J.; Zloh, M.; Stewart B., K.; Fergus, Suzanne.; Gerhard, U.; L. Stair, Jacqueline.; Wallace, J., K.; Small molecule recognition of mephedrone using an anthracene molecular clip. *Chem. Commun.*, **2016**, 52, 7474-7477. DOI: 10.1039/c6cc03404g

¹⁰ Matsumoto, H.; Nishimura, Y.; Tatsuo, A.; Excited-state intermolecular proton transfer dependent on the substitution pattern of anthracene-diurea compounds involved in fluorescent ON¹-OFF-ON² response by the addition of acetate ions. *Org. Biomol. Chem.*, **2017**, 15, 6575. DOI: 10.1039/c7ob01376k

¹¹ Baba, R.; Hori, Y.; Mizukami, S.; Kikuchi, K.; Development of a fluorogenic probe with a transesterification switch for detection of histone deacetylase activity. *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, 134, 14310-14313. DOI: 10.1021/ja306045j

¹² P. Gorka, A.; R. Roger, N.; Zhu, J.; Mackem S.; J. Schnermann, M.; A near-IR uncaging strategy based on cyanine photochemistry. *J. Am. Chem. Soc.*, **2014**, 136, 14153-14159. DOI: 10.1021/ja5065203

permetent l'estudi i visualització del procés d'alliberament dels neurotransmissors del tipus catecolamina des dels terminals presinàptics en el cervell^{13,14}.

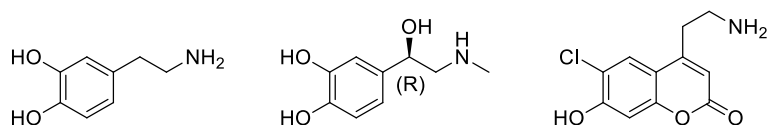


Figura 7. D'esquerra a dreta, estructura química de la dopamina, l'epinefrina i la cumarina FFN102.

1.5.2. Derivats de l'àcid esquàric

L'àcid esquàric¹⁵ està constituït per un anell de ciclobutè amb dos grups carbonils contigus i dos grups hidroxils als carbonis restants amb hidrògens fortament àcids (pK_a 0,54 i 3,48) a causa de l'augment de l'aromaticitat amb la desprotonació i l'estabilització per ressonància de la base conjugada. El terme esquarat fa referència a l'anió que resulta de la ionització d'un o els dos hidrògens de l'àcid. Si un o ambdós hidroxils es troben substituïts per alcohols, donen lloc als èsters de l'àcid esquàric. En cas de mantenir un dels dos hidroxils i substituir l'altre per la funció amida, es solen denominar àcids amidoesquàrics o àcids esquaràmics. Finalment, si l'anell d'esquarat es troba en forma de diamida, es té com a resultat les diesquaramides o simplement esquaramides.

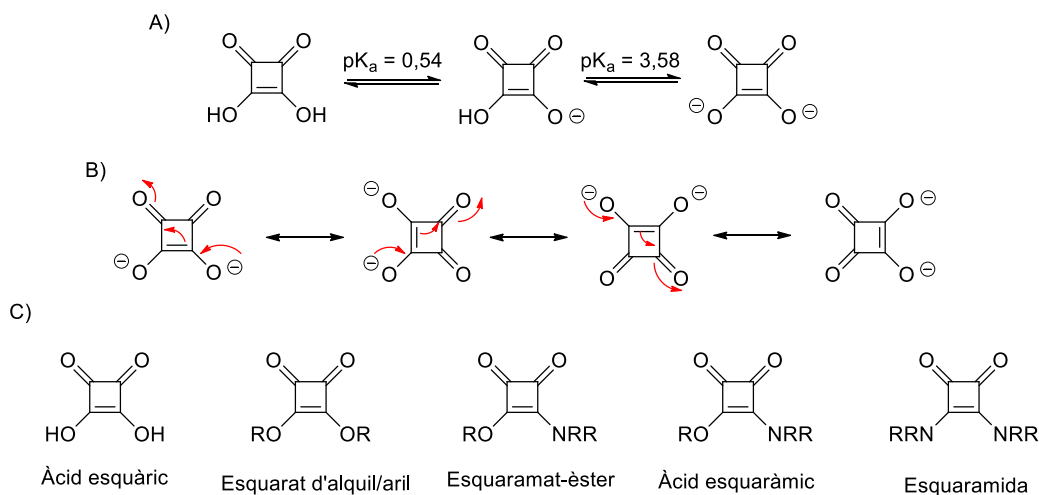


Figura 8. A) Acidesa de l'àcid esquàric. B) Deslocalització electrònica de l'anió esquarat. C) Derivats de l'àcid esquàric

¹³ Lee, Minhee; G.Gubernator, Niko; Sulzer, David; Sames, Dalibor; Development of pH-Responsive Fluorescent False Neurotransmitters. *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, *132*, 8828-8830 DOI: 10.1021/ja101740k

¹⁴ Liu, X.; Savy, A.; Maurin, S.; Grimaud, Laurence.; Darchen, F.; Quinton, D.; Labbé, E.; Buriez, O.; Delacotte, J.; Lematître, F.; Guille-Collignon, M.; A dual functional electroactive and fluorescent probe for coupled measurements of vesicular exocytosis with high spatial and temporal resolution. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 2366-2370. DOI: 10.1002/anie.201611145

¹⁵ 3,4-dihidroxi-3-ciclobuten-1,2-diona

Els derivats de l'àcid esquàric troben aplicació en àrees variades de la química, encara que d'entre tots ells, les esquaramides han estat els derivats que han experimentat un major desenvolupament i els que presenten major nombre d'aplicacions.¹⁶

Moltes de les aplicacions que presenten les esquaramides estan relacionades amb el seu elevat potencial per a establir enllaços d'hidrogen. Així doncs, aquestes estan capacitades per formar fins a quatre enllaços d'hidrogen actuant com a acceptor, donador o ambdues funcions amb una elevada afinitat, que pot explicar-se per l'augment de l'aromaticitat de l'anell d'esquarat a causa de l'establiment dels enllaços d'hidrogen. Aquesta afinitat per la formació d'enllaços d'hidrogen fa que s'hagin creat receptors sintètics de base esquaramida per al reconeixement tant de cations¹⁷ com d'anions¹⁸.

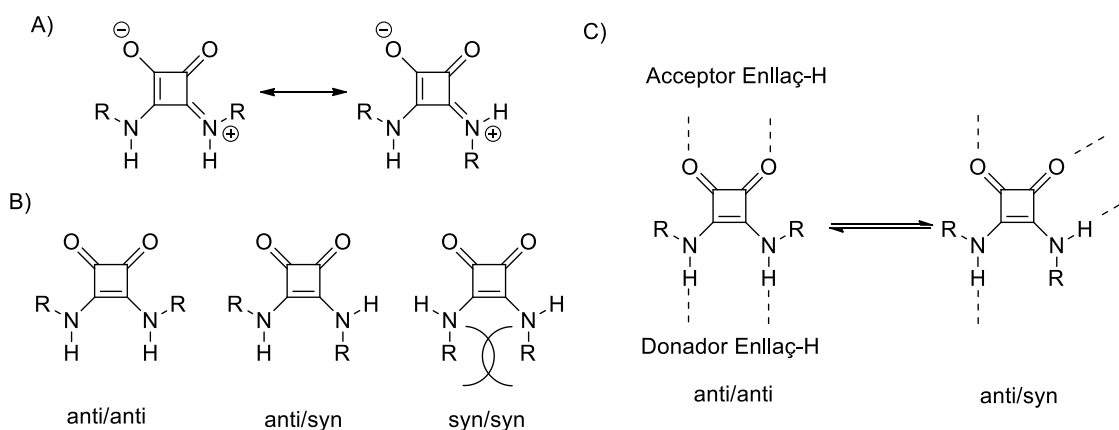


Figura 3. A) Conjugació del parell d'electrons del nitrogen. B) Confòrmers de les esquaramides. C) Capacitat d'establir enllaç d'hidrogen dels tipus de confòrmers descrits a la bibliografia.

Malgrat les evidents similituds entre les amides i les esquaramides, un dels trets més distintius és la rigidesa i planaritat d'aquestes darreres, estabilitzada per la conjugació dels parells electrònics del nitrogen a l'interior del cicle de ciclobutendiona, donant com a resultat que aquests mantinguin essencialment una hibridació sp^2 . Aquesta situació impedeix la lliure rotació de l'enllaç C-N i, per al cas de esquaramides secundàries, dóna lloc a l'existència d'un

¹⁶ Ian Storer, R.; Aciro, C.; H. Jones, L.; Squaramides: physical properties, synthesis and applications. *Chem. Soc. Rev.*, **2011**, *40*, 2330-2346. DOI: 10.1039/c0cs00200c

¹⁷ Tomàs, S.; Prohens, R.; Vega, M.; Rotger, M.C.; Deyà, P.M.; Ballester, P.; Costa, A.; Squaramido-Based Receptors: Design, synthesis, and application to the recognition of tetraalkylammonium compounds. *J. Org. Chem.*, **1996**, *61*, 9394-9401.

¹⁸ Frontera, A.; Morey, J.; Oliver, A.; Piña, M.N.; Quiñonero, D.; Costa, A.; Ballester, P.; Deyà, P.M.; Anslyn, E.V.; Rational design, synthesis, and application of a new receptor for the molecular recognition of tricarboxylate salts in aqueous media. *J. Org. Chem.*, **2006**, *71*, 7185-7195. DOI: 10.1021/jo0609327

equilibri entre els diferents conformers *anti/anti* i *syn/anti* (el *syn/syn* no ha estat observat a causa de la repulsió estèrica entre els grups R¹⁹).

Així doncs, les característiques fisicoquímiques i la capacitat de reconeixement d'altres espècies que presenten les esquaramides fan que trobin aplicació en nombrosos camps de la química com són la catàlisi^{20,21}, la química mèdica²², o la química supramolecular amb aportacions en el reconeixement d'ions i el seu transport a través de membranes²³, o en la derivatització de fluoròfors per la síntesi de sondes fluorescents²⁴, entre d'altres aplicacions.

