



Universitat
de les Illes Balears

Síntesis de derivados de la cumarina FFN102 y posterior evaluación como biomarcadores

Bartomeu Galmés Sureda

Memoria del Trabajo de Fin de Máster

Máster Universitario en Ciencia y Tecnología Química

(Especialidad/Itinerario Química Orgánica)

de la

UNIVERSITAT DE LES ILLES BALEARS

Curso Académico 2018-2019

Fecha: 06/09/2019

Nombre Tutor del Trabajo: Antonio Costa Torres

Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría agradecer a todo el grupo de Química Supramolecular de la UIB el apoyo y ayuda prestados en todo momento, en especial a mi tutor, Antonio Costa, y a los profesores Carmen Rotger y Bartolomé Soberats por las ideas y consejos que tanto han ayudado.

No menos importante, quiero dar las gracias a mis compañeros del grupo de Química Supramolecular. En especial quiero dar las gracias a Marta, quien ha sido mi mentora desde que llegué al laboratorio en mi primera colaboración y a Xisca, que aunque nunca haya llegado puntual a la hora de comer, siempre ha estado dispuesta a ayudar y discutir mis dudas sobre los compuestos C2 y compañía. Además, quiero extender mi agradecimiento a Edu, Sergi, Manel, Llorenç, Carlos, Jeroni, Neus, Paulino, Alberto y a los teóricos Pere Deyà, Toni Frontera, David Quiñonero, Toni Bauzá y Antonio Franconetti. Sin duda, habéis sido fundamentales en todo lo que haya podido aprender este curso.

Por otra parte me gustaría agradecer el apoyo brindado por Biel y Rosa de los servicios científicotécnicos por tratar como suyo cualquier problema que les pudiera presentar.

Como no podría ser de otra manera, agradecer a Meri y a Dani todas las charlas antes de clase y los partidos de pádel para evadirnos después de los seminarios de Síntesis y Catálisis Asimétrica.

Agradecer a nivel personal el apoyo recibido por parte de mi familia, especialmente por parte de mis padres al respetar y apoyar todas mis decisiones.

Finalmente quiero dar las gracias a quien más las merece. Gracias a Cristina por todo el apoyo brindado y por conseguir mi evasión ante cualquier problema o situación. Simplemente, gracias por todo.

¡Estoy seguro de que, sin vosotros, todo hubiera sido mucho más LAMENTABLE!



**Govern
de les Illes Balears**



Unión Europea
Fondo Social Europeo
El FSE invierte en tu futuro



Lista de abreviaturas

AcOEt: Acetato de etilo

AcOH: Ácido acético.

AcONa: Acetato sódico.

ADN: Ácido desoxiribonucleico.

ATP: Trifosfato de adenosina.

CDCl₃: Cloroformo deuterado.

CDI: 1,1'-carbonildiimidazol.

CPPs (*cell penetrating peptides*): Péptidos que presentan elevada tasa de internalización celular.

DMF: Dimetilformamida.

DMSO: Dimetilsulfóxido.

DMSO-*d*⁶: Dimetilsulfóxido deuterado.

EtOH: Etanol.

FFN (*Fluorescent false neurotransmitter*): Sondas fluorescentes que permiten el estudio del proceso de la neurotransmisión .

g: Gramo.

HEK293: Células embrionarias de riñón humano.

HOMO (*High Occuped Molecular Orbital*): orbital molecular ocupado de energía más alta.

HPLC (*High performance liquid chromatography*): Cromatografía líquida de alta presión.

HRMS-ESI (*High Resolution Mass Spectrometry – Electrospray Ionization*): Espectrometría de masas de alta resolución- ionización por electrospray.

I: Fuerza iónica.

L: Litro.

LUMO (*Low Unoccupied Molecular Orbital*): orbital molecular desocupado de energía más baja.

M: Molar (mol/L)

mg: Miligramo.

MHz: Megahercio.

mL: mililitro.

MW (*microwave*): Microondas.

NADH (*Nicotinamide adenine dinucleotide*): Dinucleótido de adenina y nicotinamida.

NMP: N-metilpirrolidona

PBS (*Phosphate-buffered saline*): Tampón fosfato salino.

PET (*Photoinduced Electron Transfer*): Transferencia electrónica fotoinducida

RMN: Resonancia magnética nuclear.

¹H-RMN: Resonancia magnética nuclear de protón.

¹³C-RMN: Resonancia magnética nuclear de carbono 13.

tBuOH: terbutanol

TFA/TFA⁻ (*Trifluoroacetic acid/ Trifluoroacetate*): Ácido trifluoroacético/Trifluoroacetato.

UV: Ultravioleta

VMAT (*Vesicular Monoamine Transporter*): Transportador vesicular de monoaminas.

λ /WL (*Wavelength*): Longitud de onda

°C: grado centígrado

δ : Desplazamiento químico.

ϕ : Rendimiento cuántico.

Resumen

Las sondas fluorescentes han permitido desde su descubrimiento, el estudio de las estructuras funcionales de las células, así como de algunos de los procesos que tienen lugar en el interior de éstas. Así pues, los avances en este campo han permitido desde el marcaje de los distintos orgánulos celulares hasta la visualización de procesos a nivel celular como la sinapsis. En el presente trabajo se lleva a cabo la síntesis y la caracterización de un conjunto de moléculas fluorescentes derivadas de la cumarina FFN102 con el fin de evaluar su posible aplicación como sondas fluorescentes.

Índice

1. Introducción.....	9
1.1. La química de los derivados del ácido escuárico.....	9
1.2. El papel de las escuaramidas en la química biológica.....	12
1.3. Sondas moleculares fluorescentes.....	16
1.3.1. Fluoróforos intrínsecos.....	16
1.3.2. Fluoróforos extrínsecos.....	17
2. Objetivos.....	21
3. Resultados y discusión.....	22
3.1. Síntesis de la cumarina FFN102 y los derivados escuaramida lineales.....	22
3.2. Síntesis del derivado cicloescuaramídico de la cumarina FFN102.....	23
3.3. Síntesis de un nuevo candidato FFN.....	29
3.4. Caracterización por espectroscopia de fluorescencia.....	32
3.5. Evaluación de la capacidad de los compuestos sintetizados para actuar como marcadores fluorescentes.....	37
4. Conclusiones.....	41
5. Parte experimental.....	42
5.1. Información general.....	42
5.2. Preparación de los fluoróforos y derivados.....	42
5.2.1. Preparación del 5-((<i>tert</i> -butoxicarbonil)amino)-3-oxopentanoato de metilo (1a) 42	
5.2.2. Preparación del cloruro de 2-(6-cloro-7-hidroxi-2-oxo-2H-cumarin-4-ilo)etanamonio (1b).....	43
5.2.3. Síntesis de 3-((2-(6-cloro-7-hidroxi-2-oxo-2H-cumarin-4-ilo)etil)amino)-4-etoxiciclobut-3-en-1,2-diona (2).....	44
5.2.4. Síntesis de 3-((2-(6-cloro-7-hidroxi-2-oxo-2H-cumarin-4-il)etil)amino)-4-hidroxiciclobuten-3-en-1,2-diona (3).....	44
5.2.5. Síntesis del 3-((2-(6-cloro-7-hidroxi-2-oxo-2H-cumarin-4-il)etil)amino)-4-((3-(dimetilamino)propil)amino)ciclobut-3-en-1,2-diona (5).....	45
5.2.6. Síntesis de 3-((2-(6-cloro-7-hidroxi-2-oxo-2H-cumarin-4-il)etil)amino)-4-(hexadecilamino)ciclobut-3-en-1,2-diona (4).....	45
5.2.7. Preparación de di- <i>tert</i> -butil(azadiilobis(propano-3-1-diil)dicarbamato (7)).....	46
5.2.8. Preparación de di- <i>tert</i> -butil-(((2-cianoetil)azanodiil)bis(propano-3-1-diil)dicarbamato (8)).....	47
5.2.9. Preparación de di- <i>tert</i> -butil(((3-aminopropil)azanodiil)bis(propano-3-1-diilo)dicarbamato (9)).....	47
5.2.10. Preparación de 4,4'-(((metilazanodiil)bis(propano-3,1-diil)bis(azanodiil)) bis-3-etoxiciclobut-3-en-1,2-diona (13)).....	48

5.2.11. Síntesis de di-tert-butil-(((3-((2-((2-(6-cloro-7-hidroxi-2-oxo-2H-cumarin-4-il)etil)amino)-3,4-dioxociclobut-1-ene-1-il)amino) propilazanodiil)bis(propa no-3,1-diil)dicarbamato (14)).....	49
5.2.12. Síntesis de 3-((3-(bis(3-aminopropil)amino)propil)amino-4-((2-(6-cloro-7-hidroxi-2-oxo-2H-cumarin-4-il)etil)amino)ciclobut-3-en-1,2-diona. (15)).....	49
5.2.13. Preparación de tert-butil(3-aminopropil)carbamato (10).....	50
5.2.14. Preparación de tert-butil(3-(bis(2-cianoetil)amino)propil)carbamato (11)).....	51
5.2.15. Preparación de tert-butil(3-(bis(3-aminopropil)amino)propil)carbamato (12))...	51
5.2.16. Síntesis de tert-butyl(3-(19-metil-12,13,25,26-tetraoxo-2,6,10,15,19,23-hexaazatriciclo[22.2.0.0 ^{11,14}]hexacosa-1(24),11(14)-dien-6-il)propil)carbamato (17)).....	52
5.2.17. Síntesis de 6-(3-aminopropil)-19-metil-2,6-10,15,19,23-hexaazatriciclo[22.2.0.0 ^{11,14}]hexacosa-1(24),11(14)-dieno-12,13,25,26-tetraona (18)).....	53
5.2.18. Síntesis de 6-(3-((2-((2-(6-cloro-7-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-4-il)etil)amino)-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)amino)propil)-19-metil-2,6,15,19,23-hexaazatriciclo[22.2.0.0 ^{11,14}]hexacosa-1(24), 11(14)-dieno-12,13,25,26-tetraona (16))..	53
5.2.19. Síntesis de 6-cloro-4-(clorometil)-7-hidroxi-2H-cromen-2-ona (19)).....	54
5.2.20. Síntesis de la mezcla de 9-cloro-8-hidroxi-5-oxo-2,3,4,5-tetrahidro-1H-cromeno[3,4-c]piridin-3-íó 2,2,2-trifluoroacetato y 9-cloro-8-hidroxi-3-metil-5-oxo-2,3,4,5-tetrahidro-1H-cromeno[3,4-c]piridin-3-íó 2,2,2-trifluoroacetato (20a y 20b)).....	55
5.2.21. Síntesis de 9-cloro-8-hidroxi-3-metil-5-oxo-2,3,4,5-tetrahidro-1H-cromeno [3,4-c]piridin-3-íó 2,2,2-trifluoroacetato (20b)).....	55
5.3. Caracterización por espectroscopia de fluorescencia de los productos 1b , 2 , 3 , 5 , 16 , 19 , 20b	56
5.3.1. Obtención de los espectros de excitación y emisión a distintos valores de pH ...	56
5.3.2. Obtención de los rendimientos cuánticos (ϕ)	57
6. Anexos.....	I
6.1. Espectros de ¹ H-RMN y ¹³ C-RMN de los compuestos más destacados.....	I
6.2. Espectros de excitación y emisión a diferentes valores de pH	XI
6.3. Espectros registrados para la obtención de los rendimientos cuánticos.....	XIV

1. Introducción

1.1. La química de los derivados del ácido escuárico

El ácido escuárico¹ está constituido por un anillo de ciclobuteno con dos grupos carbonilo contiguos y dos grupos hidroxilo en los carbonos restantes con hidrógenos fuertemente ácidos (pK_a 0,54 y 3,48) debido al aumento de la aromaticidad del anión resultante de la desprotonación y a la estabilización por resonancia de la base conjugada. Con el término escurarato se hace referencia al anión y/o al dianión que resulta de la ionización de uno o de ambos hidrógenos del ácido. La sustitución de uno de los hidroxilos por un alcohol da lugar a los ésteres del ácido escuárico, mientras que la sustitución de uno de los hidroxilos por una amina proporciona compuestos conocidos como ácidos amidoescuáricos o escurarámicos. Finalmente, la sustitución de ambos hidroxilos por dos aminas brinda como resultado una familia de compuestos conocidos como diescuramidas o simplemente escuramidas.

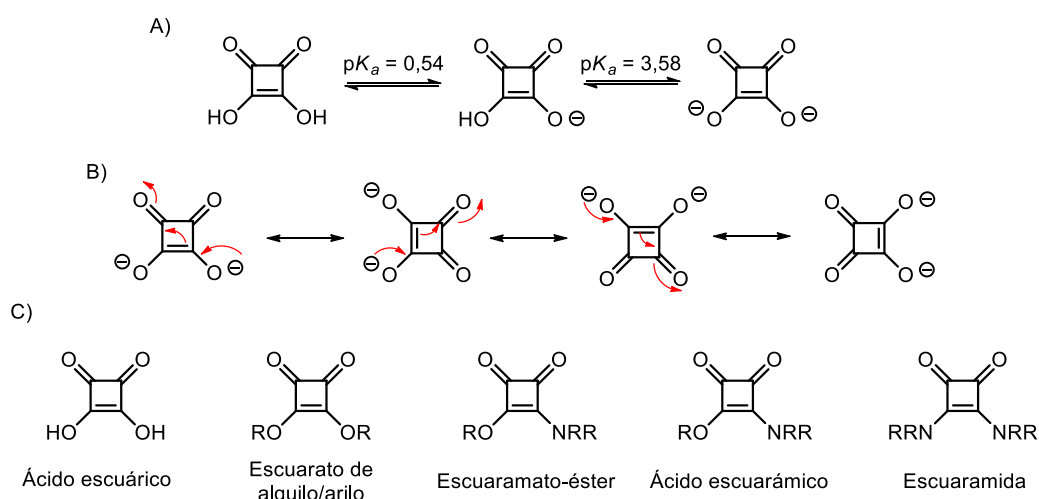


Figura 1. A) Equilibrios ácido-base del ácido escuárico. B) Deslocalización electrónica de la carga negativa en el dianión escurarato. C) Ácido escuárico y sus derivados.

Los derivados del ácido escuárico encuentran aplicación en diversos campos de la química, aunque son las escuramidas las que han experimentado un mayor desarrollo y las que presentan mayor número de aplicaciones². La aplicabilidad y la versatilidad de las escuramidas está relacionada con su enorme potencial para establecer enlaces de hidrógeno - actuando como aceptor, dador o ambas funciones- con una elevada afinidad que puede

¹Nomenclatura IUPAC: 3,4-dihidroxi-3-ciclobuten-1,2-diona

² a) Ian Storer, R.; Aciro, C.; H. Jones, L.; Squaramides: physical properties, synthesis and applications. *Chem. Soc. Rev.*, **2011**, *40*, 2330-2346. b) Marchetti, L. A.; Kumawat, L. K.; Mao, N.; Stephens, J. C.; Elmes, R. B. P.; The Versatility of Squaramides: From Supramolecular Chemistry to Chemical Biology. *Chem.*, **2019**, *5*, 1-88.

explicarse por el aumento de la aromaticidad del ciclo de ciclobutendiona con el establecimiento de los enlaces de hidrógeno.