¹⁹ Rotger, M.C.; Piña, M.N.; Frontera, A.; Martorell, G.; Ballester, P.; Deyà, P.M.; Costa, A.; Conformational preferences and self-template macrocyclization of squaramide-based foldable modules, *J. Org. Chem.*, **2004**, *69*, 2302-2308.

²⁰ Chauhan, P.; Mahajan, S.; Kaya, U.; Hack, D.; Enders, D.; Bifunctional amine-squaramides: powerful hydrogen-bonding organocatalysts for asymmetric domino/cascade reactions. *Adv. Synth. Catal.* **2015**, *357*, 253-281. DOI: 10.1002/adsc.201201003

²¹ Sopeña, S.; Martín, E.; Escudero-Adán, E.C.; Kleij, A.W.; Pushing the limits with squaramide-based organocatalysts in cyclic carbonate synthesis. *ACS Catal.* **2017**, *7*, 3532-3539 DOI: 10.1021/acscatal.7b00475

²² Olmo, F.; Rotger, M.C.; Ramírez-Macías, I.; Martínez, L.; Marín, C.; Carreras, L.; Urbanová, K.; Vega, M.; Chaves-Lemaur, G.; Sampedro, A.; Rosales, M.J.; Sánchez-Moreno, M.; Costa, A.; Synthesis and biological evaluation of N,N'-Squaramides with high in vivo efficacy and low toxicity: toward a low-cost drug against Chagas disease. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 987-999. DOI: 10.1021/jm4017015.

²³ Busschaert, N.; Kirby, I.L.; Young, S.; Coles, S. J.; Horton, P. N.; Light, M.E.; Gale, P.A.; Squaramides as potent transmembrane anion transporters. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 4426-4430.

²⁴ Sampedro, A.; Villalonga-Planells, R.; Vega, M.; Ramis, G.; Fernández de Mattos, S.; Villalonga, P.; Costa, A.; Rotger, M.C.; Cell uptake and localization studies of squaramide based fluorescent probes. *Bioconjugate Chem.* **2014**, *25*, 1537-1546. DOI: 10.1021/bc500558b

2. Objectius

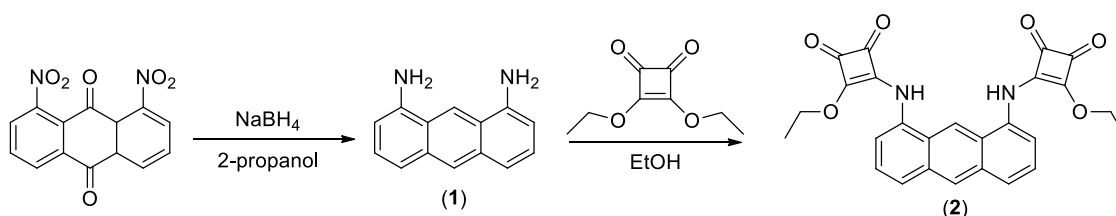
Els objectius que es plantegen per aquest treball són:

- La síntesi de derivats d'àcid esquàric a partir del 1,8-diaminatrancè
- La síntesi dels derivats de la cumarina FFN102.
- La caracterització per ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, HRMS, UV-Visible i fluorescència dels productes sintetitzats.
- L'estudi inicial del potencial d'un dels derivats esquaramídics pel seu ús com a sensor de l'anió fosfat.

3. Resultats i discussió

3.1. Productes derivats d'antracens

L'obtenció de derivats de l'àcid esquàric a partir de diamines antracèniques era un dels objectius plantejats en aquest treball. Com a diamina antracènica, es va emprar el compost 1,8-diaminoantracè (**1**), obtingut a partir de la reducció amb borohidruir sòdic del producte comercial 1,8-dinitroantracè-9,10-diona⁸. La reacció es realitzà a reflux i en atmosfera d'argó per evitar la re-oxidació de l'amina resultant. Tant l'amina (**1**) com el matràs on es dugué a terme la seva preparació es manipularen protegits de la incidència de la llum com a conseqüència de la seva fotosensibilitat.



Esquema 1. Procés per a l'obtenció del bisesquaramat d'etil (2)

Mecanísticament, la reacció per a l'obtenció del bisesquaramat d'etil (**2**) consisteix en una reacció d'addició-eliminació de cada un dels dos grups amina sobre dues molècules d'esquarat de dietil. La reacció es realitzà en etanol i, paral·lelament en èter dietílic a temperatura ambient i en atmosfera d'argó. Malauradament, en aquestes condicions no s'aconseguí obtenir el bisesquaramat d'etil (**2**), pel que s'intentà realitzar la reacció en condicions diferents. Així doncs, la reacció es provà de dur a terme a 60°C en etanol però els resultats no milloraren. En tots els casos la reacció es realitzà evitant l'exposició a la llum i treballant en atmosfera d'argó. L'espectre de ¹H-RMN de la mescla de reacció resultant en cada un dels casos semblava contenir gran varietat de productes semblants. La separació per cromatografia en columna de les distintes mescles de reacció donà majoritàriament productes d'oxidació de l'amina (**1**) i com a producte minoritari de la darrera fracció, rica en amina de partida (**1**), el producte corresponent a la reacció d'addició-eliminació d'un dels dos grups amina (**Figura 10**).

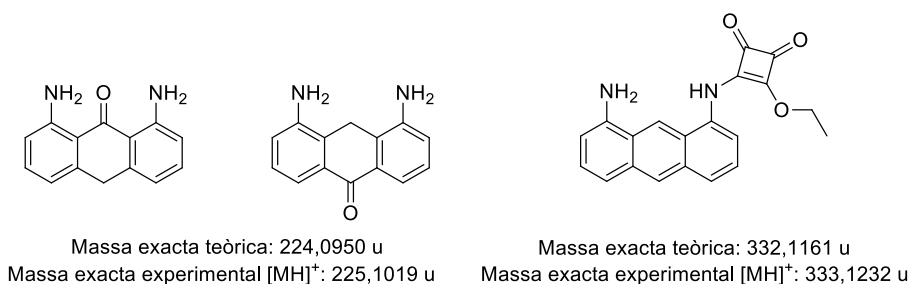
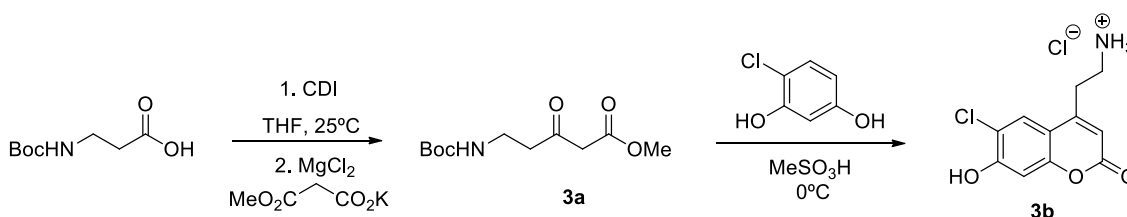


Figura 10. Assignació d'estructures concordants amb els pics de l'anàlisi per espectrometria de masses de les fraccions separades per cromatografia en columna.

3.2. Productes derivats de la cumarina FFN102 (**3b**)

Un dels objectius d'aquest treball consistia en la preparació de la cumarina FFN102 (**3b**) descrita a la bibliografia, i la posterior síntesi dels seus derivats esquaramat d'etil (**4**), àcid esquaràmic (**5**) i esquaramida (**6**), així com la caracterització espectroscòpica per ultraviolat-visible i fluorescència d'aquests. A continuació es presenten els esquemes de reacció seguits per a l'obtenció de cadascun dels productes indicats.

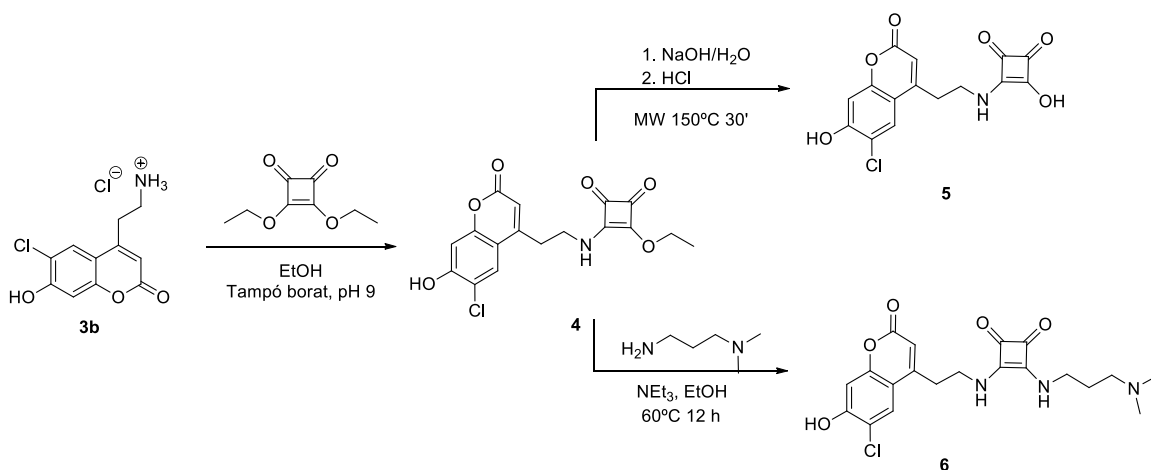


Esquema 2. Esquema de reacció per a la preparació de la cumarina FFN102. (CDI: 1,1-carbonildiimidazol)

La primera reacció per a l'obtenció del β -cetoèster (**3a**) és una reacció d'addició-eliminació que requereix de l'activació del grup àcid amb 1,1-carbonildiimidazol (CDI), un agent d'acoblament. La reacció es dugué a terme en condicions anhidres per evitar la hidròlisi del CDI i del producte resultant de l'activació del grup àcid de la β -Glicina-NBoc protegida. Un cop produïda l'activació del grup àcid, té lloc la reacció d'addició del malonat amb eliminació del grup activant, i la posterior descarboxilació per donar lloc al β -cetoèster (**3a**). L'obtenció de la cumarina (**3b**) s'aconseguí mitjançant una reacció clàssica de condensació von Pechmann amb l'àcid metanosulfònic com a catalitzador àcid i evitant l'exposició tant del matràs de reacció com del producte resultant a la llum pel seu caràcter fotosensible.

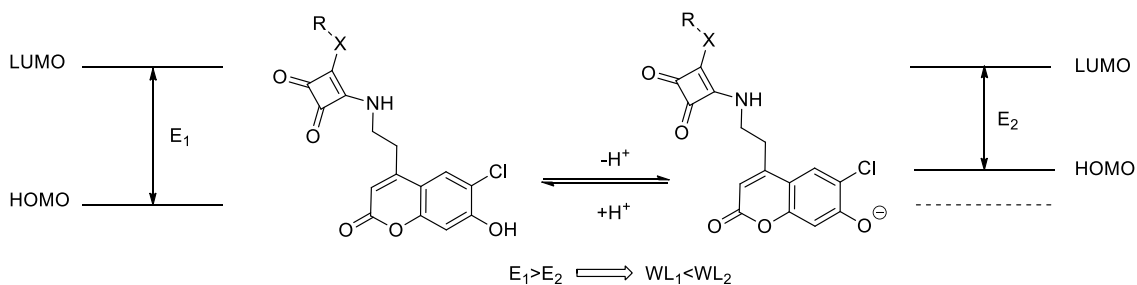
En referència a l'**Esquema 3**, la síntesi de l'esquaramat d'etil (**4**) és una reacció d'addició-eliminació directa sobre l'esquarar de dietil. La reacció es realitzà en medi tamponat per aconseguir la neutralització del clorhidrat, alliberant l'amina, per a què actués com a nucleòfil; i amb un excés d'esquarar de dietil per afavorir el desplaçament de l'equilibri cap a la formació

del producte monosubstituit. A partir de l'esquaramat d'etil (**4**) es sintetitzaren els corresponents derivats àcid esquaràmic (**5**) i esquaramida (**6**). L'àcid esquaràmic (**5**) s'obtingué per hidròlisi del corresponent èster (**4**) en medi aquós i catàlisi bàsica aprofitant l'escalfament dielèctric proporcionat per un reactor de microones. Per altra banda, l'esquaramida (**6**) s'obtingué per una reacció d'addició-eliminació de la N,N-dimetilpropil-1,3-diamina sobre l'esquaramat d'etil (**4**) amb sortida del grup etòxid, emprant un excés de l'amina esmentada (1,2 equivalents) i duent a terme la reacció amb medi bàsic i a 60°C. La conjugació del parell d'electrons del nitrogen amb el sistema aromàtic de l'anell de ciclobutediona disminueix l'electrofilia del carboni que ha d'experimentar la substitució, pel que foren necessàries condicions de reacció més enèrgiques que les requerides per a què es produeixi la primera substitució. La manipulació de tots els productes derivats del producte FFN102 (**3b**), es dugué a terme protegint-los de la incidència de la llum.



Esquema 3. Obtenció dels diferents derivats esquaramat d'etil (**4**), àcid esquaràmic (**5**) i esquaramida (**6**)

El manteniment de l'hidroxil fenòlic en els tres derivats els hi confereix, com en l'FFN102, característiques espectroscòpiques i fluorescents diferents en funció del pH com a resultat de l'equilibri àcid-base entre el fenol i el fenolat.



Esquema 4. Equilibri àcid-base en els derivats de FFN102 responsable de la seva fotosensibilitat al pH. WL es refereix a la longitud d'ona a la que apareix el màxim de les dues bandes

Així doncs, en funció del pH, els productes exhibeixen dues bandes d'excitació a 330 nm o 370 nm que es corresponen amb les formes fenol i fenolat del fluoròfor. No és d'estranyar que la banda de la cumarina ionitzada sigui menys energètica que la del seu homòleg protonat, ja que la conjugació de la càrrega negativa de l'oxigen amb l'anell aromàtic eleva l'energia de l'HOMO i per tant, disminueix la diferència energètica entre els estat HOMO-LUMO entre els que es dona el trànsit (**Esquema 4**). La introducció de la unitat ciclobutendiona i la variació de X que dona lloc als diferents derivats del FFN102 (**4**, **5** i **6**) no condueix a diferències significatives en la posició dels màxims de les bandes dels espectres d'absorció, pel que pot deduir-se que la densitat de càrrega de l'anell fenòlic no es veu alterada amb aquestes modificacions. No obstant això, s'observa un efecte d'atenuació de la fluorescència o "quenching" en els derivats sintetitzats (**4**, **5** i **6**) respecte el fluoròfor FFN102. L'origen d'aquest efecte probablement és causat per una transferència electrònica fotoinduída, PET (Photoinduced Electron Transfer). En aquest procés existeix una transferència d'electrons d'un donador a un acceptor, afectant als nivells energètics responsables de la fluorescència. Aquest efecte és sensible a la distància entre el fluoròfor i el grup que aporta el parell d'electrons i s'ha observat en esquaramides, en les que l'anell esquaramídic es comporta com a donador²⁵. A continuació, es mostren els espectres de l'amina **3b** (**Figura 11**) i dels diferents derivats **4-6** (**Figura 12**).

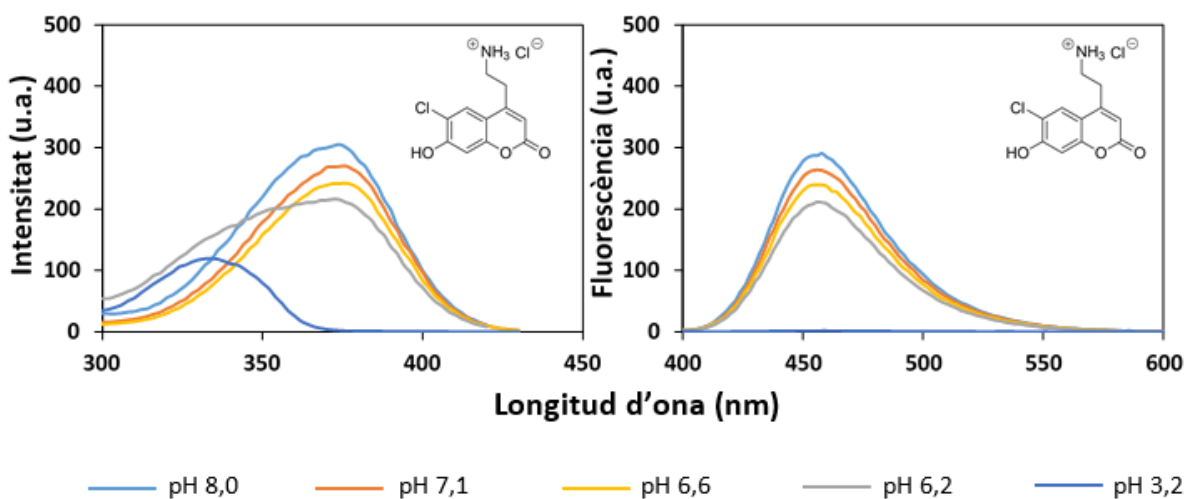


Figura 11. Fluorescència de l'amina (**3b**) a $C = 4,0 \cdot 10^{-6}$ M. Els espectres d'excitació s'han obtingut excitant la mostra entre 250 nm i 450 nm i captant la radiació emesa a 456 nm. Els espectres d'emissió s'han obtingut excitant la mostra a 375 nm i captant la radiació emesa entre 400 nm i 600 nm.

²⁵ Prohens, R.; Martorell, G.; Ballester, P.; Costa, A.; A squaramide fluorescent ensemble for monitoring sulfate in water. *Chem. Commun.*, **2001**, 1456-1457.

A la concentració a la que s'obtingueren els espectres de fluorescència i per a una amplada de finestra del detector de 3 mm, la banda d'emissió de l'amina (**3b**) a 456 nm saturà el detector (fluorescència superior a 1000 u.a.). A la **Figura 11** se'n presenten els espectres a la mateixa concentració que els seus derivats però a una amplada de finestra 1,5 mm.