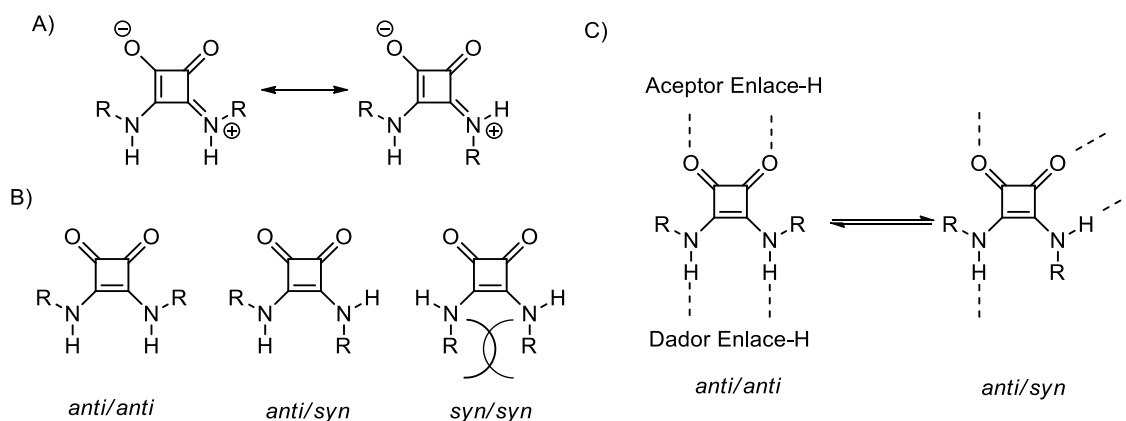


Figura 2. A) Conjugación del par electrónico del nitrógeno con el ciclo de ciclobutendiona. B) Confórmeros de las escuaramidas. C) Capacidad de establecer enlaces de hidrógeno de los tipos de confórmeros descritos en la bibliografía.

A pesar de las evidentes similitudes entre las amidas y las escuaramidas, una de las diferencias más significativas es la rigidez y planaridad de éstas últimas, estabilizada por la conjugación de los pares electrónicos del nitrógeno en el interior del ciclo de ciclobutendiona, conduciendo a que éstos mantengan una hibridación esencialmente sp^2 . Esta situación impide la libre rotación del enlace C-N y, para el caso de las escuaramidas secundarias, da lugar a la existencia de un equilibrio entre los diferentes confórmeros *anti/anti* y *anti/syn* (el *syn/syn* no se ha observado como consecuencia de la repulsión estérica entre los grupos R^3).

Otro factor crucial para entender la versatilidad y aplicabilidad de las escuaramidas es la relativa facilidad sintética que permite acceder a esta familia de compuestos. En este sentido, las escuaramidas suelen prepararse a partir de ésteres de alquilo del ácido escuárico, y el hecho de que la primera sustitución conduzca a un intermedio menos reactivo permite el aislamiento del escuaramato intermedio y la posterior preparación de escuaramidas asimétricamente sustituidas tanto alquílicas como arílicas⁴. A pesar de ello, también existen metodologías que tratan de optimizar tiempo y recursos y adecuan las condiciones para obtener escuaramidas asimétricas “one-pot”⁵.

³ 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.

⁴ Rostami, A.; Colin, A.; Yu Li, X.; Chudzinski, M. G.; Lough, A. J.; Taylor, M. S.; N,N'-Diarilsquaramides: General High-Yielding Synthesis and Applications in Colorimetric Anion Sensing, *J. Org. Chem.*, **2010**, *75*, 3983-3992

⁵ Alegre-Requena, J. V.; Marqués-López, E.; Herrera, R. P.; One-pot synthesis of unsymmetrical squaramides, *RSC Adv.*, **2015**, *5*, 33450-33462.

Así pues, debido a la accesibilidad de estos compuestos y a las múltiples interacciones intermoleculares que son susceptibles a establecer resulta entendible que hayan encontrado aplicación en campos tan diversos como la organocatálisis⁶, la ciencia de materiales⁷, la química médica⁸ o la química biológica⁹; donde gozan de múltiples ejemplos en cada uno de los casos.

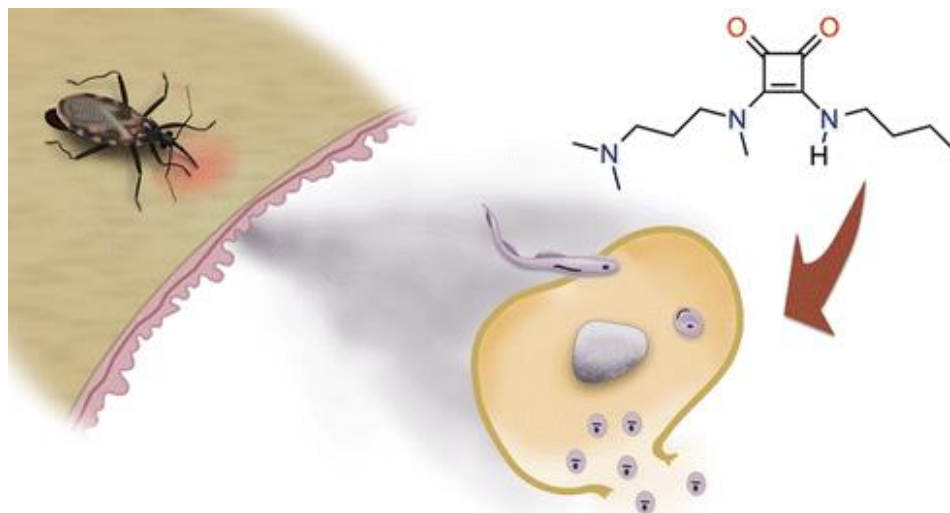


Figura 3. Representación de la actividad antiparasitaria de la escuaramida mostrada. Figura tomada de la referencia 8a.

⁶ a) Bae, H. Y.; Kim, M. J.; Sim, J. H.; Song, C. E.; Direct Catalytic Asymmetric Mannich Reaction with Dithiomalonates as Excellent Mannich Donors: Organocatalytic Synthesis of (*R*)-Sitagliptin, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 10825-10829. b) Li, B. Y.; Du, D. M.; Chiral Squaramide-Catalyzed Asymmetric Mannich Reactions for Synthesis of Fluorinated 3,3'-Bisoxindoles, *Adv. Synth. Catal.* **2018**, *360*, 3164-3170.

⁷ a) Sanna, E.; Escudero-Adán, E. C.; Bauzá, A.; Ballester, P.; Frontera, A.; Rotger, C.; Costa, A.; A crystalline sponge based on dispersive forces suitable for X-ray structure determination of included molecular guests, *Chem. Sci.*, **2015**, *6*, 5466-5472. b) López, C.; Ximenis, M., Orvay, F.; Rotger, C., Costa, A.; Supramolecular hydrogels based on minimalist amphiphilic squaramide-squaramates for controlled release of zwitterionic biomolecules, *Chem. Eur. J.* **2017**, *23*, 7590-7594. c) Saez Talens, V; Makurat, D. M. M.; Liu, T.; Dai, W.; Guibert, C.; Noteborn, W. E. M.; Voets, I. K.; Kieltyka, R. E.; Shape modulation of squaramide-based supramolecular polymer nanoparticles, *Polym. Chem.* **2019**, *10*, 3146-3153.

⁸ a) Olmo, F.; Rotger, C.; Ramírez-Macías, I.; Martínez, L.; Marín, C.; Carreras, L.; Urbanova, K.; Vega, M.; Chaves-Lemaury, 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. b) Tantry, S. J.; Markad, S. D.; Shinde, V.; Bhat, J.; Balakrishnan, G.; Gupta, A. K.; Ambady, A.; Raichurkar, A.; Kedari, C.; Sharma, S.; Mudugal, N. V.; Narayan, A.; Kumar, C. N. N.; Nanduri, R.; Bharath, S.; Reddy, J.; Panduga, V.; Prabhakar, K. R.; Kandaswamy, K.; Saralaya, R.; Kaur, P.; Dinesh, N.; Guptha, S.; Rich, K.; Murray, D.; Plant, H.; Preston, M.; Ashton, H.; Plant, D.; Walsh, J.; Alcock, P.; Naylor, K.; Collier, M.; Whiteaker, J.; McLaughlin, R. E.; Mallya, M.; Panda, M.; Rudrapatna, S.; Ramachandran, V. Shandil, R.; Sambandamurthy, V. K.; Mdluli, K.; Cooper, C. B.; Rubin, H.; Yano, T.; Iyer, P.; Narayanan, S.; Kavanagh, S.; Mukherjee, K.; Balasubramanian, V.; Hosagrahara, V. P.; Solapure, S.; Ravishankar, S.; Hammed P, S.; Discovery of Imidazol [1,2-*a*]pyridine Ethers and Squaramides as Selective and Potent Inhibitors of Mycobacterial Adenosine Triphosphate (ATP) Synthesis, *J. Med. Chem.*, **2017**, *60*, 1379-1399.

⁹ Zhang, S.; Wang, Y.; Xie, W.; Howe, E. N. W.; Busschaert, N.; Sauvat, A.; Leduc, M.; Gomes-da-Silva, L. C.; Chen, G.; Martins, I.; Deng, X.; Maiuri, L.; Kepp, O.; Soussi, T.; Gale, P. A.; Zamzami, N.; Kroemer, G.; Squaramide-based synthetic chloride transporters activate TFEB but block autophagic flux, *Cell Death and Disease*, **2019**, *10*.

1.2. El papel de las escuaramidas en la química biológica

El transporte de especies químicas a través de membranas biológicas se fundamenta en un reconocimiento molecular minucioso sobre el que se sustenta toda forma de vida. En general, muchas biomoléculas y especies cargadas, especialmente de tipo aniónico, no son capaces de atravesar por sí solas las membranas celulares mediante transporte pasivo. Por ello, los organismos vivos disponen de todo un arsenal de proteínas transportadoras y mecanismos enzimáticos que regulan la homeostasis celular mediante transporte activo.

En el seno de un sistema perfectamente orquestado como lo es el control del transporte de moléculas en el interior del organismo, la facilidad que presente una molécula bioactiva extrínseca para atravesar las membranas resulta crucial para que ésta pueda desarrollar su actividad en el interior de la célula. En otras palabras, la capacidad de penetración de las membranas determina por completo la efectividad de una molécula bioactiva. Así pues, cuando una molécula bioactiva no es capaz por sí sola de atravesar las membranas celulares, es frecuente la utilización de transportadores capaces de penetrar de forma efectiva la membrana celular a través del establecimiento de enlaces de hidrógeno, interacciones electrostáticas e hidrofóbicas entre el compuesto bioactivo y la superficie de la membrana celular o alguno de sus receptores. En este sentido, la naturaleza tiene a su disposición un conjunto de péptidos capaces de atravesar la membrana, conocidos como “cell-penetrating peptides” (CPPs) cuya eficacia se atribuye a la presencia de un gran número de aminoácidos básicos -mayoritariamente argininas- en su estructura primaria. La internalización de los CPPs está promovida por la interacción de los grupos guanidinio con compuestos aniónicos situados sobre la superficie de la membrana celular, lo que muestra que la combinación de la capacidad de formar enlaces de hidrógeno y las interacciones electrostáticas proporcionan una herramienta potencial para el diseño de sistemas de reconocimiento específico que faciliten la internalización celular¹⁰. Esta capacidad de penetrar la membrana celular ha colocado a los CPPs en la vanguardia de la investigación científica, puesto que además de permitir el estudio del proceso de internalización celular han permitido utilizar su capacidad de penetrar las membranas celulares para el transporte en el interior de moléculas bioactivas como agentes antitumorales¹¹ o fragmentos de

¹⁰ Rothbard, J. B.; Jessop, T. C.; Lewis, R. S.; Murray, B. A.; Wender, P. A.; Role of membrane potential and hydrogen bonding in the mechanism of translocation of guanidinium-rich peptides into cells, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 9506-9507.

¹¹ Rhodes, C. A.; Dougherty, G.; Cooper, J. K.; Qian, Z.; Lindert, S.; Wang, Q.; Pei, D.; Cell-Permeable Bicyclic Peptidyl Inhibitors against NEMO-IκB Kinase Interaction Directly from a Combinatorial Library, *J. Am. Chem. Soc.*, **2018**, *140*, 12102-12110.

ácidos nucleicos¹². A pesar de su facilidad para atravesar la membrana celular, su naturaleza peptídica les convierte en dianas para las proteasas, por lo que la mayor resistencia de los macrociclos a la degradación por parte de éstas explica que los CPPs macrocíclicos sean los más utilizados en el campo de la química médica y biológica.¹³

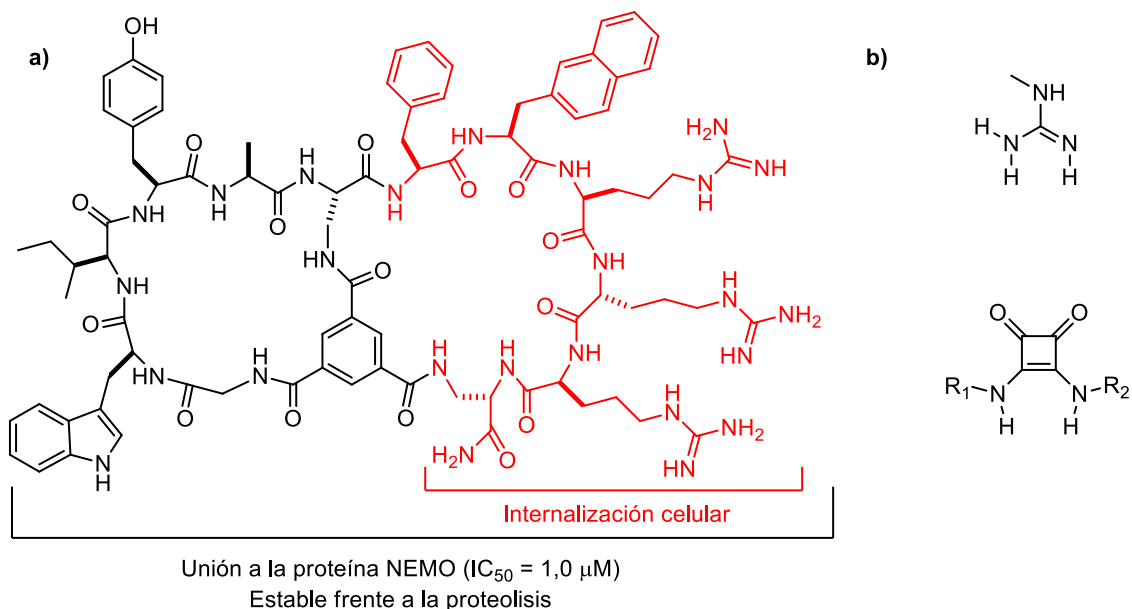


Figura 4. a) CPP con actividad antitumoral. Figura tomada y modificada de la referencia 11. **b)** Representación de un grupo guanidinio y una unidad escuaramida.

Las escuaramidas son unidades de reconocimiento molecular excelentes debido a su elevado potencial para establecer enlaces de hidrógeno cooperativos y, en menor grado, interacciones de apilamiento o “stacking” e interacciones dipolares. Su elevado potencial como dador y aceptor de enlace de hidrógeno junto con su carácter isostérico con respecto a los grupos guanidinio (**Figura 4b**) sugiere que los compuestos basados en escuaramidas podrían internalizarse en el interior de las células imitando la capacidad que tienen los CPPs para penetrar en sus membranas. Así pues, en un trabajo previo del grupo de investigación se ha demostrado mediante una sonda fluorescente basada en escuaramidas, que la internalización celular está promovida mediante la unión a receptores de la membrana celular que inducen la endocitosis de la sonda molecular fluorescente. Además, la sonda fluorescente C2-BDP

¹² Wolfe, J. M.; Faden, C. M.; Holden, R. L.; Yao, M.; Hanson, G. J.; Pentelute, B. L.; Perfluoroaryl Bicyclic Cell-Penetrating Peptides for Delivery of Antisense Oligonucleotides, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2018**, *57*, 4756-4759.

¹³ a) Vinogradov, A. A.; Yin, Y.; Suga, H.; Macrocylic Peptides as Drug Candidates: Recent Progress and Remaining Challenges, *J. Am. Chem. Soc.*, **2019**, *141*, 4167-4181. b) Dougherty, P. G.; Sahni, A.; Pei, D.; Understanding Cell Penetration of Cyclic Peptides, *Chem. Rev.*, **2019** (DOI: 10.1021/acs.chemrev.9b00008).

permanece retenida en los endosomas tardíos, permitiendo su rápida y selectiva visualización en varias líneas celulares distintas¹⁴.

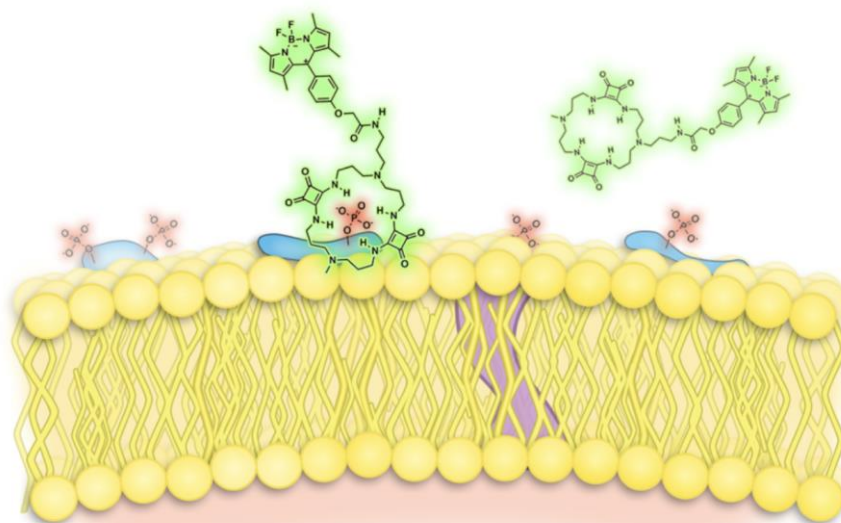


Figura 5. Modelo de interacción de la cicloescuaramida C2-BDP y un receptor de membrana. Figura tomada de la referencia 14

Al igual que sucede con los CPPs, la capacidad de las escuaramidas de penetrar las membranas celulares ha sido aprovechada para el diseño de compuestos bioactivos con actividad antiparasitaria¹⁵, antibiótica¹⁶ o antitumoral¹⁷. En el campo de la química biológica deben destacarse las contribuciones de Gale y colaboradores en la aplicación de las escuaramidas en el transporte de aniones a través de membranas. Esta aplicación surge de la sinergia entre la capacidad de las escuaramidas secundarias para el reconocimiento aniónico¹⁸ y la facilidad que éstas presentan para atravesar las membranas biológicas. El transporte de aniones a través de membranas supone a largo plazo una posible solución a todo un rango de enfermedades conocidas como canelopatías, relacionadas con un malfuncionamiento de los canales iónicos y

¹⁴ Sampedro, A.; Villalonga-Planells, R.; Vega, M.; Ramis, G.; Fernández de Mattos, S.; Villalonga, P.; Costa, A.; Rotger, C.; Cell Uptake and Localization Studies of Squaramide Based Fluorescent Probes, *Bioconjugate Chem*, **2014**, *25*, 1537-1546.

¹⁵ a) Kumar, S. P.; Glória, P. M. C.; Gonçalves, L. M.; Gut, J.; Rosenthal, P. J.; Moreira, R.; Santos, M. M. M.; Squaric acid: a valuable scaffold for developing antimalarials, *MedChemComm*, **2012**, *3*, 489-493. b) Ver referencia 8a.

¹⁶ Buurman, E. T.; Foulk, M. A.; Gao, N.; Laganas, V. A.; McKinney, D. C.; Moustakas, D. T.; Rose, J. A.; Shapiro, A. B.; Fleming, P. R.; Novel rapidly diversifiable antimicrobial RNA polymerase switch region inhibitors with confirmed mode of action in *Haemophilus influenza*, *J. Bacteriol.*, **2012**, *194*, 5504.

¹⁷ Fernández-Moreira, V.; Alegre-Requena, J. V.; Herrera, R. P.; Marzo, I.; Gimeno, M. C.; Synthesis of luminiscent squaramide monoesters: cytotoxicity and cell imaging studies in HeLa cells, *RSC Adv.*, **2016**, *6*, 14171-14178

¹⁸ a) Qin, L.; Hartley, A.; Turner, P.; Elmes, R. B. P.; Jolliffe, K. A.; Macrocyclic squaramides: anion receptors with high sulfate binding affinity and selectivity in aqueous media, *Chem. Sci.*, **2016**, *7*, 4563.

de entre las que destaca la fibrosis quística¹⁹. En este sentido, Gale y colaboradores no solo presentan la capacidad de las escuaramidas de actuar como transportadores sino que, además, demuestran que éstas son más potentes que las análogas tioureas y ureas²⁰.

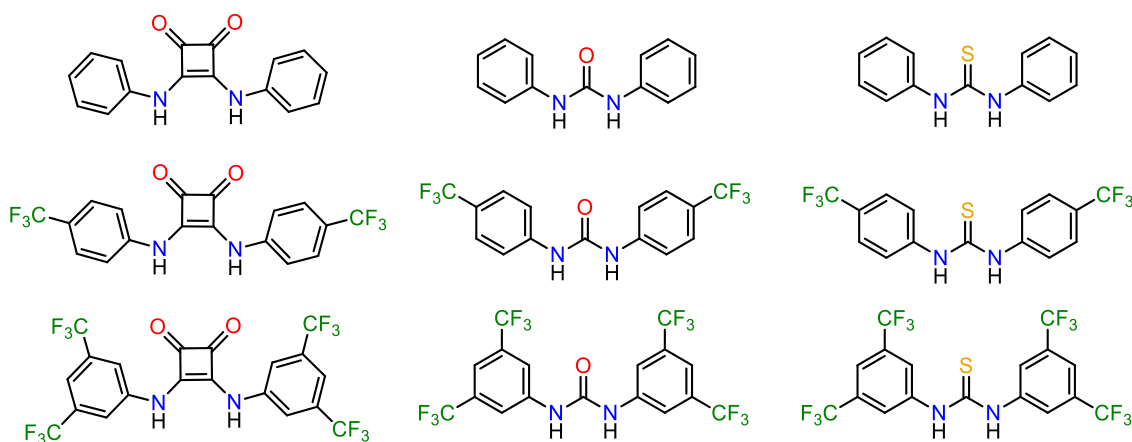


Figura 6. Transportadores aniónicos utilizados por Gale y colaboradores en la referencia 20. De izquierda a derecha: Conjunto de compuestos escuaramida, conjunto de compuestos urea, conjunto de compuestos tiourea.

Un correcto mantenimiento del transporte aniónico no solo es imprescindible para el tratamiento de las canelopatías sino que, además, supone una nueva vía para el tratamiento del cáncer. Ello es debido a que las células cancerígenas funcionan con un gradiente de pH invertido respecto a las células sanas, es decir, en ellas el pH intracelular es más básico que el extracelular. El mecanismo a través del cual se consigue la alcalinización intracelular no se conoce al completo, pero se ha observado que a pH alcalinos la proliferación de un tumor se ve incrementada debido al incremento de la glucólisis y a la mejor adaptación a las condiciones de hipoxia²¹. En este sentido, aquellos transportadores que sean capaces de inducir cambios en el pH intracelular a través del cotransporte de H⁺ y Cl⁻ o el antiporte de Cl⁻/HCO₃⁻ podrán entorpecer el metabolismo de las células cancerígenas conduciendo a su apoptosis²². Además, algunos de estos transportadores se ha comprobado que también conducen a la interrupción del proceso de autofagia a través del cual las células digieren aquellos orgánulos defectuosos u otros entes presentes en el citoplasma. La autofagia está relacionada con procesos como la diferenciación

¹⁹ Choi, J. Y.; Muallem, D.; Kiselyov, K.; Lee, M. G.; Thomas, P. J.; Muallem, S.; Aberrant CFTR-dependent HCO₃⁻ transport in mutations associated with cystic fibrosis, *Nature*, **2001**, *410*, 94-97.

²⁰ 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.

²¹ Persi, E.; Duran-Frigola, M.; Damaghi, M.; Roush, W. R.; Gillies, P. R. J.; Ruppin, E.; Systems analysis of intracellular pH vulnerabilities for cancer therapy, *Nature Communications*, **2018**, *9*, 2986-2997.

²² a) Busschaert, N.; Wenzel, M.; Light, M. E.; Iglesias-Hernández, P.; Pérez-Tomás, R.; Gale, P. A.; Structure-Activity Relationships in Tripodal Transmembrane Anion Transporters: The Effect of Fluorination, *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, *133*, 14136-14148. b) Gale, P. A.; Davis, J. T.; Quesada, R.; Anion transport and supramolecular medicinal chemistry, *Chem. Soc. Rev.*, **2017**, *46*, 2497-2520.

celular, el crecimiento celular o el mantenimiento de la homeostasia y la interrupción de ésta conduce inevitablemente a la muerte celular²³.

El estudio *in vitro* de la eficacia de transportadores o cualquier otro compuesto bioactivo, requiere de fragmentos fluorescentes que permitan la localización del compuesto en el interior celular o la visualización de un proceso como pudiera ser la liberación de una molécula fluorescente como consecuencia de un estímulo concreto. Este tipo de compuestos reciben el nombre común de sondas fluorescentes.

1.3. Sondas moleculares fluorescentes

Una sonda fluorescente puede definirse como aquella molécula capaz de absorber radiación electromagnética de una longitud de onda concreta y emitir otra radiación de longitud de onda mayor (fluorescencia), con la capacidad para penetrar las membranas celulares. Los fluoróforos, responsables de las propiedades ópticas de las sondas fluorescentes, pueden unirse covalentemente a fragmentos moleculares que tienen como objetivo dirigir el conjunto a su destino en el caso de sondas biológicas; o reconocer una especie química concreta en el caso de sondas analíticas. En cualquier caso, pueden clasificarse en dos grupos en función del fragmento fluorescente que presentan.

1.3.1. Fluoróforos intrínsecos

Los fluoróforos intrínsecos son aquellos que se encuentran presentes de forma natural en los organismos vivos. Algunos ejemplos son las cadenas laterales de algunos aminoácidos como la fenilalanina o el triptófano; o cofactores enzimáticos como las flavinas o el NADH.

Presentan como ventaja el poder estudiar los sistemas en los que se encuentran sin necesidad de agentes externos²⁴. No obstante, tanto el número de fluoróforos como el número de sistemas susceptibles a ser estudiados con ellos es limitado y además, en general, todos ellos suelen requerir radiaciones de longitud de onda cercana al ultravioleta para ser excitados, lo que conlleva una cierta citotoxicidad a las células o tejidos estudiados.

²³ a) Busschaert, N.; Park, S.; Baek, K.; Choi, Y. P.; Park, J.; Howe, E. N. W.; Hiscock, J. R.; Karagiannidis, L. E.; Marques, I.; Félix, V.; Namkung, W.; Sessler, J. L.; Gale, P. A.; Shin, I.; A synthetic ion transporter that disrupts autophagy and induces apoptosis by perturbing cellular chloride concentrations, *Nature Chemistry*, **2017**, *9*, 667-675. b) Ver referencia 9. c) Yoshinori Ohsumi fue galardonado con el Premio Nobel de Medicina de 2016 por sus contribuciones en la elucidación de los mecanismos de la autofagia.

²⁴ Zipfel, W. R.; Williams, R. M.; Christie, R.; Yu Nikitin, A.; Hyman, B. T.; Webb, W. W.; Live tissue intrinsic emission microscopy using multiphoton-excited native fluorescence and second harmonic generation, *Proc. Natl Acad. Sci.*, **2003**, *12*, 7075-7080.

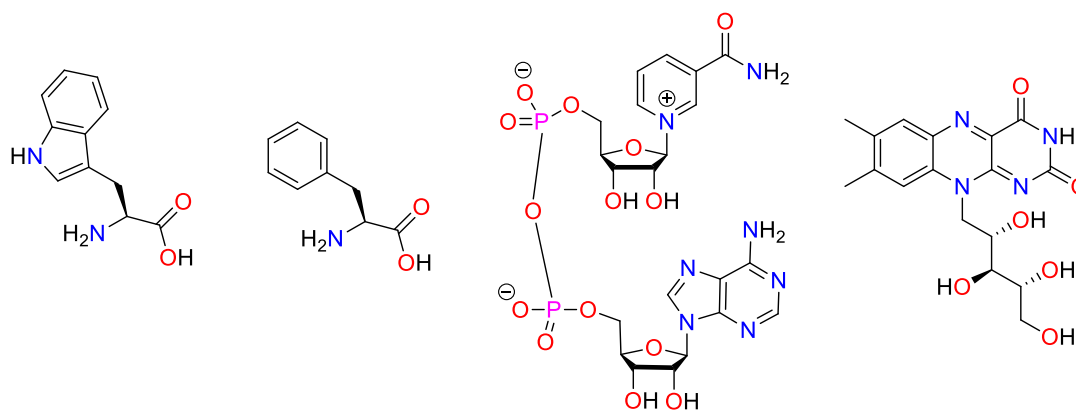


Figura 7. Algunos ejemplos de fluoróforos intrínsecos. De izquierda a derecha: L-triptófano, L-fenilalanina, Dinucleótido de nicotamida y adenina en su forma oxidada (NAD⁺), Riboflavina (Vitamina B₂) en su forma oxidada.

1.3.2. Fluoróforos extrínsecos

El grupo de fluoróforos con un mayor interés desde el punto de vista químico es, sin duda, el de los fluoróforos extrínsecos²⁵. Además de permitir el estudio de procesos o estructuras que no presentan fluorescencia intrínseca como el ADN²⁶ -por presentar un rendimiento cuántico demasiado bajo- o los lípidos; las amplias posibilidades de elección de fluoróforos y sus opciones de derivatización, permiten conseguir sondas específicamente diseñadas para una acción concreta. De esta manera, en función del núcleo fluorescente o de otros fragmentos unidos a él, puede conseguirse sensibilidad al pH²⁷, al potencial redox²⁸, o a grupos funcionales o especies químicas concretas²⁹. Además, el abanico disponible de fluoróforos permite escoger para cada aplicación, aquel que presente las longitudes de onda de emisión y excitación más convenientes en cada caso.

La derivatización de fluoróforos ha supuesto una revolución en el campo de la fisiología y patología celular por ofrecer la oportunidad de estudiar los distintos orgánulos celulares por separado, permitiendo así recopilar una mayor información acerca de su funcionamiento y facilitando el tratamiento de ciertas enfermedades. La homeostasia celular se sostiene a través de un conjunto de reacciones químicas que generan, mantienen y eliminan diferentes especies

²⁵ Wu, D.; Sedgwick, A. C.; Gunnlaugsson, T.; Akkaya, E. U.; Yoon, J.; James, T. D.; Fluorescent chemosensors: the past, present and future, *Chem. Soc. Rev.*, **2017**, *46*, 7105-7125.

²⁶ Markovitsi, D.; Gustavsson, T.; Talbot, F.; Excited states and energy transfer among DNA bases in double helices. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2007**, *6*, 717-724.

²⁷ Zhang, X.; Rehm, S.; Safont-Sempere, M. M.; Würthner, F.; Vesicular perylene dye nanocapsules as supramolecular fluorescent pH sensor systems, *Nature Chemistry*, **2009**, *1*, 623-629.

²⁸ Lou, Z.; Li, P.; Han, K.; Redox-Responsive Fluorescent Probes with Different Design Strategies, *Acc. Chem. Res.*, **2015**, *48*, 1358-1368.

²⁹ Yin, G.; Niu, T.; Gan, Y.; Yu, T.; Yin, P.; Chen, H.; Zhang, Y.; Li, H.; Yao, S.; A Multi-signal Fluorescent Probe with Multiple Binding Sites for Simultaneous Sensing of Cysteine, Homocysteine, and Glutathione, *Angew. Chem.*, **2018**, *130*, 5085-5088.

químicas en un lugar concreto y en unas concentraciones que han de ser estrictamente respetadas. Algunas de esas especies químicas incluyen cationes y aniones, especies reactivas de oxígeno³⁰ y nitrógeno³¹, tioles³² o péptidos entre muchas otras; y sus balances y localizaciones interfieren en las rutas de señalización y en los eventos patológicos. La detección de estas especies químicas relevantes para la homeostasia celular y su localización en la célula resulta de gran interés para desentrañar la química individual de cada orgánulo y relacionarla con el funcionamiento conjunto de la célula y del organismo en general³³.