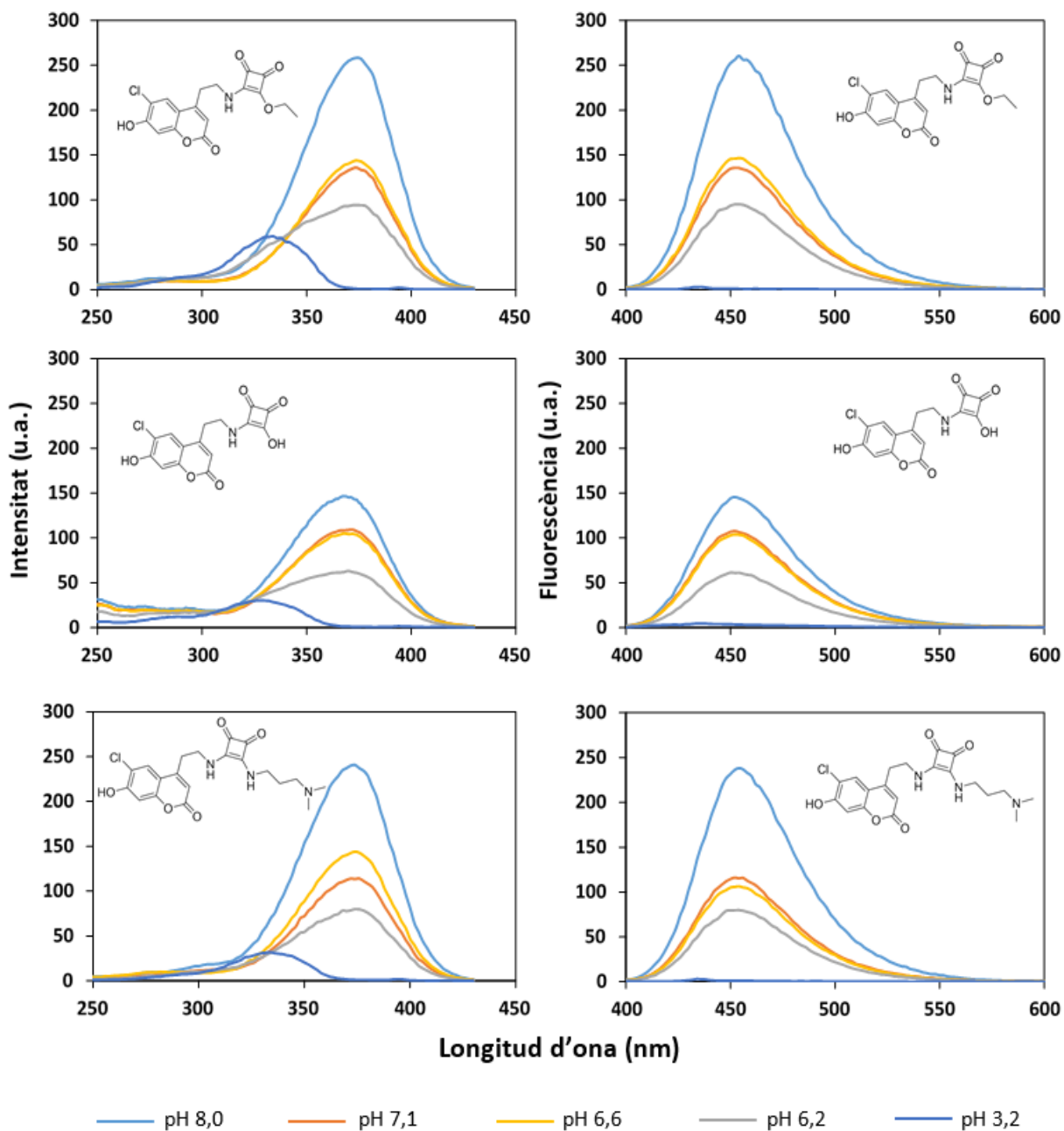


Figura 12. Fluorescència dels productes **4** ($2,5 \cdot 10^{-6}$ M), **5** ($3,2 \cdot 10^{-6}$ M) i **6** ($3,4 \cdot 10^{-6}$ M). Els espectres d'excitació s'han obtingut excitant la mostra entre 250 nm i 450 nm i captant la radiació emesa a 456 nm. Els espectres d'emissió s'han obtingut excitant la mostra a 375 nm i captant la radiació emesa entre 400 nm i 600 nm.

Per a obtenir els espectres d'espectroscòpia ultraviolat visible, s'empraren les mateixes dissolucions utilitzades per obtenir els espectres de fluorescència d'excitació i emissió dels productes **(3b)**-**(6)**. En quant als espectres d'ultraviolat-visible, en els derivats **(4)**, **(5)** i **(6)** s'observa l'aparició de la banda corresponent al cycle de ciclobutendiona amb màxim a 275,0 nm, 280,0 nm i 290,0 nm respectivament; a més de les bandes de la cumarina dependents del pH (**Figura 13**).

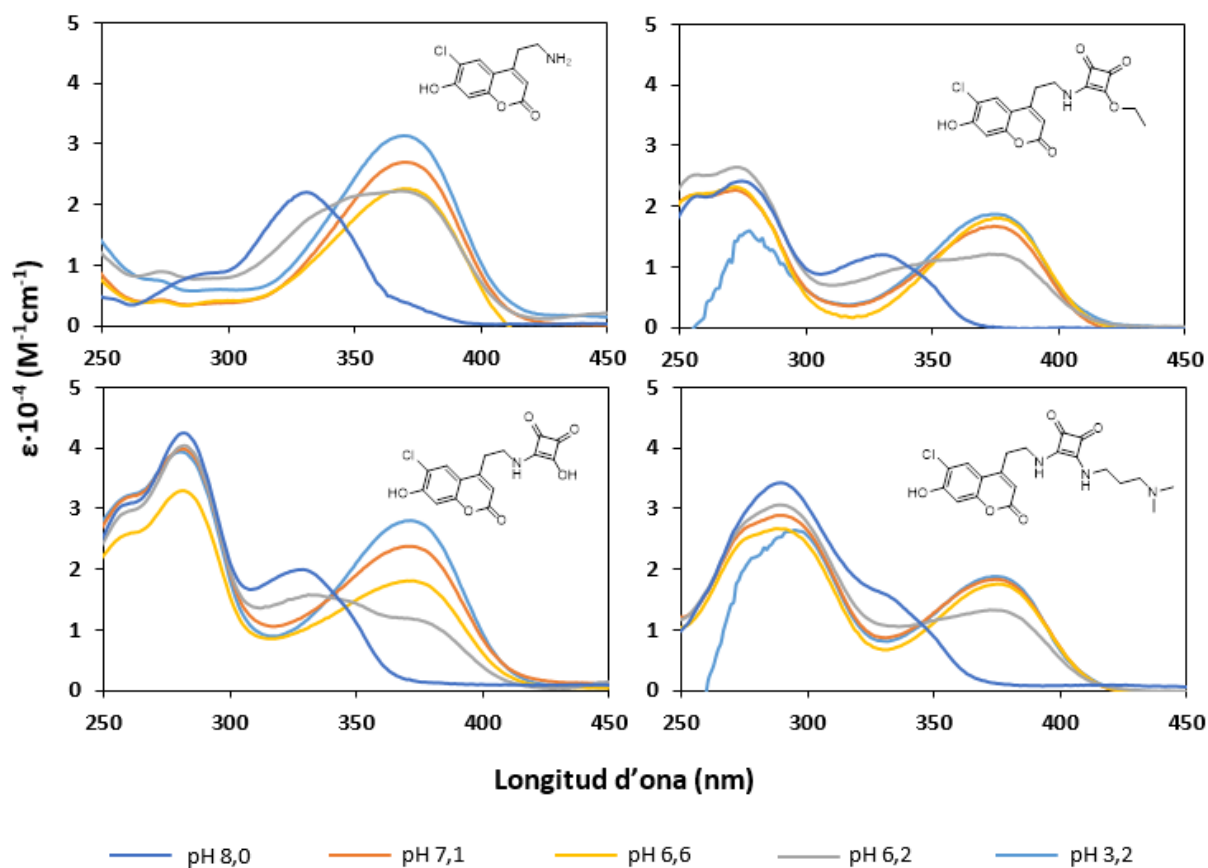


Figura 13. Espectres UV-Visible dels productes **3b** ($4,0 \cdot 10^{-6}$ M), **4** ($2,5 \cdot 10^{-6}$ M), **5** ($3,2 \cdot 10^{-6}$ M) i **6** ($3,4 \cdot 10^{-6}$ M) a diferents valors de pH

3.2.1. Estudi del potencial de l'esquaramida (6) pel seu ús com a sensor

En primer lloc, es va dur a terme una valoració espectrofotomètrica per determinar els valors de pK_a del receptor i conèixer així l'espècie química majoritària a cada pH.²⁶

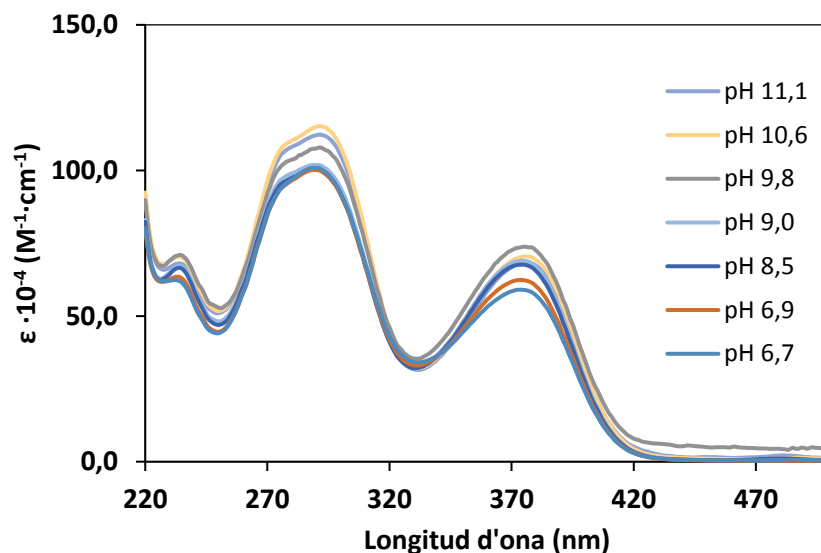
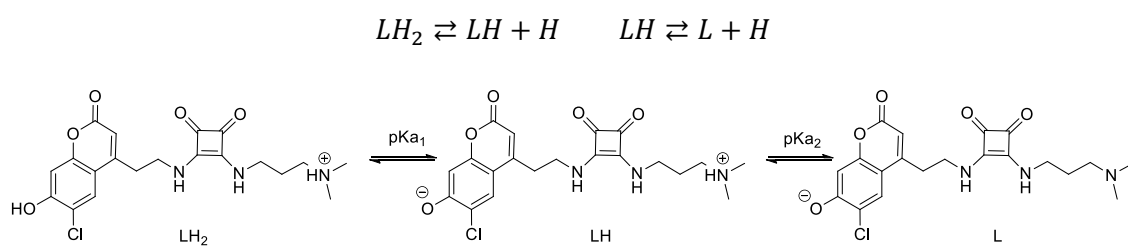


Figura 14. Valoració espectrofotomètrica de l'esquaramida (6) ($1,0 \cdot 10^{-6}$ M) des de pH 6,7 fins a pH 11,1 enregistrant els espectres cada 0,1 unitat de pH. Només es representen 7 dels 50 espectres enregistrats per a una major claredat de la figura.