La derivatización de fluoróforos con compuestos escuaramídicos cuenta con múltiples ejemplos en el campo de la química biológica debido a la capacidad de las escuaramidas de atravesar la membrana plasmática y a la relativa facilidad que conlleva la síntesis de sus derivados. Entre los ejemplos destaca una sonda capaz de localizar y alcalinizar lisosomas³⁴, propuesta por Chen y colaboradores; o la modificación de los transportadores de aniones de Gale con 1,8-naftalimida para estudiar el proceso de transporte *in vitro*³⁵.

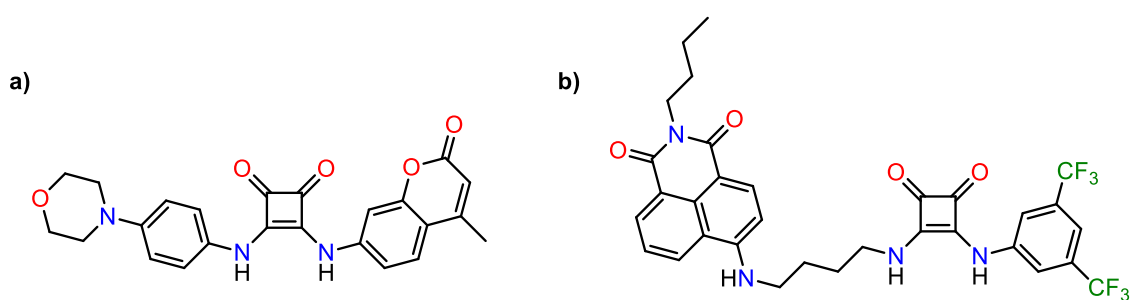


Figura 8. a) Sonda fluorescente propuesta por Chen y colaboradores. b) Sonda fluorescente propuesta por Gale y colaboradores.

En esta línea, el presente trabajo utilizará el fluoróforo FFN102 (descrito a continuación) como estructura base a partir de la cual se obtendrán derivados escuaramídicos de interés como sondas fluorescentes.

³⁰ Chen, Y.; Shi, X.; Lu, Z.; Wang, X.; Wang, Z.; A Fluorescent Probe for Hydrogen Peroxide in Vivo Based on Modulation of Intramolecular Charge Transfer, *Anal. Chem.*, **2017**, *89*, 5278-5284.

³¹ Han, Q.; Liu, J.; Meng, Q.; Wang, Y.; Feng, H.; Zhang, Z.; Xu, Z. P.; Zhang, R.; Turn-On Fluorescence Probe for Nitric Oxide Detection and Bioimaging in Live Cells and Zebrafish, *ACS Sens.*, **2019**, *4*, 309-316.

³² Ver referencia 29.

³³ Xu, W.; Zeng, Z.; Jiang, J.; Chang, Y.; Yuan, L.; Discerning the Chemistry in Individual Organelles with Small-Molecule Fluorescent Probes, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2016**, *55*, 13658-13699.

³⁴ Hong, X.; Yu, X.; Zhang, K.; Chen, W.; Synthesis and properties of a lysosome-targeting fluorescent ionophore based on coumarins and squaramides, *Org. Biomol. Chem.*, **2018**, *16*, 8025-8030.

³⁵ Bao, X.; Wu, X.; Berry, S. N.; Howe, E. N. W.; Chang, Y.; Gale, P. A.; Fluorescent squaramides as anion receptors and transmembrane anion transporters, *Chem. Commun.*, **2018**, *54*, 1363-1367.

1.3.2.1. Los Falsos Neurotransmisores Fluorescentes (FFNs)

Los “falsos neurotransmisores fluorescentes” (FFNs) son sondas que actúan como marcadores fluorescentes y permiten la visualización del proceso de liberación de neurotransmisores en los terminales presinápticos³⁶. De esta manera, los investigadores son capaces de estudiar la liberación y la recaptación de neurotransmisores, así como el efecto de agonistas y antagonistas durante la cascada de señalización³⁷.

Concretamente, los compuestos FFN102 y FFN202 desarrollados por Sames, Gubernator y colaboradores, son compuestos fluorescentes sensibles al pH que marcan selectivamente terminales sinápticos dopaminérgicos³⁸. La visualización del proceso de liberación de la dopamina es crucial para profundizar en las claves de su regulación, puesto que ésta está involucrada en la función motora, los hábitos de aprendizaje o la motivación. Es por ello, que las alteraciones en la regulación de la liberación y la recaptación de la dopamina acarrear problemas como la enfermedad de Parkinson, la esquizofrenia o trastornos de hiperactividad o déficit de atención.

En una neurona, la captación vesicular de los neurotransmisores del tipo monoamina -como la dopamina- así como los FFNs basados en cumarinas, tiene lugar a través de la acción del transportador vesicular de monoaminas (VMAT), una proteína integral de membrana. Dicho transportador capta el neurotransmisor a través del antiporte de protones, a la vez que la ATPasa capta protones con la consecuente hidrólisis de ATP. De esta manera, el gradiente de pH entre el citoplasma y las vesículas constituye el motor para la captación y acumulación de los neurotransmisores en el interior de las vesículas. En este sentido la ventaja que proporcionan los FFNs sensibles al pH, es precisamente el poder disponer de una lectura *in situ* del pH en el interior de vesículas específicas.

³⁶ Evanko, D.; Fluorescent false neurotransmitters, *Nat. Methods*, **2009**, *7*, 486-486

³⁷ a) Gubernator, N. G.; Zhang, H.; Staal, R. G. W.; Mosharov, E. V.; Pereira, D. B.; Yue, M.; Balsanek, V.; Vadola, P. A.; Mukherjee, B.; Edwards, R. H.; Sulzer, D.; Sames, D.; Fluorescent False Neurotransmitters Visualize Dopamine Release from individual Presynaptic Terminals, *Science*, **2009**, *324*, 1441-1444. b) Lee, M.; Gubernator, N. G.; Sulzer, D.; Sames, D.; Development of pH-Responsive Fluorescent False Neurotransmitters, *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, *132*, 8828-8830. c) Sames, D.; Dunn, M.; Karpowicz, R. J.; Sulzer, D.; Visualizing Neurotransmitter Secretion at Individual Synapses, *ACS Chem. Neurosci.*, **2013**, *4*, 648-651.

³⁸ Rodríguez, P. C.; Pereira, D. B.; Borgkvist, A.; Wong, M. Y.; Barnard, C.; Sonders, M. S.; Zhang, H.; Sames, D.; Sulzer, D.; Fluorescent dopamine tracer resolves individual dopaminergic synapses and their activity in the brain, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2013**, *110*, 870-875.

Las próximas páginas describirán la obtención y la caracterización de varios derivados de la cumarina FFN102, así como algunos estudios acerca de la capacidad de éstos para el marcaje de células eucariotas y parásitos unicelulares.

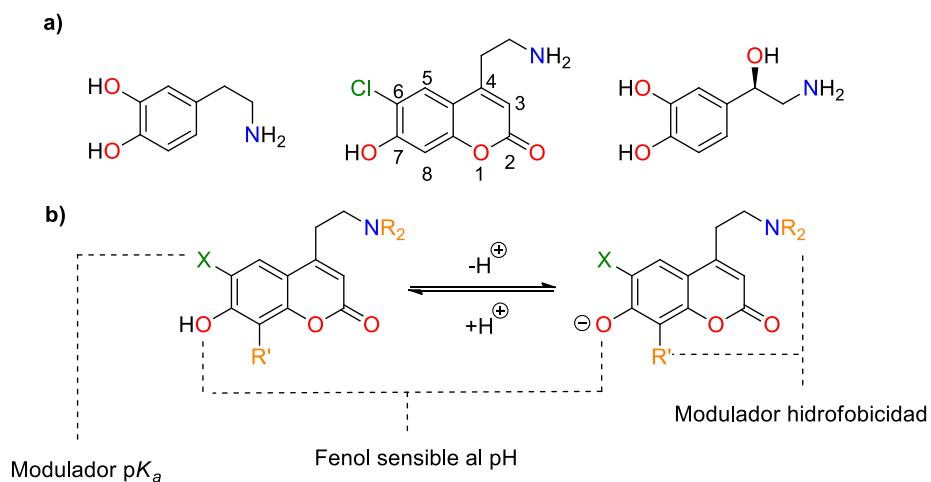


Figura 9. a) De izquierda a derecha: Dopamina, cumarina FFN102 y Noradrenalina. Los números alrededor de la cumarina FFN102 indican la numeración habitual para la familia de las cumarinas. b) Diseño racional de los FFNs sensibles al pH.

2. Objetivos

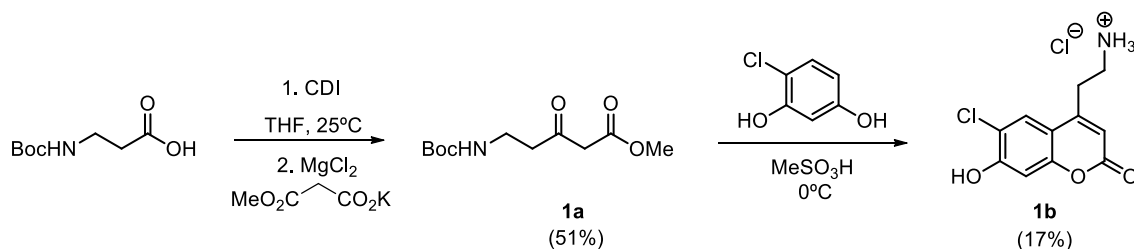
Los objetivos planteados para el presente trabajo se resumen en las líneas siguientes:

- Síntesis y caracterización de una serie de derivados escuaramídicos lineales a partir de la cumarina FFN102.
- Síntesis y caracterización de derivados cicloescuaramídicos de la cumarina FFN102.
- Evaluación de la capacidad de los compuestos sintetizados para actuar como marcadores fluorescentes.

3. Resultados y discusión

3.1. Síntesis de la cumarina FFN102 y los derivados escuaramida lineales

Uno de los objetivos de este trabajo consistía en la preparación de la cumarina FFN102 y la posterior síntesis de un conjunto de derivados escuaramidídicos lineales, así como la caracterización de cada uno de éstos. A continuación, se presentan los esquemas de reacción seguidos para la obtención de cada uno de los productos indicados.



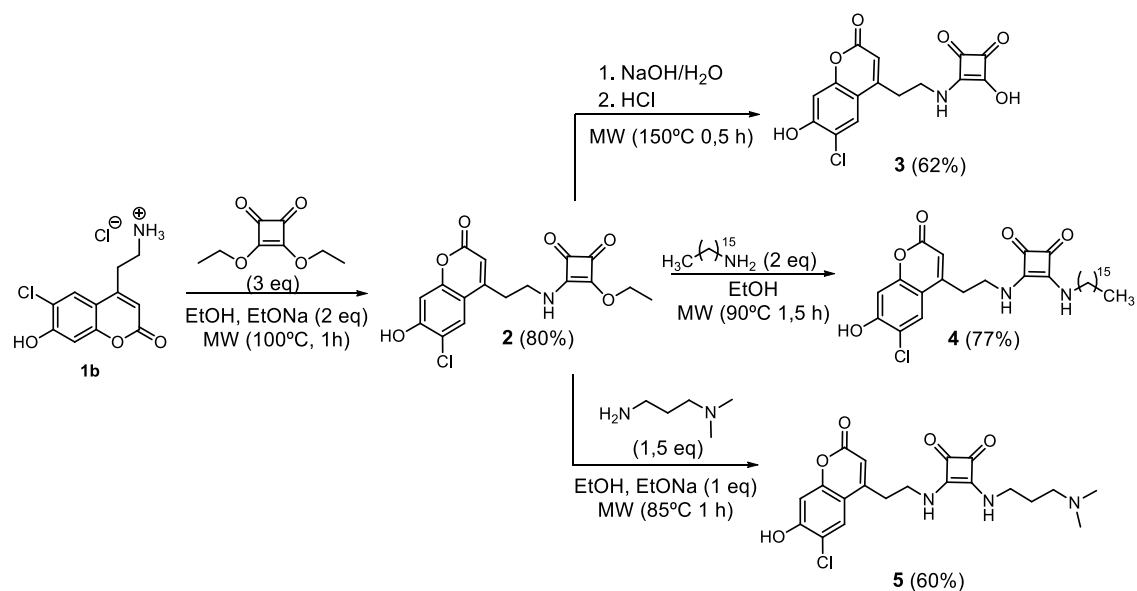
Esquema 1. Obtención del β-cetoéster (1a) y la cumarina FFN102 (1b)

La cumarina FFN102 se obtuvo siguiendo el procedimiento descrito por Lee G. y colaboradores en la bibliografía³⁹. La primera reacción para la formación del β-cetoéster (**1a**) consiste en un proceso de adición-eliminación que requiere de la activación del grupo ácido con 1,1-carbonildiimidazol (CDI), un agente de acoplamiento. La reacción se llevó a cabo en condiciones anhidras para evitar la hidrólisis del CDI i del producto resultante de la activación del grupo ácido de la β-Glicina-NBoc protegida. Una vez producida la activación del grupo ácido, tiene lugar la reacción de adición del malonato con la consiguiente eliminación del grupo activante y la posterior descarboxilación para rendir el β-cetoéster (**1a**). La obtención de la cumarina FFN102 (**1b**) se consiguió mediante una reacción clásica de condensación von Pechmann con ácido metanosulfónico como catalizador ácido y evitando la exposición a la luz tanto del matraz de reacción como del producto resultante debido a su carácter fotosensible.

La síntesis de los derivados escuaramidídicos lineales de la cumarina FFN102 se resume en el **Esquema 2**. En éste se incluyen las condiciones de reacción optimizadas para obtener los productos con un reactor de microondas, qué permite incrementar la temperatura y la presión mediante calentamiento dieléctrico. De esta manera se consiguen buenos resultados en periodos cortos de tiempo y con bajas cantidades de disolvente. La síntesis de todos los derivados escuaramida se lleva a cabo a partir del escuaramato de etilo (**2**), sintetizado directamente a partir de la cumarina (**1b**) y escuaramato de dietilo a través de una reacción de adición-eliminación sobre éste último. La utilización de dos equivalentes de etóxido sódico

³⁹ Ver referencia 37b

permite consumir el protón fenólico ($pK_a = 6,2$)⁴⁰ y liberar el clorhidrato de la amina ($pK_a \approx 9-10$)⁴¹, permitiendo que ésta actúe como nucleófilo. Además, el uso de un exceso de escuarato de etilo permite desplazar el equilibrio químico hacia la formación del producto deseado, y la utilización de etanol como disolvente evita que puedan darse otras reacciones sobre el carbono unido al etilo restante del escuarato (**2**).



Esquema 2. Obtención de los productos 2, 3, 4 y 5

La obtención del ácido escuarámico (**3**) implica la hidrólisis básica del correspondiente escuarato de etilo (**2**) tal y como puede observarse en el **Esquema 2**. Por otra parte, las escuaramiditas (**4**) y (**5**) se sintetizan a través de un proceso de adición eliminación sobre el escuarato de etilo (**2**) con la amina correspondiente. Debe tenerse en cuenta que un equivalente de la amina se consume en la ionización del protón fenólico, por lo que debe añadirse un equivalente de una base externa o dos equivalentes de amina.

3.2. Síntesis del derivado cicloescuarámico de la cumarina FFN102

La estructura química de la cicloescuaramida que pretende sintetizarse consta de dos unidades escuaramida unidas entre sí por diaminas alifáticas que actúan como espaciadores. Uno de estos espaciadores es la N-(3-aminopropil)-N-metilpropan-1,3-diamina; mientras que el otro restante es la N,N-bis(3-aminopropil)propan-1,3-diamina; una triamina que permite la funcionalización del macrociclo a través de la reacción entre el grupo amino restante y un electrófilo. El primer espaciador descrito es un producto químico comercial que puede utilizarse sin necesidad de

⁴⁰ Ver referencia 37b

⁴¹ Valores habituales para una amina primaria.

pretratamientos o etapas de protección. No obstante, con el segundo espaciador no sucede lo mismo, puesto que en función de la ruta sintética deberían protegerse uno o dos grupos aminos, y su elevado precio hacen de ello una vía impracticable.

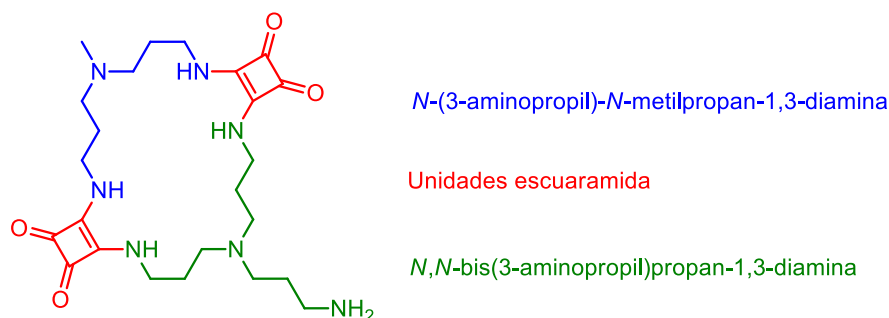
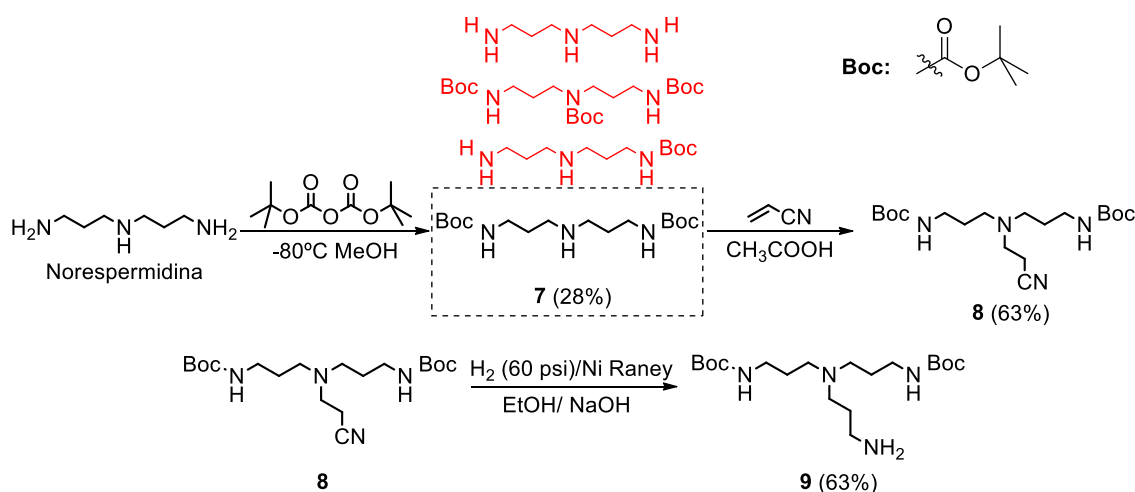


Figura 10. Representación de la cicloescuaramida utilizada e identificación de los espaciadores a través del color.

Por esta razón se planteó una ruta sintética para la obtención de los análogos de la amina deseada con uno o dos grupos amino protegidos.



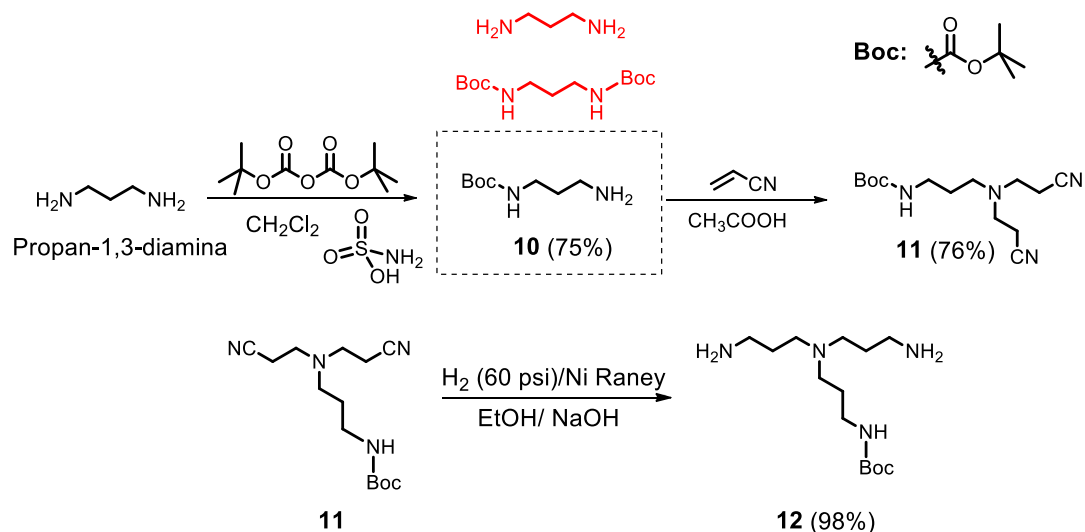
Esquema 3. Ruta sintética para la obtención de la *N,N*-bis(3-aminopropil)propan-1,3-diamina diprottegida. En rojo se muestran otros productos resultantes de la reacción de protección de la norspermidina con $(\text{BOC})_2\text{O}$.

En el **Esquema 3** se muestra la obtención del derivado de la triamina con dos grupos amino protegidos (**9**) a partir de la amina comercial norspermidina⁴². La adición de un exceso de anhídrido t-butoxicarbonílico $(\text{BOC})_2\text{O}$ sobre una disolución de norspermidina en metanol a -80°C conduce a un conjunto de productos en los que varía el número de grupos amino protegidos. Una secuencia de extracciones en la que se modifica el pH de la fase acuosa permite

⁴² Konai, M. M.; Ghosh, C.; Yarlagadda, V.; Samaddar, S.; Halder, J.; Membrane Active Phenylalanine Conjugated Lipophilic Norspermidine Derivatives with Selective Antibacterial Activity, *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 9409-9423.

el aislamiento de la amina (**7**)⁴³, susceptible a reaccionar con acrilonitrilo en presencia de ácido acético para rendir el nitrilo (**8**). La hidrogenación catalítica del nitrilo (**8**) disuelto en etanol con Ni Raney a 60 psi permite la reducción del nitrilo y la obtención de la amina (**9**).

El **Esquema 4** muestra la ruta sintética seguida para la obtención del derivado monoprotegido de la N,N-bis(3-aminopropil)propan-1,3-diamina, a partir del producto comercial 1,3-propandiamina. La monoprotección de la amina comercial se lleva a cabo adicionando sobre la amina de partida disuelta en diclorometano, el anhídrido (BOC)₂O disuelto en el mismo disolvente. La reacción conduce a una mezcla de aminas con distinto número de grupos Boc, de entre los que puede aislarse la amina (**10**) por medio de extracciones líquido-líquido en las que se modifica el pH de la fase acuosa⁴⁴. La adición conjugada de la amina (**10**) sobre acrilonitrilo en presencia de ácido acético da lugar al nitrilo (**11**), cuya hidrogenación catalítica rinde el derivado monoprotegido de la amina N,N-bis(3-aminopropil)propan-1,3-diamina (**12**).

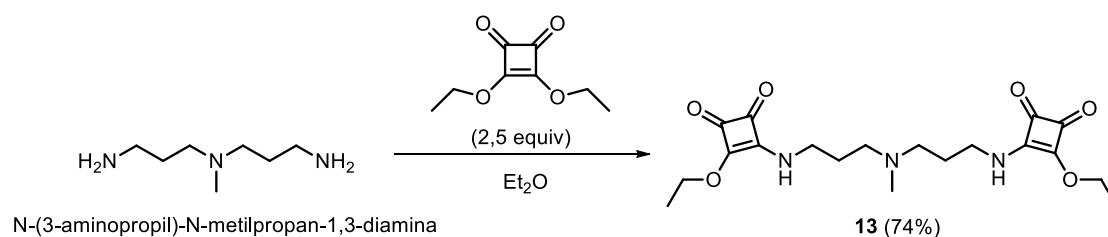


Esquema 4. Ruta sintética para la obtención de la N,N-bis(3-aminopropil)propan-1,3-diamina monoprotegida. En rojo se muestran otros productos resultantes de la reacción de protección de la noespermidina con (BOC)₂O.

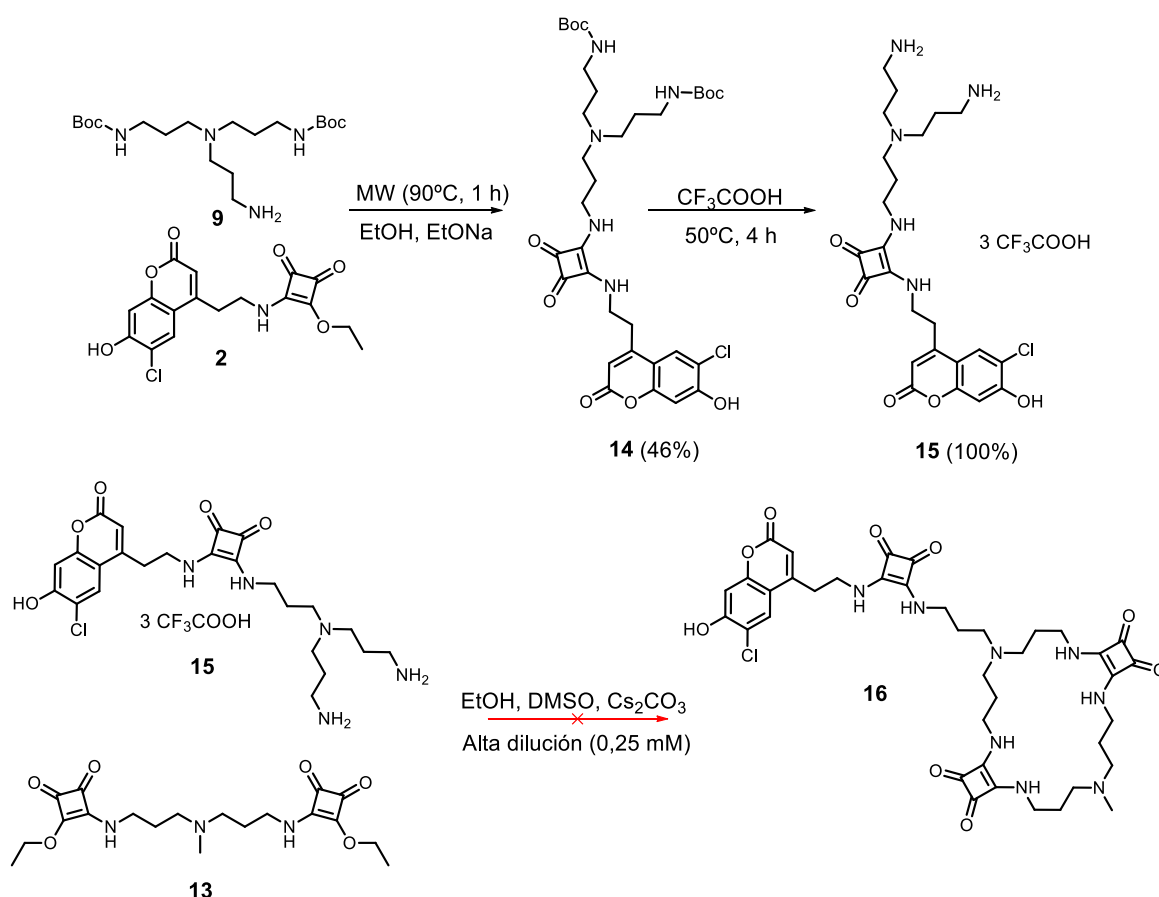
Así pues, con cada uno de los derivados (**9**) y (**12**) se planteó una ruta sintética distinta para la obtención del conjugado entre la cumarina FFN102 y la cicloescaramida con dos unidades escaramida (C2). En ambas rutas el espaciador N-(3-aminopropil)-N-metilpropan-1,3-diamina se hace reaccionar con un exceso de escuarato de dietilo en éter dietílico para rendir el escuaramato (**13**).

⁴³ Para una descripción más detallada acerca de la obtención de la amina **7** consultar el apartado 5.2.7 de la parte experimental.

⁴⁴ Para una descripción más detallada de la obtención de la amina **10** consultar el apartado 5.2.13 de la parte experimental.

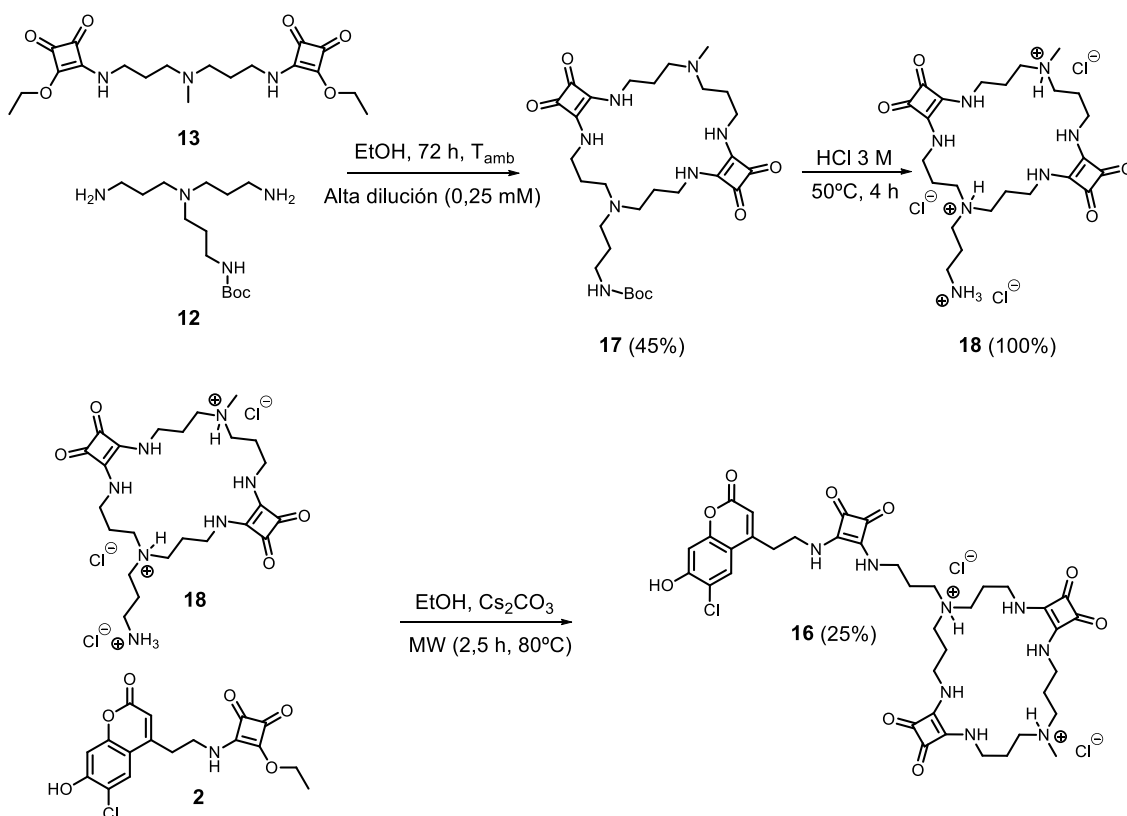
Esquema 5. Síntesis del escuaramato (**13**).

La ruta planteada con la amina (**9**) consistía en la conjugación de la amina libre con el escuaramato de la cumarina (**2**) mediante una reacción de adición eliminación sobre el carbono que sostiene el grupo etoxi. Tras la conjugación, el tratamiento con ácido trifluoroacético permitiría la desprotección de los grupos amino y su posterior macrociclación con el escuaramato (**13**) en condiciones de alta dilución para evitar la formación de macrociclos con mayor número de unidades escuaramida. A continuación, en el **Esquema 6** se muestra la ruta sintética propuesta.