Amb les dades dels espectres obtinguts i definint els equilibris àcid base que tenen lloc, poden obtenir-se els valors de pK_a per als dos centres ionitzables, el grup hidroxil fenòlic i el grup dimetilamoni, mitjançant l'ajust a un model d'un àcid dipròtic amb el software HypSpec2014²⁷.



Esquema 5. Equilibris àcid-base de l'esquaramida (6)

Taula 2. Valors de pK_a per als centres ionitzables de l'esquaramida (6).

$\log LH_2$	$16,53 \pm 0,02$
$\log LH$	$9,655 \pm 0,007$
pK_{a1}	$6,88 \pm 0,03$
pK_{a2}	$9,655 \pm 0,007$

²⁶ López, C.; Vega, M.; Sanna, E.; Rotger, C.; Costa, A.; Efficient microwave-assisted preparation of squaric acid monoamides in water *RSC Adv.*, **2013**, 1-5. DOI: 10.1039/c3ra41369a

²⁷ HypSpec 2014 program (Protonic Software. <http://www.hyperquad.co.uk>)

El valor de pK_a de l'anell fenòlic (6,88) és del mateix ordre que el valor que es troba a la bibliografia²⁸ d'altres fenols a cumarines semblants com són el cas del *Mini 102* o el *Mini 202* amb pK_a de 6,2 i 6,4, i l'amina terciària presenta un valor d'acord a altres amines terciàries com la trimetilamina (9,87). L'ajust de les dades experimentals a un model teòric d'un àcid dipròtic permet obtenir l'especiació de l'esquaramida (**6**) en funció del pH tal i com mostra la **Figura 16**.

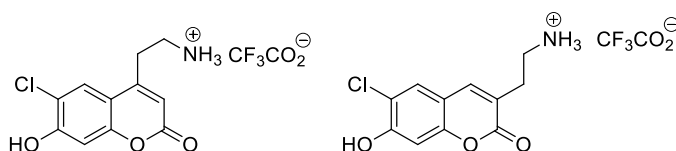


Figura 15. *Mini 102* (esquerra) i *Mini 202* (dreta).

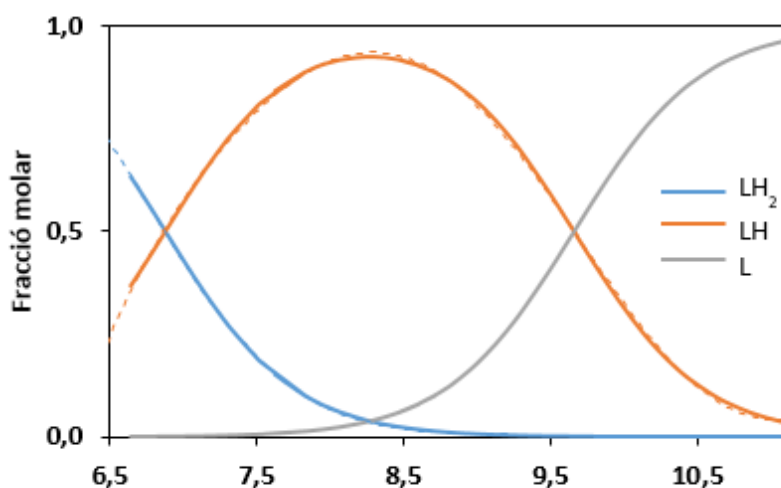
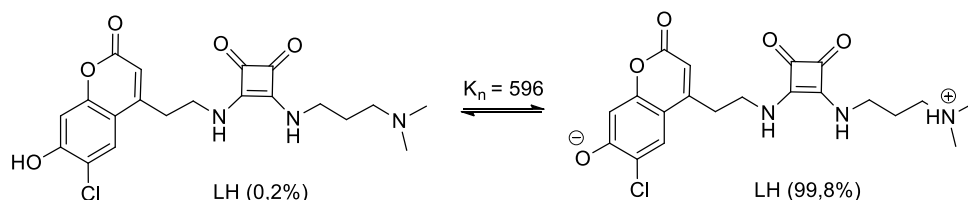


Figura 16. Especiació de l'esquaramida (**6**) en l'interval de pH entre 6,5 i 11,0

L'espècie química majoritària (LH) en un medi aquós entre pH 7,5 i 9,5 (LH), es troba en equilibri entre una forma zwitteriònica i una altra sense els grups ionitzats. Amb els valors de pK_a d'ambdós grups es pot calcular la proporció en què es troba l'espècie LH.



Esquema 6. Equilibri entre les dues formes que presenta l'espècie química LH de l'esquaramida (**6**)

²⁸ Lee, Minhee; G.Gubernator, Niko; Sulzer, David; Sames, Dalibor; Development of pH-Responsive Fluorescent False Neurotransmitters. *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, *132*, 8828-8830

Conèixer l'estat en què es troba és important per saber el tipus d'interaccions intermoleculares que és capaç d'establir amb altres molècules. Així doncs, l'espècie química LH en dissolucions aquoses i en l'interval de pH entre 7,5 i 9,5 es troba quasi totalment en forma zwitteriònica.

Una vegada que és coneix l'especiació de l'esquaramida (**6**) és possible avaluar mitjançant ^1H -RMN, la seva capacitat d'actuar com a receptor per a l'anió fosfat. L'afinitat del fluoròfor per l'anió fosfat s'estudià emprant difenilfosfat sòdic com a anió en DMSO- d_6 , un dissolvent polar apròtic que afavoreix la formació de complexos amb anions. L'avaluació numèrica consisteix en la realització de valoracions per ^1H -RMN, on partint d'una concentració constant del receptor, es van afegint concentracions creixents de l'anió fosfat que s'utilitza com a substrat. Per això una vegada assignades les senyals del receptor, s'avalua l'efecte que presenten els seus desplaçaments químics a concentracions creixents de difenilfosfat sòdic, des de 0 fins a $4,9 \cdot 10^{-3}$ M per a una concentració constant de (**6**) de $9,5 \cdot 10^{-4}$ M.

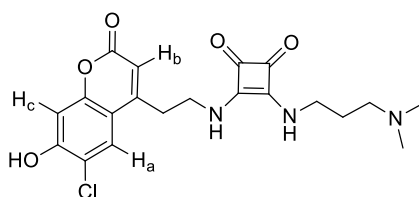
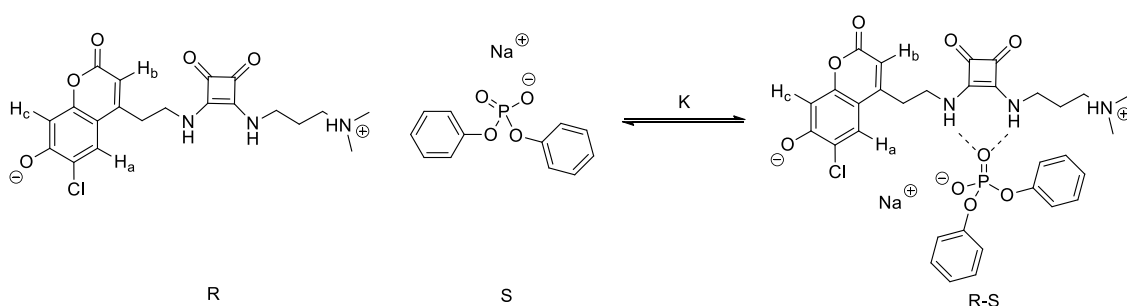


Figura 17. Assignació dels nuclis que experimenten desplaçament per la formació del complex Substrat-Receptor

L'ajust de les dades requereix la definició prèvia dels equilibris que tenen lloc entre el receptor i el substrat. En aquest cas s'ha suposat un equilibri de formació del complex supramolecular amb una proporció 1:1 (receptor:substrat), tal i com indica l'**Esquema 7**.



Esquema 7. Equilibri de formació del complex Receptor-Substrat.

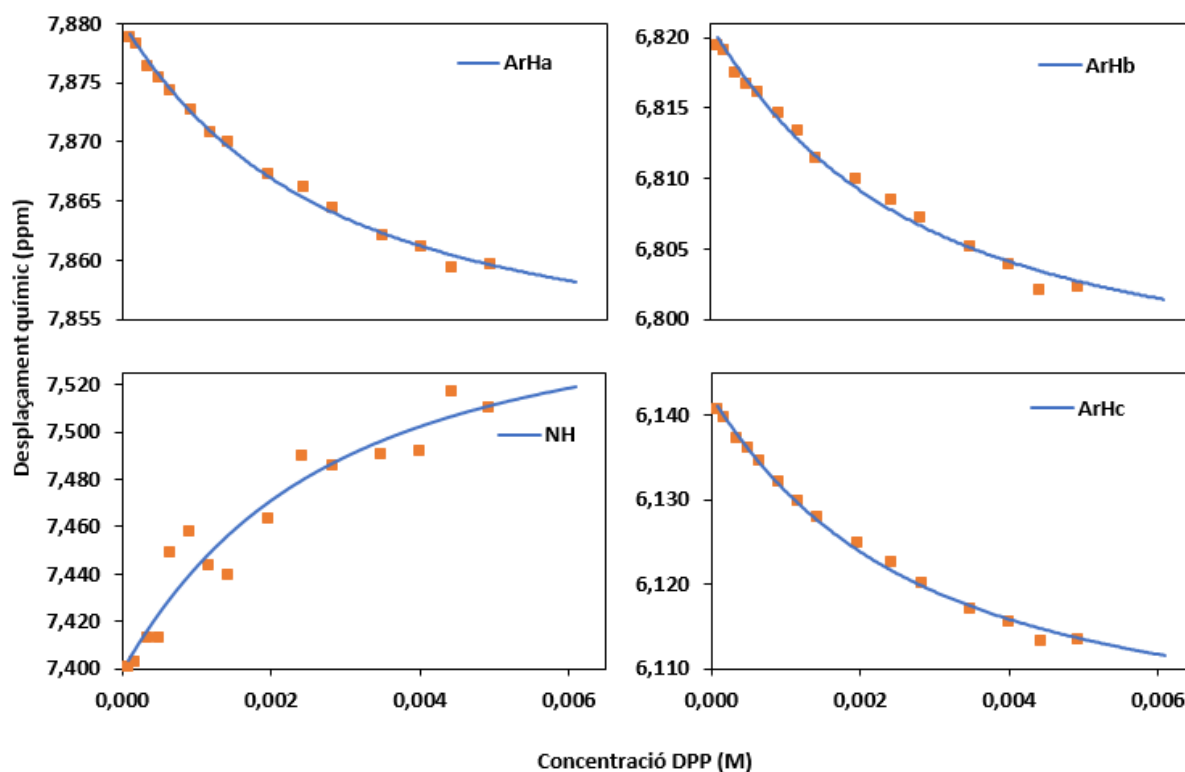


Figura 18. Desplaçaments químics de les senyals de l'esquaramida (**6**) en funció de la concentració de difenilfosfat (DPP). En taronja es mostren els punts experimentals. L'ajust matemàtic a un model 1:1 es representa en color blau.