Esquema 6. Ruta sintética propuesta para la obtención de la cicloescuaramida (**16**) a partir de la amina (**9**).

La ruta sintética propuesta a partir de la amina (**9**) no permitió obtener la cicloescuaramida (**16**), probablemente debido a los problemas de solubilidad de la diamina (**15**). Por esta razón se planteó una ruta sintética alternativa a partir de la amina (**12**), tal y como se muestra en el

Esquema 7. En este caso la primera reacción que tiene lugar es la ciclación entre la diamina (**12**) y el escuaramato (**13**) en condiciones de alta dilución para favorecer la formación de la escuaramida C2 y evitar la formación de otros macrociclos con mayor número de unidades escuaramida. Para conseguir dicho propósito se utiliza una bomba Harvard que permite la adición simultánea de cada uno de los reactivos por separado a razón de 20 μL por minuto ($C_1 = 0,5 \mu\text{M}$), y se mantiene la reacción en agitación durante 72 horas ($C_{\text{final}} = 0,25 \text{ mM}$). La cicloescuaramida (**17**) obtenida por centrifugación debe someterse a un tratamiento con ácido clorhídrico 3 M para eliminar el grupo Boc y rendir la cicloescuaramida (**18**) en su forma de clorhidrato, cuya reacción con el escuaramato de etilo (**2**) da lugar al conjugado fluorescente (**16**). En esta última reacción el calentamiento dieléctrico proporcionado por un reactor de microondas permite incrementar la solubilidad de los reactivos (**18**) y (**2**) y posibilita que se dé la reacción.

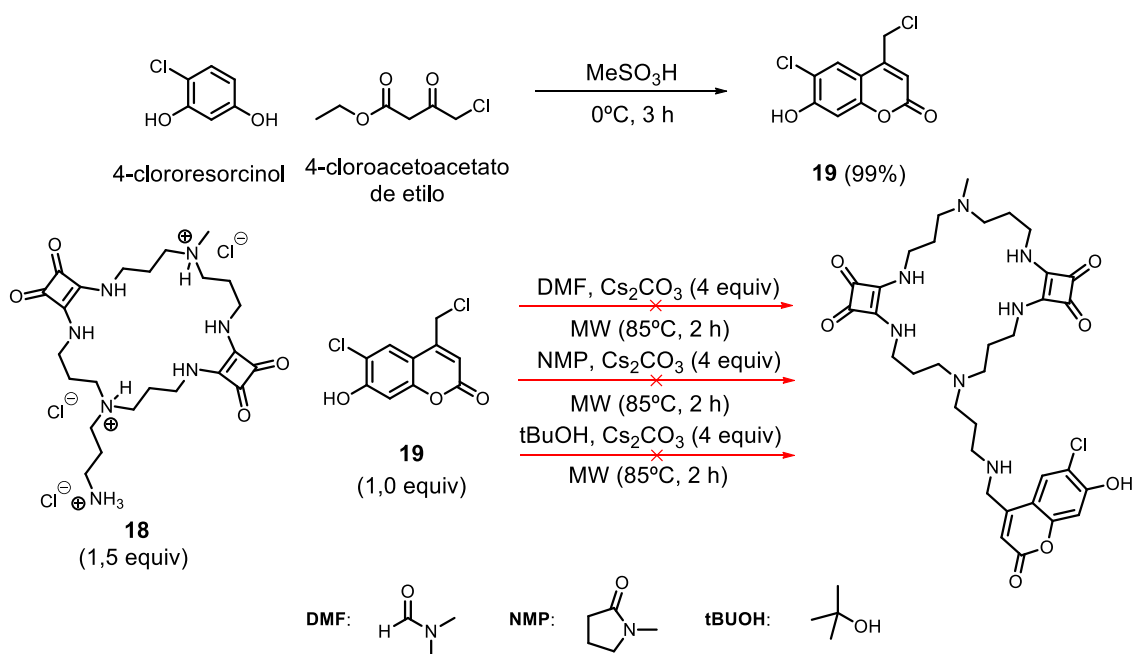


Esquema 7. Ruta sintética propuesta para la obtención de la cicloescuaramida **16** a partir de la amina **12**.

Tal y como se verá en apartados siguientes, el conjugado (**16**) experimenta un efecto de atenuación de la fluorescencia o quenching muy acusado con respecto a la cumarina FFN102. El origen de este efecto es posible que sea provocado por una transferencia electrónica fotoinducida (PET), en la que existe una transferencia de electrones de un dador a un aceptor, modificando los niveles energéticos que intervienen en la fluorescencia. Este efecto es sensible a la distancia entre el fluoróforo y el grupo que aporta el par electrónico y ha sido observado en

escuaramidas, en las que el anillo escuaramídico se comporta como dador⁴⁵. Por esta razón, se plantea la síntesis de un conjugado similar al (**16**) pero sin la presencia de la escuaramida puente que permite unir la cicloescuaramida y el fluoróforo. En este caso, en lugar de utilizar la cumarina FFN102, se preparó una cumarina con un centro electrófilo susceptible a reaccionar directamente con el grupo amino de la cicloescuaramida (**18**). La síntesis de la cumarina (**19**), al igual que la cumarina FFN102, transcurre vía una condensación von Pechmann, en la que se hacen reaccionar 4-clororesorcinol y 4-cloroacetoacetato de etilo, utilizando ácido metanosulfónico como catalizador ácido. La cumarina resultante presenta una fluorescencia significativamente menor a la cumarina FFN102, probablemente debido a la ausencia del grupo amino⁴⁶. De todas maneras, cabe esperar que la fluorescencia aumente con la conjugación debido al reemplazamiento del cloruro por un grupo amino.

La conjugación de la cumarina (**19**) con la cicloescuaramida (**18**) se realizó en un reactor de microondas utilizando disolventes no nucleófilos dado el carácter electrófilo de la cumarina **19**. Además, el uso de un exceso de cicloescuaramida evitaría la polialquilación de la amina primaria de partida. En el **Esquema 8** se muestra tanto la síntesis de la cumarina (**19**) como las condiciones utilizadas en los distintos intentos de síntesis del nuevo conjugado.



Esquema 8. Síntesis de la cumarina (**19**) y ruta sintética planteada para la obtención de su conjugado con la cicloescuaramida C2 (**18**).

⁴⁵ Prohens, R.; Martorell, G.; Ballester, P.; Costa, A.; A squaramide fluorescent ensemble for monitoring sulfate in water. *Chem. Commun.*, **2001**, 1456-1457

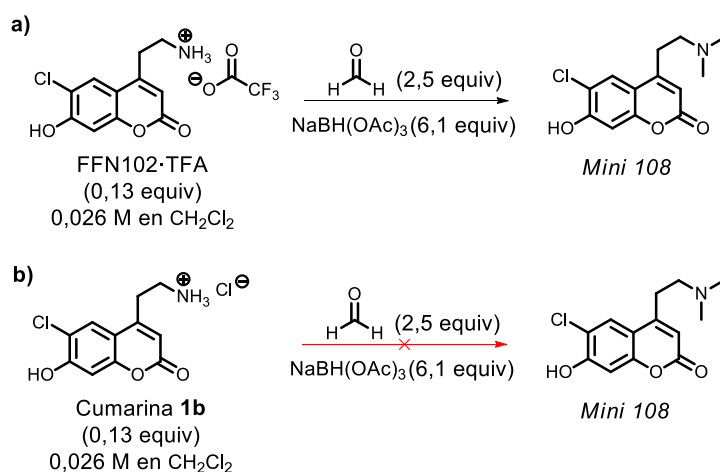
⁴⁶ Ver referencia 37b.

En todos los casos planteados no se observó la transformación deseada, por lo que se decidió evaluar otras posibilidades.

3.3. Síntesis de un nuevo candidato FFN

En este apartado se describe la obtención casual de un derivado de la cumarina FFN102, cuando se planeaba obtener el producto dimetilado (*Mini 108*⁴⁷) para el estudio de las cinéticas de liberación de aminas terciarias a través de un sistema autoinmolativo basado en escuaramidas⁴⁸.

Así pues, la reacción que se pretendía llevar a cabo era la metilación reductiva del fluoróforo FFN102 con formaldehído y triacetoxiborohidruro sódico tal y como se muestra en el **Esquema 9**.



Esquema 9. a) Condiciones para la obtención de la cumarina *Mini108* propuestas en la referencia 37b. b) Condiciones utilizadas en el primer intento fallido de síntesis.

No obstante, el clorhidrato de la cumarina **1b** resulta completamente insoluble en diclorometano por lo que la reacción no avanza. Por esta razón, se buscaron otras metodologías para llevar a cabo la metilación reductiva de la cumarina FFN102 y se contempló la posibilidad de utilizar Zn como reductor en medio formaldehído acuoso, utilizando NaH₂PO₄ para asegurar un pH ligeramente ácido que permitiera la formación de la base de Schiff entre la cumarina y el formaldehído⁴⁹. Sin embargo, siguiendo el procedimiento descrito, se obtuvo un producto inesperado, no descrito en la bibliografía, cuyo espectro de ¹H-RMN mostraba la desaparición del protón a 6,26 ppm, correspondiente al protón en la posición 3 de la cumarina. El producto

⁴⁷Ver material suplementario de la referencia 37b

⁴⁸La descripción del sistema autoinmolativo y el estudio de las cinéticas no son objeto de este trabajo y se incluyen entre los resultados no publicados obtenidos por la señora M. Ximenis como parte de su tesis doctoral.

⁴⁹Silva, R. A.; Estevam, I. H. S.; Bieber, L. W.; Reductive methylation of primary and secondary amines and amino acids by aqueous formaldehyde and zinc, *Tet. Lett.*, **2007**, *48*, 7680-7682.

obtenido muestra dos señales nuevas: un singlete correspondiente a un metilo N-CH₃ y un singlete que integra aproximadamente 2, correspondiente a un grupo metileno (**Figura 11a**).

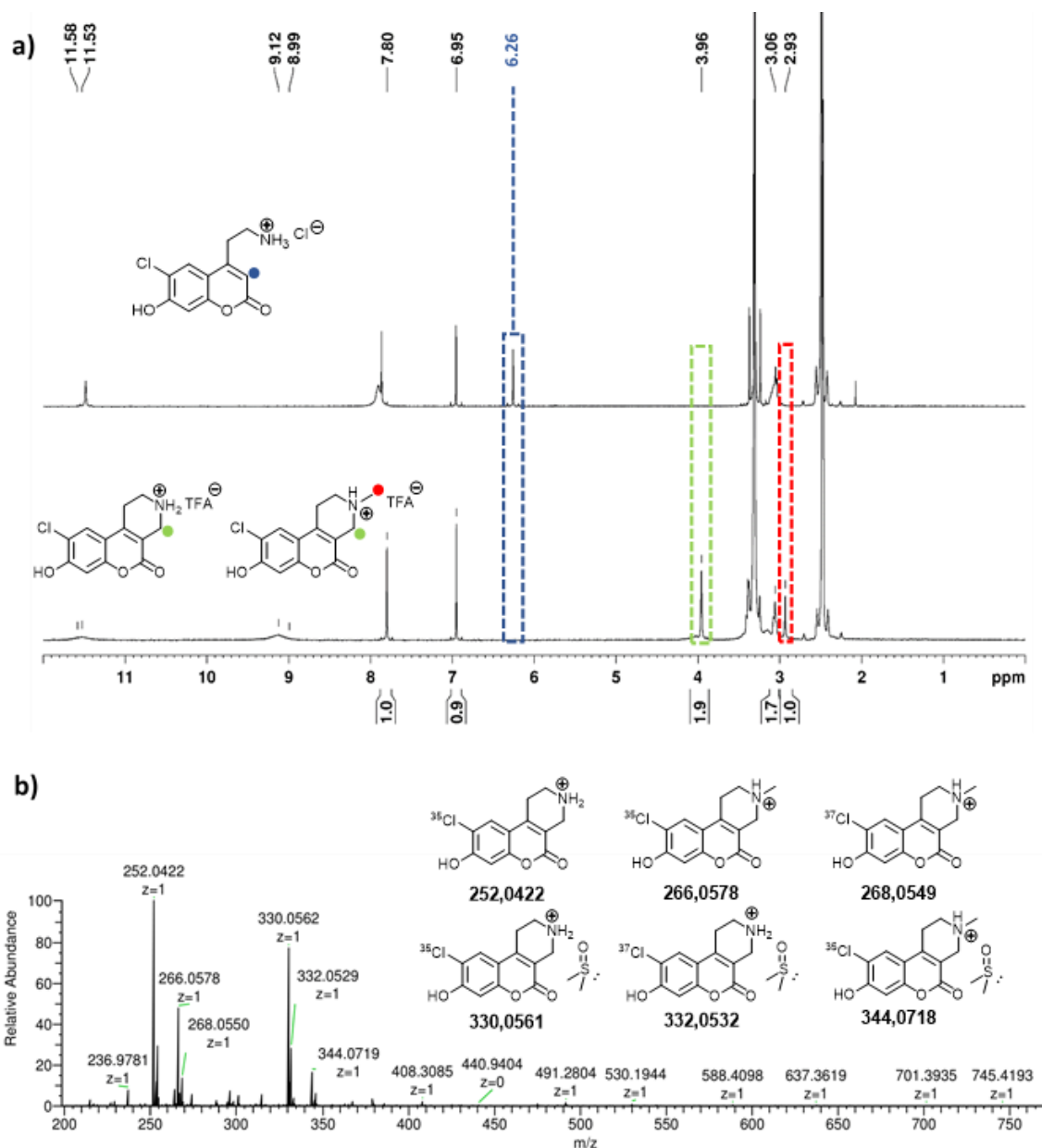
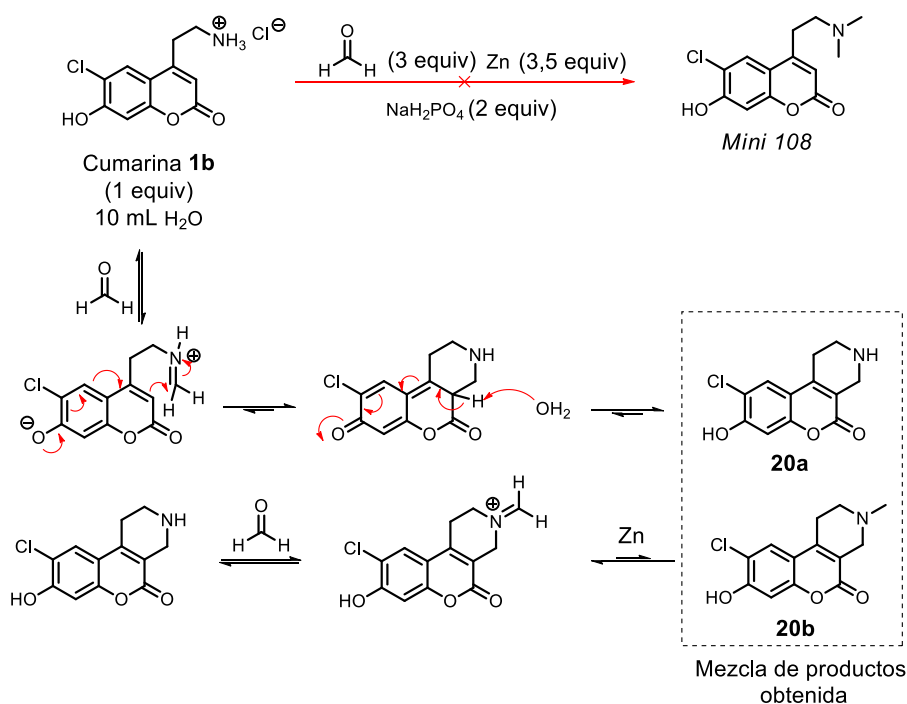


Figura 11. a) Espectros de ¹H-RMN en DMSO-d₆ de la cumarina (**1b**) y de la mezcla resultante cristalizada con ácido trifluoroacético 1 M en agua (**20a + 20b**). b) Espectro de masas correspondiente a la mezcla anterior.

Ello sugiere la formación de un enlace C-C a través del ataque del carbono en Alpha a la lactona al formaldehído activado a través de la formación de la base de Schiff con la cumarina. El hecho de que el producto resultante de esta ciclación sea una amina secundaria, permite que forme otra imina con otra molécula de formaldehído y evolucione a través de una metilación reductiva en la que el cinc actúa de reductor. Esta última reacción no es completa y el producto resultante de la reacción consiste en una mezcla del fluoróforo ciclado y su homólogo metilado; como así

lo evidencian tanto las integrales de su espectro de $^1\text{H-RMN}$ como el espectro obtenido a través de espectrometría de masas de la muestra cristalizada en ácido trifluoroacético 1 M en agua.

A raíz de los resultados obtenidos, se deduce que la reacción de ciclación intramolecular es más rápida que la metilación reductiva con cinc, puesto que el espectro de masas atestigua la presencia de producto ciclado sin metilar, pero no se detecta presencia de producto monometilado sin ciclar ($\text{C}_{12}\text{H}_{13}^{35}\text{ClNO}_3^+ = 254,0578$ y $\text{C}_{12}\text{H}_{13}^{37}\text{ClNO}_3^+ = 256,0549$). Además, cuando la reacción se lleva a cabo en presencia de un exceso de formaldehído o cinc no se consigue forzar la metilación del producto ciclado. Sin embargo, pese a que la reacción de ciclación no conlleva ninguna reducción, no se observa producto ciclado si la reacción se lleva a cabo en ausencia de Zn, lo que sugiere que éste juega un papel imprescindible en la ciclación intramolecular de la imina de la cumarina (**1b**). A continuación, se muestra en el **Esquema 10** las condiciones de reacción utilizadas, junto con la mezcla de productos finalmente obtenida y el mecanismo de reacción propuesto que explica su formación.



Esquema 10. Condiciones impuestas para la metilación reductiva con Zn y productos obtenidos bajo dichas condiciones.

Debido a que el Zn resulta imprescindible para la ciclación y a que modificando los equivalentes de éste no se consigue la obtención de ninguno de los dos productos puros, se plantea la separación de los dos fluoróforos resultantes. No obstante, tanto el intento de separación con HPLC preparativo en fase reversa con columna C18 y fase móvil H₂O:Acetonitrilo (gradiente creciente en acetonitrilo), como sucesivas recristalizaciones con ácido trifluoroacético 1 M, no

consiguen enriquecer las fracciones resultantes en ninguno de los dos fluoróforos. Es por ello que se plantea la obtención del fluoróforo ciclado metilado (**20b**) a partir de la metilación reductiva de la mezcla utilizando como reductor triacetoxiborohidruro sódico, siguiendo las condiciones descritas en el **Esquema 9**. De esta manera, tras la recristalización con ácido trifluoroacético 1 M en agua del producto obtenido después de la elaboración, se consigue obtener el fluoróforo ciclado metilado (**20b**) como cristales aciculares de color amarillo pálido. A continuación, se muestran el espectro de MS y la estructura resuelta de un monocristal de la cumarina (**20b**), junto con las condiciones de reacción utilizadas para forzar la metilación reductiva.

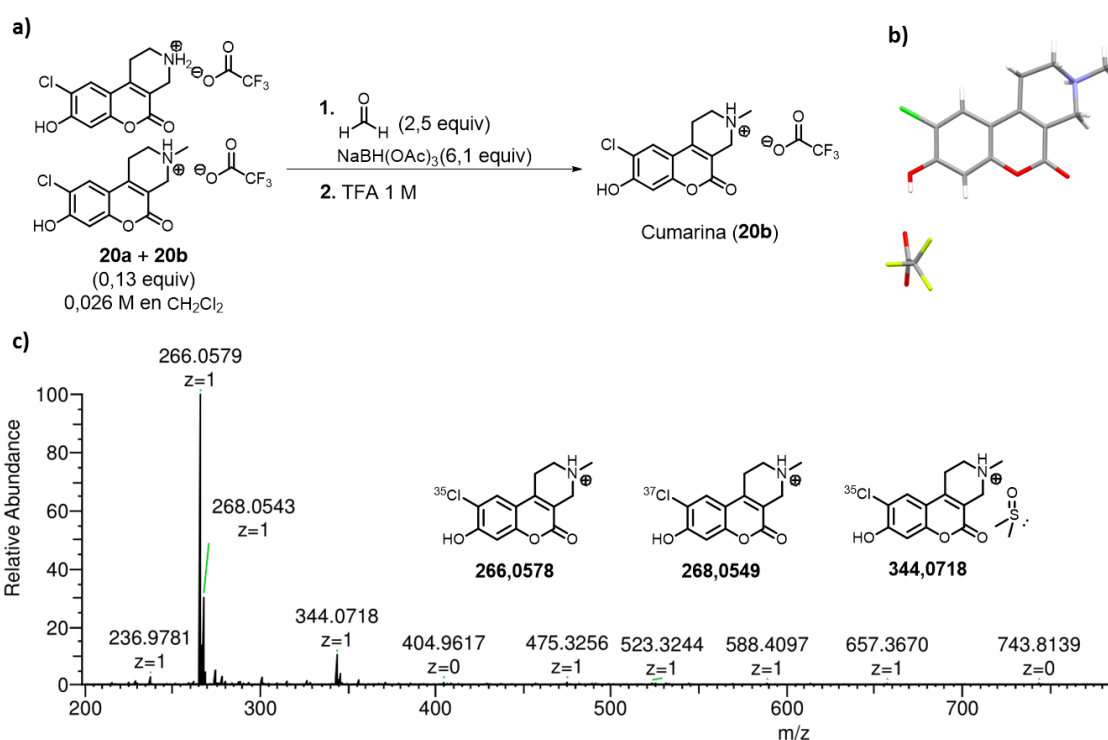
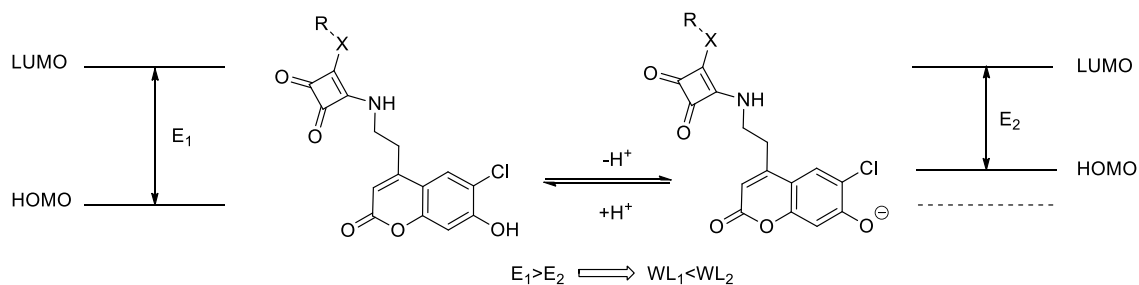


Figura 12. a) Esquema de reacción para la obtención de la cumarina (**20b**). b) Estructura de rayos X obtenida a partir de un monocristal de la sal de trifluoroacetato de la cumarina (**20b**). c) Espectro de masas y asignación de los picos a sus correspondientes estructuras.

3.4. Caracterización por espectroscopia de fluorescencia

En este apartado se describe la caracterización de la fluorescencia de los productos susceptibles a poder actuar como biomarcadores. Así pues, dicha caracterización se limita a los productos **1b**, **2**, **3**, **5**, **16**, **19** y **20b**; quedando excluido el producto **4** por no ser soluble en disolución acuosa con un 0,1% de dimetilsulfóxido. La caracterización llevada a cabo consistió en el estudio de la fluorescencia a diferentes valores de pH, y la determinación de los rendimientos cuánticos a un pH fisiológico.

El mantenimiento del hidroxilo fenólico en todos los compuestos fluorescentes sintetizados les confiere, como en la cumarina FFN102, propiedades espectroscópicas y fluorescentes diferentes en función del pH como resultado del equilibrio ácido-base entre el fenol y el fenolato.



Esquema 11. Equilibrio ácido-base en los derivados de FFN102 responsable de la fotosensibilidad al pH. WL se refiere a la longitud de onda del máximo de las bandas de absorción/excitación.

Así pues, en función del pH, los productos exhiben dos bandas de excitación a 330 nm o 370 nm que se corresponden con las formas fenol i fenolato del fluoróforo. Puede suponerse que la banda de la cumarina ionizada es menos energética que la de la forma protonada, debido a que la conjugación de la carga negativa del oxígeno con el anillo aromático eleva la energía del HOMO y por tanto, disminuye la diferencia energética entre los estados HOMO-LUMO entre los que tiene lugar el tránsito electrónico (**Esquema 12**). La introducción de la unidad escuaramida y la variación de X que da lugar a los diferentes derivados de la cumarina FFN102 no conduce a diferencias significativas en la posición de los máximos de excitación y emisión, por lo que puede deducirse que la densidad de carga del anillo fenólico no se ve alterada con estas modificaciones. No obstante, como se ha comentado anteriormente, se observa un efecto de atenuación de la fluorescencia en todos aquellos derivados que contienen la unidad esquaramida, probablemente debido a una transferencia electrónica fotoinducida (PET). A continuación, se muestran los espectros de fluorescencia obtenidos en el rango de pH de 8 a 4 para los distintos compuestos.

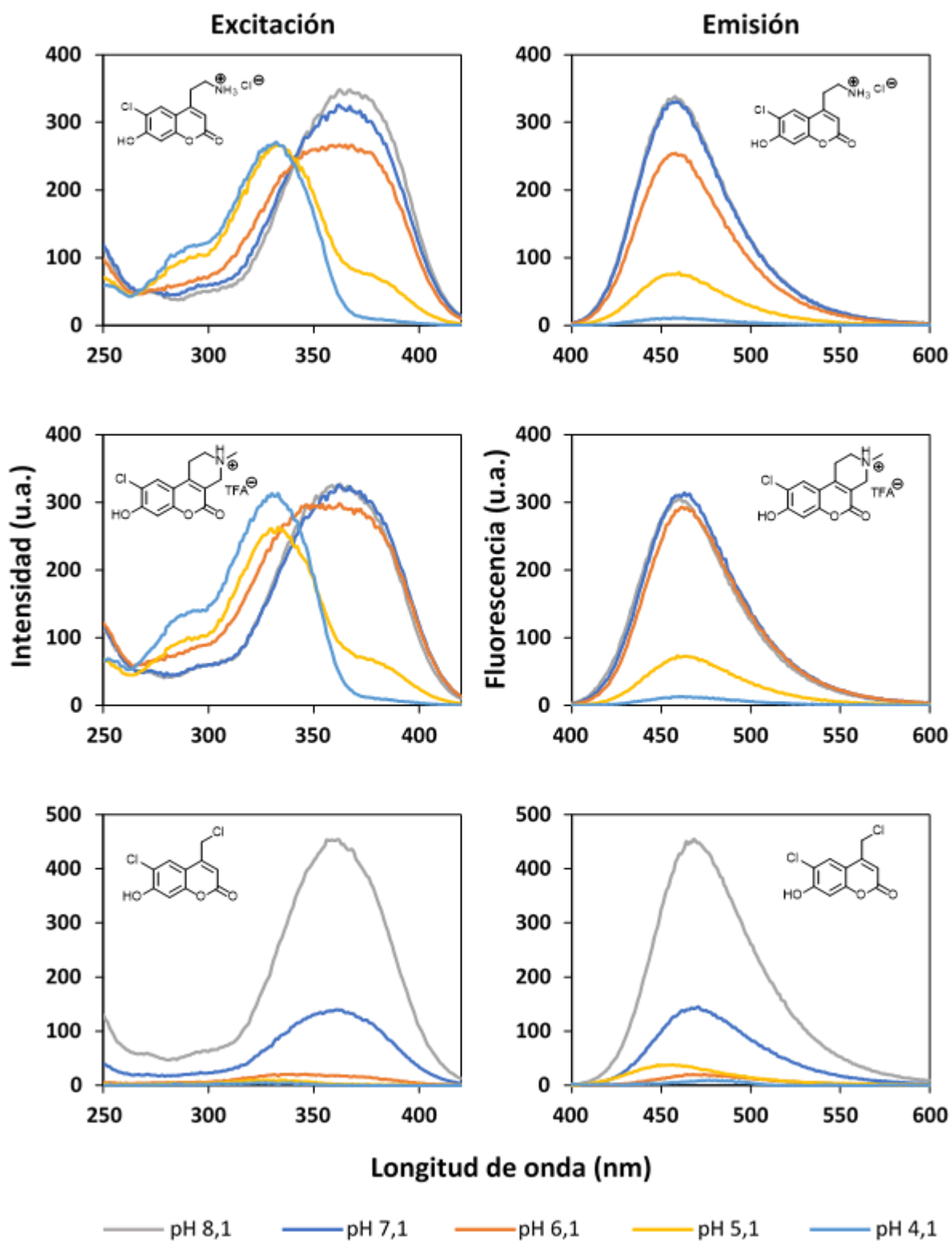


Figura 13. Espectros de excitación (izquierda) y emisión (derecha) de los compuestos **1b**, **20b** y **19** a concentración 3,3 μM . Los espectros de los compuestos **1b** y **20b** se han registrado a una amplitud de ventana espectral de 2,5 mientras que el compuesto **19** se ha registrado a una amplitud de 5. Los espectros de excitación se han obtenido excitando la muestra entre 250 nm y 450 nm y recogiendo la radiación emitida a 456 nm. Los espectros de emisión se han obtenido excitando la muestra a 375 nm y recogiendo la radiación emitida entre 400 y 600 nm.

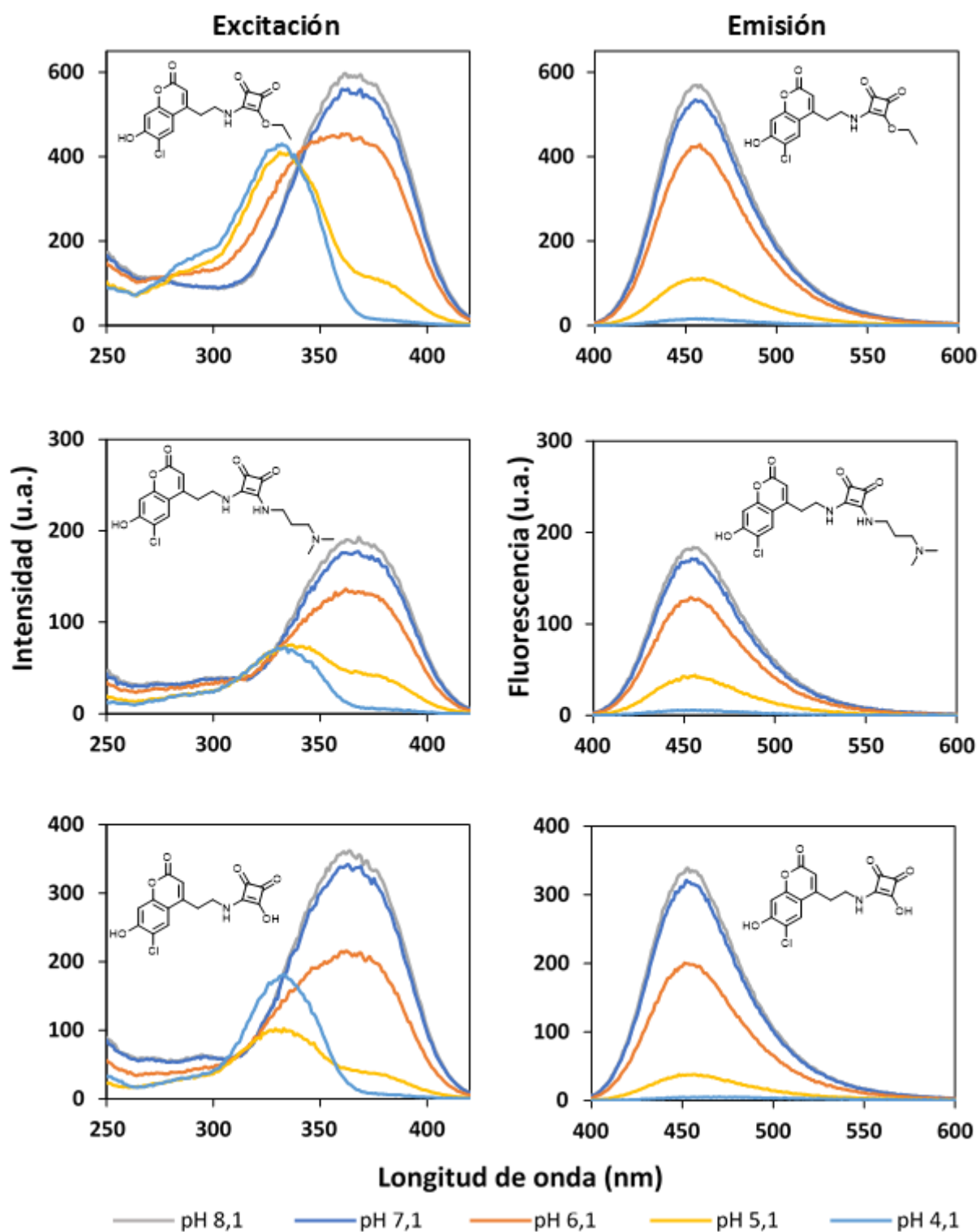


Figura 14. Espectros de excitación (izquierda) y emisión (derecha) de los compuestos **2**, **5** y **4** a concentración $3,3 \mu\text{M}$ y a una amplitud de ventana espectral de 5. Los espectros de excitación se han obtenido excitando la muestra entre 250 nm y 450 nm y recogiendo la radiación emitida a 456 nm. Los espectros de emisión se han obtenido excitando la muestra a 375 nm y recogiendo la radiación emitida entre 400 y 600 nm.