Tal i com es pot observar, la valoració de l'esquaramida (**6**) amb difenilfosfat condueix al desplaçament químic dels nuclis **a**, **b** i **c** a més dels hidrògens dels nitrogens esquaramídics que apareixen com una sola senyal ampla. Així doncs, s'observa que els N-H es desplacen a camp baix aproximadament 0,1 ppm durant el transcurs de la valoració. Aquest desplaçament es deu a l'establiment de l'enllaç d'hidrogen entre el fosfat i aquests hidrògens tal i com s'indica en l'**Esquema 7**. Pel que fa als hidrògens **a**, **b** i **c** del fragment de cumarina, s'observa que tots tres es desplacen a camp alt com a conseqüència de la interacció amb el difenilfosfat sòdic. Això pot deure's a l'elevada proximitat dels grups fenils del fosfat emprat, amb els que s'estableix una interacció per apilament π . Alternativament, la formació d'un complex amb un anió implica un enriquiment electrònic del receptor que es tradueix en un apantallament dels hidrògens aromàtics. Els desplaçaments químics dels diferents nuclis permet l'ajust de les dades a un model teòric que consisteix en la formació del complex supramolecular amb una estequiometria 1:1. L'ajust a un model 1:1 es va realitzar amb el software HypNMR2008²⁹ que permet el càlcul de l'afinitat receptor:substrat.

²⁹ HypNMR 2008 program (Protonic Software; <http://www.hyperquad.co.uk>)

Taula 3. Constant d'associació entre l'esquaramida (**6**) i l'anió difenilfosfat

log β	$2,68 \pm 0,13$
K_i (M^{-1})	483 ± 1

El valor obtingut per a la constant d'associació és del mateix ordre que el que presenten altres esquaramides neutres descrites a la bibliografia³⁰ enfront de l'anió acetat en DMSO-d⁶.

Taula 4. Constants d'associació entre diferents esquaramides neutres i l'anió acetat en DMSO-d⁶

Receptor	K_i (M^{-1})
1	217 ± 8
2	1980 ± 40
3	1120 ± 86

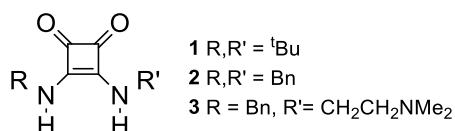


Figura 19. Esquaramides **1**, **2** i **3**. ^tBu equival a terc-butil i Bn a benzil.

³⁰ Prohens, R.; Tomàs, S.; Morey, J.; Deyà, P.M.; Ballester, P.; Costa, A.; Squaramido-based receptors: molecular recognition of carboxylate anions in highly competitive media. *Tet. Lett.* **1998**, 39, 1063-1066

4. Conclusions

El primer objectiu plantejat consistia en la preparació de derivats de l'àcid esquàric a partir de diamines antracèniques. Malgrat haver detectat per espectrometria de masses una senyal amb la massa corresponent al producte de substitució en un dels grups amina, aquest es trobava en baixa proporció en una fracció que ja s'havia separat per columna. Els motius principals que dificulten l'obtenció del bisquaramat d'etil (**2**) són la baixa solubilitat de les amines antracèniques, la seva susceptibilitat a l'oxidació, donant lloc a antraquinones menys reactives per donar la reacció d'addició-eliminació; i la capacitat per reaccionar amb altres antracens via cicloadicions [4+4] per incidència de llum ultraviolada. Com a resultat d'aquestes dificultats es va descartar continuar amb la línia de treball.

Fent referència al segon objectiu, la preparació de la cumarina FFN102 i la síntesi dels seus derivats d'àcid esquàric no ha comportat problemes més enllà dels habituals i rutinaris dins l'àmbit de la recerca en síntesi orgànica. En quant a l'estudi per avaluar l'ús com a sensor de l'esquaramida (**6**) derivada de la cumarina FFN102, aquest hauria de continuar-se en un dissolvent molt més competitiu per a la formació de complexos amb anions com és l'aigua. En cas de donar bons resultats, l'objectiu final seria el d'aprofitar el fragment fluoròfor de l'esquaramida (**6**) per poder tenir un sensor de l'anió fosfat que en permeti la seva determinació a través d'una mesura molt més ràpida com és la fluorescència.

Finalment, s'ha observat que l'addició de l'anell d'esquarat al fluoròfor provoca un efecte de "quenching" o atenuació de la fluorescència causat probablement per una transferència electrònica fotoinduída (PET), en la que l'anell esquaramídic es comporta com a donador d'electrons.

5. Part experimental

5.1. Informació general

Tots els reactius s'han adquirit comercialment i s'han utilitzant sense cap tipus de purificació prèvia. Els espectres de masses s'han enregistrat amb un espectròmetre de masses d'alta resolució (HRMS) ThermoFisher (Orbitrap, QExactive), previst d'una entrada de mostra per electrospray (ESI). Els espectres de RMN (^1H , ^{13}C) s'han enregistrat en un instrument Bruker AVANCE-300 en DMSO-*d*6 o CDCl_3 . Els desplaçaments químics (δ) estan expressats en ppm i estan referenciats a la senyal residual del dissolvent. Les síntesis assistides per microones s'han portat a terme en vials de 0,5-2 mL amb un reactor Biotage Initiator (potència aplicable de 0-400W amb increments de 1W, sensor de temperatura per IR, rang de pressions de 0-20 bar). La determinació de valors de pH s'ha realitzat mitjançant un pH-metre Mettler SevenCompactTM. Els espectres d'absorció de UV-Vis s'han enregistrat en un espectrofotòmetre Varian Cary 300Bio i els de fluorescència en un espectrofluorímetre Shimadzu RF-5301PC.

5.2. Preparació dels fluoròfors i derivats

5.2.1. Síntesi del 1,8-Diaminatracè (1)⁹

Es suspèn l'1,8-dinitroantracè-9,10-diona (466 mg, 1,56 mmol) en isopropanol (50 mL) i es purga amb Ar per desoxigenar la mescla. S'afegeix NaBH_4 (897 mg, 23,71 mmol) a la mescla i es purga de nou. La mescla s'encalenteix a refluxe en atmosfera d'argó durant 36 hores. La reacció es du a terme amb el sistema cobert amb paper d'alumini per evitar que la llum destrueixi el producte. La mescla de reacció s'aboca dins 50 mL d'aigua amb gel. S'extreu quatre vegades amb èter dietílic i s'eixuga amb salmorra i sulfat sòdic (Na_2SO_4). La presència del producte en les dues fases es pot seguir per la seva intensa fluorescència verda. Per evaporació s'obté un sòlid negre amb un 84,5% de rendiment.

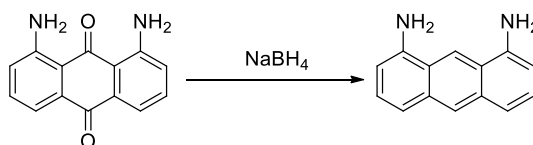


Figura 19. Obtenció del 1,8-diaminatracè (1)

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , ppm) δ 4,21 (s, 4H); 6,96 (d, 2H); 7,42 (t, 2H); 7,81 (d, 2H); 8,22 (s, 1H); 8,37 (s, 1H). **HRMS ESI(+)**, calculada per a $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_2$ $[\text{MH}]^+$ 209,1072u; experimental 209,1074u

5.2.2. Intent de síntesi del derivat bis-esquaramídic (2) del 1,8-diaminantracè

En un matràs de fons rodó s'afegeix el compost (1) (146 mg, 0,70 mmol), esquarat de dietil en excés (262 mg, 1,54 mmol) i etanol (30 mL). Es manté en agitació i cobert amb paper d'alumini per protegir de la llum fins al dia següent. El cru de reacció es dissol en la mínima quantitat d'acetat d'etil i es separa el cru a través d'una columna cromatogràfica amb una mescla Hexà:Acetat d'etil com a eluent. Es separen tres fraccions a distintes polaritats de la fase mòbil. Quan l'eluent passa a ser 100% AcOEt elueix una fracció que conté majoritàriament la diamina (1) i minoritàriament el producte de la mono entrada, però no el producte desitjat.

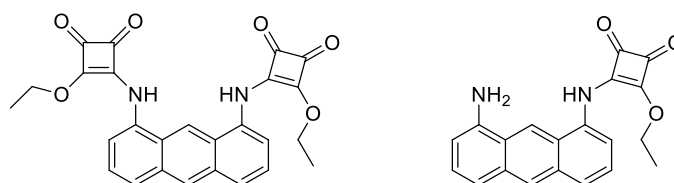
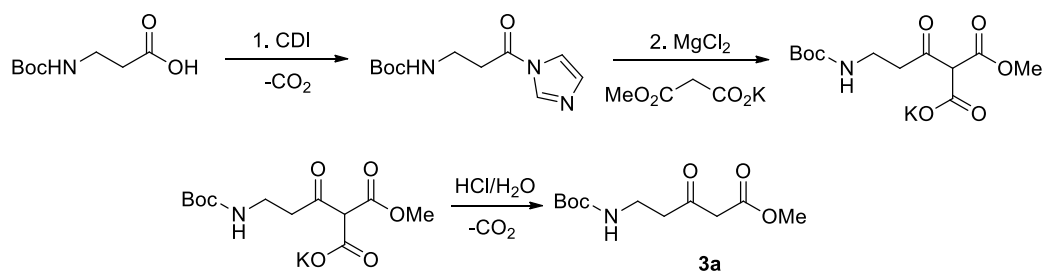


Figura 20. D'esquerra a dreta, bisesquaramat d'etil (2) i producte de la monoentrada.

5.2.3. Preparació del 5-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-oxopentanoat de metil (3a)³¹

Una dissolució de N-Boc-β-Alanina (2,370 g, 12,53 mmol) dissolta en THF anhidre (20 mL) i en atmosfera inert, s'addiciona gota a gota sobre una suspensió de 1,1-carbonildiimidazol (2,430 g, 14,99 mmol) en THF anhidre (30 mL). Es manté en agitació durant quatre hores i s'obté una dissolució de color groc pàlid. S'afegeixen clorur de magnesi (II) (1,1900 g, 12,50 mmol) i 3-metoxi-3-oxopropanoat de potassi (3,900 g, 24,97 mmol) sòlids amb una espàtula i torna a purgar-se el sistema amb argó per mantenir l'atmosfera inert. S'obté una suspensió que es deixa en agitació vigorosa i a temperatura ambient durant tota la nit.



Esquema 8. Obtenció del B-cetoèster (3a)

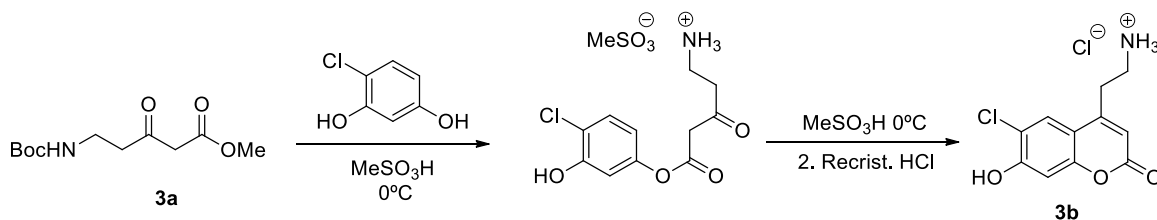
Al dia següent s'observa una suspensió blanca. L'addició d'aigua (25 mL) i àcid clorhídric 1 M (15 mL) atura la reacció d'addició i afavoreix la descarboxilació, donant lloc a una dissolució clara. El producte (3a) s'extreu en fase orgànica després de rentar tres vegades amb 100 mL

³¹ Kong, C.; Jana, N.; Jones, C.; Driver, R. G.; Control of the Chemoselectivity of Metal N-Aryl Nitrene Reactivity: C-H bond amination versus electrocyclozation. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 13271-13280. DOI: 10.1021/jacs.6b07026.

d'acetat d'etil (AcOEt). Una vegada reunits, la fase orgànica es renta una vegada amb 30 mL d'HCl 1 M per eliminar restes d'imidazole. La dissolució resultant s'eixuga amb Brine i sulfat sòdic i s'elimina el dissolvent al buit. El producte final (**3a**) és un oli groc que s'obté amb un 50,7 % de rendiment aïllat (1,736 g).

5.2.4. Preparació del clorur de 2-(6-cloro-7-hidroxi-2-oxo-2H-cumarin-4-il)etanamoni (**3b**)^{13,14}

En un matràs de fons rodó es mescla el producte (**3a**) (1,736 g, 7,07 mmol) i 4-cloro-resorcinol (1,533 g, 10,62 mmol) i s'hi afegeixen 11,5 mL d'àcid mesílic³² (176,94 mmol). La mescla es manté en agitació i en un bany de gel durant 3 hores i després s'hi afegeixen 90 mL d'éter dietílic fred, amb el que es produeix la precipitació d'un oli rosa al fons del matràs. L'oli es renta amb més éter dietílic fred, i es recristalitza amb àcid clorhídric 1 M. El producte cristal·litza com petites agulles de color rosa amb un 17,2 % de rendiment (298 mg).



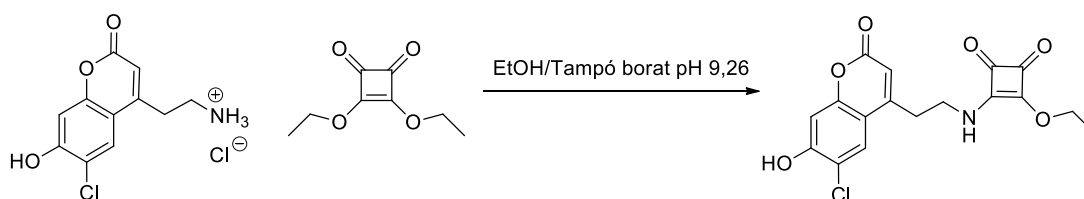
*Esquema 9. Obtenció de la cumarina (**3b**)*

¹H NMR (300 MHz, DMSO, ppm) δ 3,07 (s, 4H); 6,27 (s, 1H); 6,98 (s, 1H); 7,88 (s, 1H); 7,97 (br s, 1H); 11,53 (s, 1H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO, ppm) δ 28,8; 37,5; 103,7; 111,7; 112,6; 117,2; 125,6; 151,2; 153,4; 156,5; 159,7. HRMS ESI (+) C₁₁H₁₁ClNO₃⁺ [MH]⁺=240,0422 u; exp. 240,0415u [MH]⁺ i 262,0242 u [M + Na]⁺.

5.2.5. Síntesi de 3-((2-(6-cloro-7-hidroxy-2-oxo-2H-cumarin-4-il)etil)amino)-4-etoxiciclobut-3-è-1,2-diona (**4**)

En un matràs de fons rodó de 100 mL s'introdueix esquarat de dietil (203 mg, 1,19 mmol) dissolt en la mínima quantitat d'etanol (1,5 mL). A continuació s'afegeix gota a gota l'amina **3b** (250 mg, 0,91 mmol) que prèviament s'havia dissolt en 50 mL d'un tampó borat (pH 9,26). La mescla s'agita a temperatura ambient durant 12 h. S'evapora el dissolvent i el sòlid resultant es renta 3 vegades amb aigua freda recuperant un sòlid beix per centrifugació amb un 46,4% de rendiment (124 mg).

³² L'àcid mesílic permet alliberar l'amina eliminant el grup protector BOC.

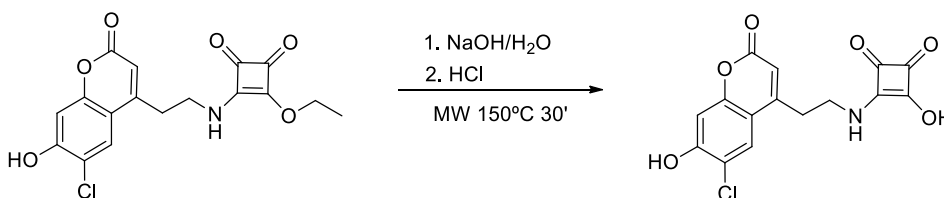


Esquema 10. Obtenció de l'esquaramat d'etil (**4**)

¹H NMR (300 MHz, DMSO, ppm) δ 1,23-1,37 (dt, $J = 6$ Hz, 3H); 3,00 (t, $J = 6$ Hz, 2H); 3,56-3,77 (dq, $J = 6$ Hz, 2H); 4,51-4,65 (dq, $J = 6$ Hz, 2H); 6,48 (s, 1H); 6,90 (s, 1H); 7,85 (s, 1H); 8,63 (t, 0,4H); 8,83 (t, 0,6H); 11,39 (br s, 1H). **¹³C NMR** (75 MHz, DMSO, ppm) δ 15,59; 32,25; 42,97; 68,98; 103,57; 110,45; 125,34; 152,74; 160,03; 172,59. **HRMS ESI(+)**, calculada per a $C_{17}H_{14}ClNO_6$ [M] = 363,0510 i $[MNa]^+$ = 386,0408; experimental 386,0402

5.2.6. Síntesi de 3-((2-(6-cloro-7-hidroxi-2-oxo-2H-cumarin-4-il)etil)amino)-4-hidroxiciclobut-3-è-1,2-diona (**5**)

En un vial de 0,5-2 mL adequat per a la síntesi assistida per microones, s'afegeix semi èster (**4**) (40 mg, 0,11 mmol), 150 μ L de NaOH 1 M i 2 mL d'aigua. La reacció es du a terme en un reactor de microones a 150°C durant 30 minuts. S'obté un precipitat groc i un sobrenedant taronja. Es centrifuga per separar-los i el sobrenedant s'acidifica amb HCl 1 M donant lloc a un precipitat groc. Aquest es renta amb aigua freda i es recupera el sòlid per centrifugació amb un rendiment del 62,3% (23 mg).



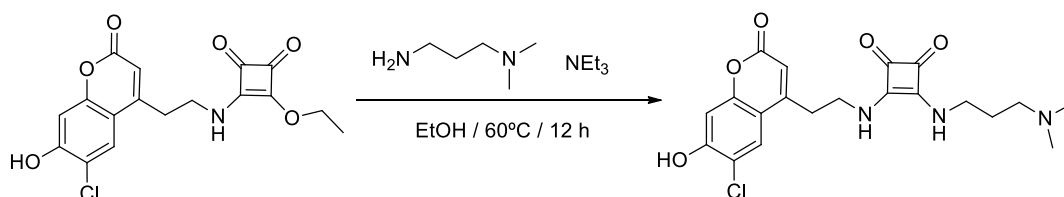
Esquema 11. Obtenció de l'àcid esquaràmic (**5**)

¹H NMR (300 MHz, DMSO, ppm) δ 3,00 (t, $J = 6,5$ Hz, 2H); 3,68-3,66 (q, $J = 6,3$ Hz, 2H); 6,18 (s, 1H); 6,90 (s, 1H); 7,88 (s, 1H); 8,41 (t, 1H); 11,38 (br s, 1H). **¹³C NMR** (75 MHz, DMSO, ppm) δ 32,58; 42,40; 68,98; 103,54; 112,01; 117,09; 125,92; 152,75; 152,37; 156,27; 159,75; 173,80; 184,80. **HRMS ESI(-)**, calculada per a $C_{15}H_9ClNO_5$ [M]⁻ 334,0124u; experimental 334,0119u

5.2.7. Síntesi del 3-((2-(6-cloro-7-hidroxi-2-oxo-2H-cumarin-4-il)etil)amino)-4-((3-(dimetilamino)propil)amino)ciclobut-3-è-1,2-diona (**6**)

En un matràs de fons rodó s'addiciona producte (**4**) (43 mg, 0,16 mmol), trietilamina (32 mg, 0,31 mmol) i N,N-dimetilpropil-1,3-diamina (19 mg, 0,19 mmol) i es dissol en etanol (50 mL). Es

deixa en agitació i a 60°C durant 12 hores. El dissolvent es evapora i el sòlid resultant es renta tres vegades amb aigua freda recuperant el sòlid per centrifugació amb un 42,3% (21 mg).



Esquema 12. Obtenció de l'esquaramida (6)

¹H NMR (300 MHz, DMSO, ppm) δ 1,92 (s, 2H); 2,88 (s, 6H); 3,07-3,10 (t, $J = 4,5$ Hz, 4H); 3,53 (s, 2H); 3,93 (s, 2H); 6,07 (s, 1H); 6,54 (s, 1H); 7,72 (s, 1H). **¹³C NMR** (75 MHz, DMSO, ppm) δ 27,01; 41,62; 47,03; 59,12; 112,01; 115,09; 148,13; 152,81; 156,27; 160,80; 182,58. **HRMS ESI(+)**, calculada per a $C_{20}H_{22}ClN_3O_5$ [MH]⁺ 420,1321 u; experimental 420,1320 u.

5.3. Caracterització per espectroscòpia UV-Vis i fluorescència dels productes 3b-6

La caracterització per UV-Vis i fluorescència es va dur a terme a diferents valors de pH. En primer lloc, es preparà per a cadascun dels productes 3b-6 una dissolució de concentració coneguda (aproximadament $1 \cdot 10^{-2}$ M) en DMSO. A continuació es prepararen els següents tampons:

- Tampó fosfat: pH 8,0/ [PBS] = 0,01 M / I = 0,15
- Tampó fosfat: pH 7,1/ [PBS] = 0,01 M / I = 0,15
- Tampó acetat: pH 6,6/ [Acetat] = 0,01 M / I = 0,15
- Tampó cacodilat: pH 6,2 / [Cacodilat] = 0,01 M / I = 0,15
- Tampó formiat: pH 3,2/ [Formiat] = 0,01 M / I = 0,15

Les dissolucions a mesurar foren les mateixes pels estudis d'ultraviolat i de fluorescència i es prepararen afegint 1 µL de la dissolució mare en DMSO del producte corresponent, 2 µL de DMSO i 3 mL del tampó de pH corresponent. Els espectres UV-Visible s'enregistraren entre 250 nm i 450 nm. Els espectres d'excitació es van obtenir excitant la mostra entre 250 nm i 450 nm i captant la radiació emesa a 456 nm (λ_{EM} màxima). Finalment, els espectres d'emissió s'obtingueren excitant la mostra a 375 nm (λ_{EX} màxima) i captant la radiació emesa entre 400 nm i 600 nm. A continuació es presenta una taula amb les concentracions de les dissolucions emprades en la caracterització espectroscòpica dels productes.

Taula 5. Concentracions de les dissolucions mare i de les dissolucions mesurades a distints valors de pH (f)

	Concentració _{mare} (M)	Concentració _f (M)
Amina (3b)	$1,2 \cdot 10^{-2}$	$4,0 \cdot 10^{-6}$
Semi èster (4)	$7,6 \cdot 10^{-3}$	$2,5 \cdot 10^{-6}$
Àcid esquaràmic (5)	$9,6 \cdot 10^{-3}$	$3,2 \cdot 10^{-6}$
Esquaramida (6)	$1,0 \cdot 10^{-2}$	$3,4 \cdot 10^{-6}$

Els espectres d'ultraviolat-visible s'han obtingut representant el coeficient d'absortivitat molar entre 10000 ($M^{-1}cm^{-1}$) enfront de la longitud d'ona (nm) aprofitant la relació d'aquest primer amb l'absorbància.

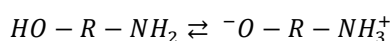
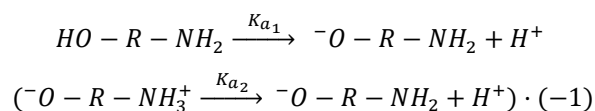
$$Abs = \varepsilon \cdot [C] \cdot b \rightarrow \varepsilon = \frac{Abs}{[C] \cdot b}$$

Com s'ha comentat anteriorment, les mateixes dissolucions s'han emprat per a obtenir els espectres de fluorescència d'excitació i emissió dels productes **(3b)**-**(6)** sintetitzats.

5.4. Valoracions espectrofotomètriques

Els valors de pK_a de l'esquaramida **(6)** s'han determinat mitjançant el registre dels espectres d'absorció UV-Visible en el rang de 220 a 500 nm en funció del pH. En primer lloc, es mesurà el pH d'una dissolució aquosa $5 \cdot 10^{-5}$ M de **(6)** i 0,01 M de NaCl i s'enregistrà el seu espectre UV-Visible. A continuació, es feren addicions conegudes d'una dissolució de NaOH 0,023 M estandarditzada a fi d'augmentar el pH en intervals de 0,10 ($\Delta pH = 0,10$) i s'enregistraren els espectres en cada cas. Els resultats s'analitzaren mitjançant el software HypSpec2014²⁷.

A partir dels valors de pK_a obtinguts es va poder calcular la proporció de l'espècie LH que es troba en forma zwitteriònica seguint el raonament següent.



$$K_n = \frac{[{}^-O - R - NH_3^+]}{[HO - R - NH_2]} = \frac{[H^+][{}^-O - R - NH_2]}{[HO - R - NH_2]} \cdot \frac{[{}^-O - R - NH_3^+]}{[H^+][{}^-O - R - NH_2]} = \frac{K_{a1}}{K_{a2}} = 596$$

$$\%[{}^-O - R - NH_3^+] = \frac{596}{596 + 1} = 99,8\%$$

5.5. Valoracions per RMN

Es prepararen 2 mL d'una mostra de producte (**6**) de concentració coneguda (aproximadament $1,0 \cdot 10^{-3}$ M) en DMSO- d_6 . A continuació se'n retiraren 500 μ L i se n'enregistrà l'espectre de ^1H -RMN. Es pesà amb precisió una mostra de difenilfosfat i es dissolguè en els 1,5 mL restants de dissolució de receptor (aproximadament $8 \cdot 10^{-3}$ M en difenilfosfat). D'aquesta dissolució s'addicionaren alíquotes al tub de RMN que contenia la dissolució inicial de receptor, homogeneïtzant en cada cas el contingut del tub i enregistrant els espectres ^1H -RMN corresponents a cada addició. D'aquesta manera fou possible dur a terme una valoració amb concentració constant de receptor. Els desplaçaments químics de les senyals s'analitzaren amb el software HypNMR2008²⁹. A continuació es presenten les concentracions de difenilfosfat a cada punt i els corresponents desplaçaments químics observats per a una concentració de l'esquaramida (**6**) de $9,5 \cdot 10^{-4}$ M.

Taula 6. Concentracions afegides de difenilfosfat (DPP) i els corresponents desplaçaments químics registrats (ppm)

Punt	[DPP] (M)	Ar-H₁ (ppm)	Ar-H₂ (ppm)	Ar-H₃ (ppm)	N-H (ppm)
1	0	7,8797	6,8195	6,1412	7,4174
2	$8,3 \cdot 10^{-5}$	7,8989	6,8195	6,1407	7,401
3	$1,6 \cdot 10^{-4}$	7,8784	6,8191	6,1398	7,4035
4	$3,2 \cdot 10^{-4}$	7,8764	6,8176	6,1373	7,4137
5	$4,8 \cdot 10^{-4}$	7,8755	6,8168	6,1362	7,4133
6	$6,2 \cdot 10^{-4}$	7,8744	6,8162	6,1347	7,4493
7	$9,0 \cdot 10^{-4}$	7,8728	6,8147	6,1322	7,4582
8	$1,2 \cdot 10^{-3}$	7,8709	6,8135	6,1300	7,4439
9	$1,4 \cdot 10^{-3}$	7,8700	6,8115	6,1281	7,4399
10	$1,9 \cdot 10^{-3}$	7,8674	6,8100	6,1250	7,4636
11	$2,4 \cdot 10^{-3}$	7,8662	6,8085	6,1227	7,4905
12	$2,8 \cdot 10^{-3}$	7,8645	6,8073	6,1203	7,4864
13	$3,5 \cdot 10^{-3}$	7,8621	6,8052	6,1172	7,4909
14	$4,0 \cdot 10^{-3}$	7,8612	6,8040	6,1157	7,4926
15	$4,4 \cdot 10^{-3}$	7,8594	6,8021	6,1134	7,5177
16	$4,9 \cdot 10^{-3}$	7,8597	6,8024	6,1136	7,5109