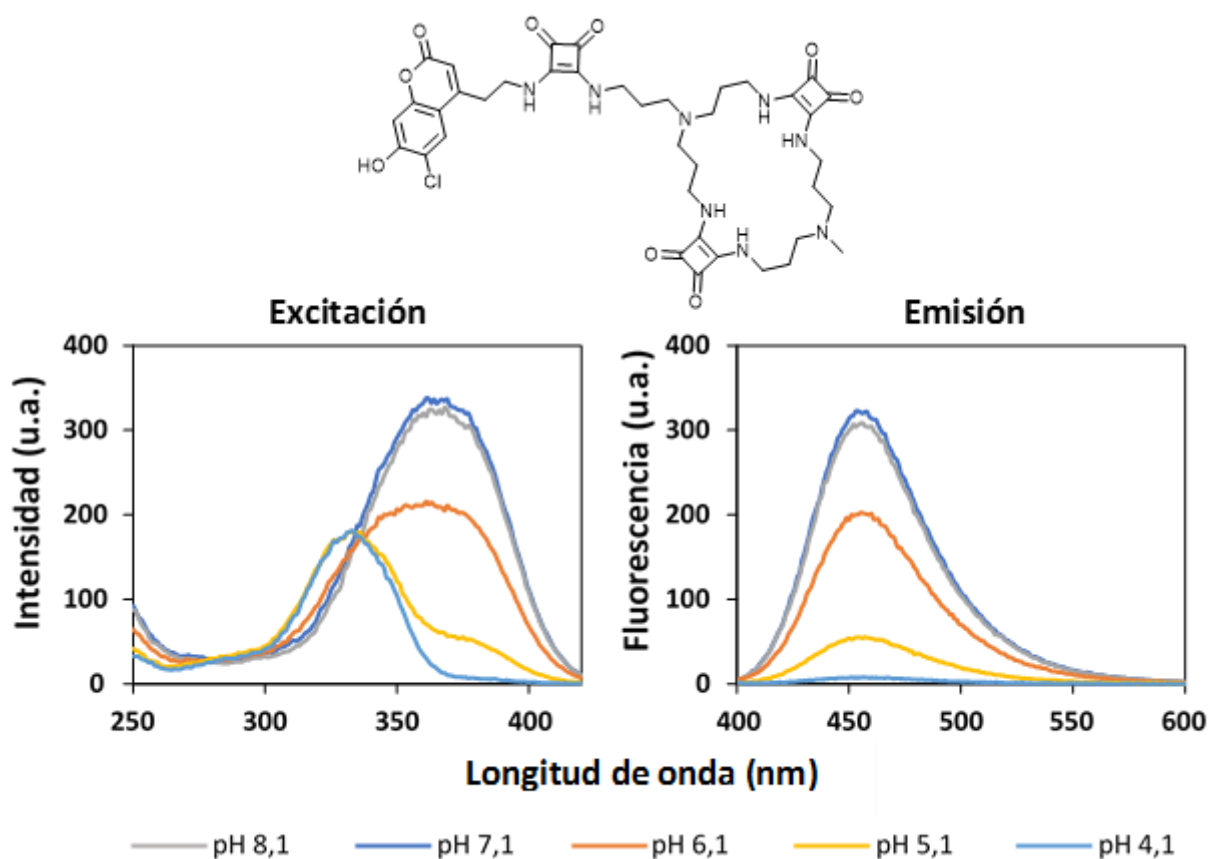


Figura 15. Espectros de excitación (izquierda) y emisión (derecha) del compuesto **16** a concentración 3,3 μM y a una amplitud de ventana espectral de 5. Los espectros de excitación se han obtenido excitando la muestra entre 250 nm y 450 nm y recogiendo la radiación emitida a 456 nm. Los espectros de emisión se han obtenido excitando la muestra a 375 nm y recogiendo la radiación emitida entre 400 y 600 nm.

Los rendimientos cuánticos relativos de los distintos compuestos se han obtenido en medio acuoso tamponado a pH 7,1 y con un 0,1% de DMSO, utilizando como patrón sulfato de quinina en ácido perclórico 0,1 M. Para ello se miden las absorbancias a 350 nm de cuatro disoluciones de cada compuesto con absorbancias máximas menores a 0,1 u.a. y tras ello se obtienen las integrales de sus espectros de emisión excitando a 350 nm. La representación de las integrales de los espectros de emisión frente a las absorbancias puede ajustarse a una recta cuya pendiente (**b**) permite el cálculo del rendimiento cuántico relativo a un patrón.⁵⁰

$$\phi_{\text{muestra}} = \phi_{\text{patrón}} \cdot \left(\frac{b_{\text{muestra}}}{b_{\text{patrón}}} \right)$$

⁵⁰ Würth, C.; Grabolle, M.; Pauli, J.; Spieles, M.; Resch-Genger, U.; Relative and absolute determination of fluorescence quantum yields of transparent samples, *Nature protocols*, **2013**, *8*, 1535-1550.

Tabla 1. Rendimientos cuánticos de los productos fluorescentes susceptibles de actuar como biomarcadores⁵¹.

	b	r²	φ
Sulfato de Quinina (V2,5)	68000 ± 3000	0,998	0,59 ⁵⁰
Cumarina (1b)	87000 ± 3000	0,999	0,75
Cumarina (20b)	112000 ± 8000	0,996	0,96
Sulfato de Quinina (V5)	1900000 ± 100000	0,994	0,59 ⁵⁰
Escuaramato (2)	266000 ± 7000	0,999	0,08
Ácido escuarámico (3)	200000 ± 20000	0,983	0,06
Escuaramida (5)	178000 ± 7000	0,997	0,05
Cicloescuaramida (16)	140000 ± 10000	0,993	0,04

La atenuación de la fluorescencia inducida por la presencia de la unidad escuaramida en la mayoría de los derivados obliga a registrar la fluorescencia del patrón a dos amplitudes distintas de la ventana espectral, puesto que la señal fluorescente generada por dichos derivados es difícilmente distinguible del ruido si se registran los espectros en las condiciones viables para las cumarinas **1b** y **20b** (ventana espectral 2,5 nm). De la misma manera, no es posible registrar la fluorescencia de estos dos compuestos en las condiciones óptimas para los derivados escuaramídicos (ventana espectral 5 nm) puesto que saturan el detector y la determinación carece de sentido. La necesidad de tener que registrar la fluorescencia del patrón a diferentes amplitudes de la ventana espectral ya permite intuir que las diferencias en los rendimientos cuánticos van a ser muy significativas. Los derivados escuaramídicos presentan rendimientos cuánticos inferiores a 0,1 en todos los casos, mientras que las cumarinas **1b** y **20b** superan la fluorescencia del patrón con valores de 0,75 y 0,96 respectivamente.

3.5. Evaluación de la capacidad de los compuestos sintetizados para actuar como marcadores fluorescentes

Un objetivo importante dentro del trabajo realizado consiste en la preparación de derivados escuaramídicos capaces de actuar como marcadores celulares fluorescentes. En este apartado se muestran los resultados obtenidos en los ensayos destinados a evaluar dicha capacidad. Por una parte, el Grupo de Biología Celular del Cáncer del *Institut d'Investigació de la Salut (IUNICS)*, ha comprobado la capacidad de algunos de los compuestos preparados en células embrionarias de riñón humano HEK293/VMAT2 mediante citometría de flujo. Por otra parte, el Dr. Francisco

⁵¹ "b" hace referencia a los valores de pendiente obtenidos y r^2 al coeficiente de correlación del ajuste lineal de la representación de las integrales del espectro de emisión frente a las absorbancias a 350 nm. En azul se representan los resultados obtenidos para el sulfato de quinina a dos amplitudes de ventana distintas (2,5 y 5).

Olmo, investigador del *London School of Hygiene & Tropical Medicine (LSHTM)* ha evaluado la capacidad de la cicloescuaramida (**16**) para penetrar y marcar parásitos de *Trypanosoma cruzi*, causantes de la enfermedad de Chagas.

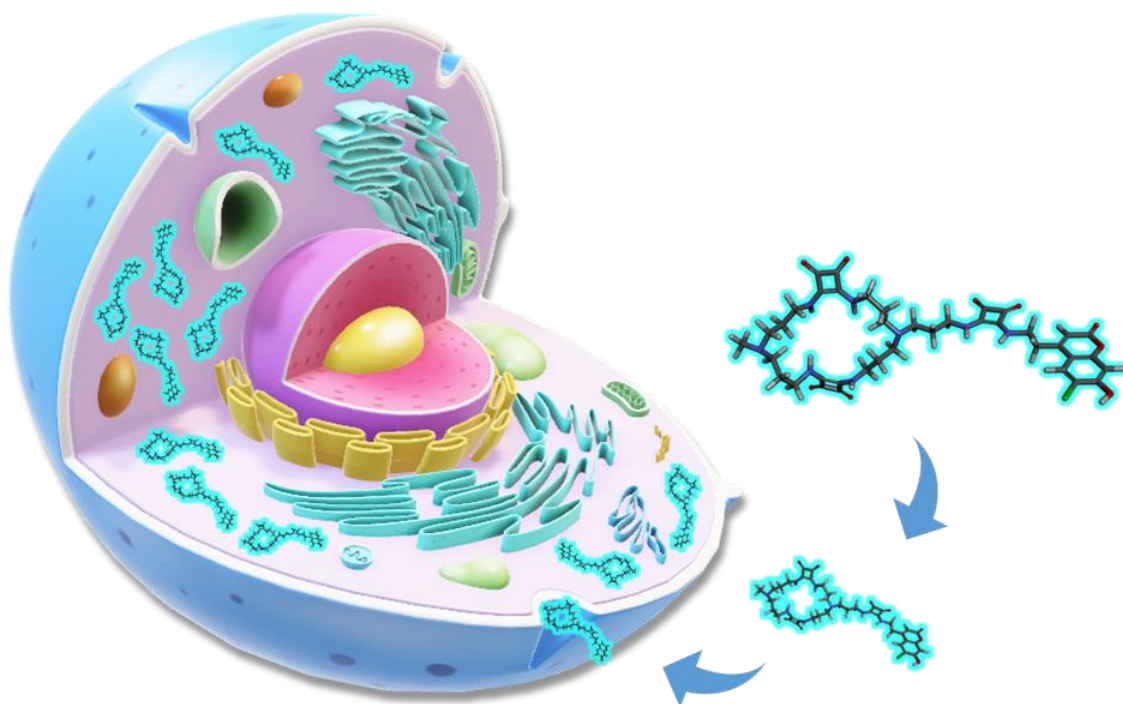


Figura 16. Representación de la penetración de la cicloescuaramida (**16**) en el interior de una célula eucariota.

Los estudios realizados en células HEK293/VMAT2 se han llevado a cabo mediante citometría de flujo. Con esta finalidad, la metodología seguida implica la siembra de 5000 células HEK293/VMAT2 en cada uno de los pozos de una placa de 96 pozos opaca y con el fondo transparente. Transcurridas 24 horas desde la siembra, se añaden los compuestos **1b**, **2**, **3**, **5**, **16** y **20b** a una concentración 20 μ M en PBS y se incuban durante media hora. Finalmente se renueva el medio de cultivo (PBS) y se procede a la lectura con el citómetro de flujo. Con ello se consigue eliminar la cantidad de compuesto fluorescente no internalizado y tan solo se contabiliza la fluorescencia del producto que ha sido capaz de penetrar en el interior de la célula.

Los resultados obtenidos (**Figura 17**) muestran que todos los compuestos estudiados son capaces de penetrar en las células HEK293/VMAT2, puesto que todos ellos presentan una fluorescencia significativamente mayor a la de las células no tratadas con ningún compuesto (UNT). Asimismo, se observa que la fluorescencia de las cumarinas **1b** y **20b**, que no contienen unidades escuaramida, es mayor que la de los derivados escuaramídicos de la cumarina **1b**, lo que parece indicar que dichas cumarinas sin conjugar son capaces de penetrar en las células por sí solas y las diferencias en la fluorescencia son debidas principalmente a las diferencias en los rendimientos cuánticos. Donde sí se observa diferencia en la capacidad de penetración celular

es entre las cumarinas **1b** y **20b** puesto que la primera presenta una mayor fluorescencia en citometría de flujo pese a tener un rendimiento cuántico menor. En este sentido, resultaría interesante reproducir el experimento en varias líneas celulares para determinar si se repiten los resultados obtenidos con la línea celular HEK293/VMAT2, o si, al contrario, la presencia de la unidad escuaramida juega un papel determinante en la internalización celular, hecho que no resulta evidente con estos resultados.

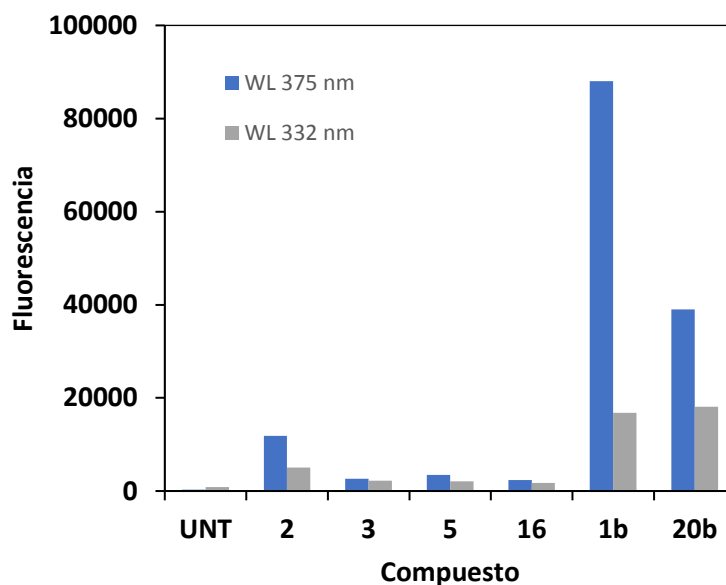
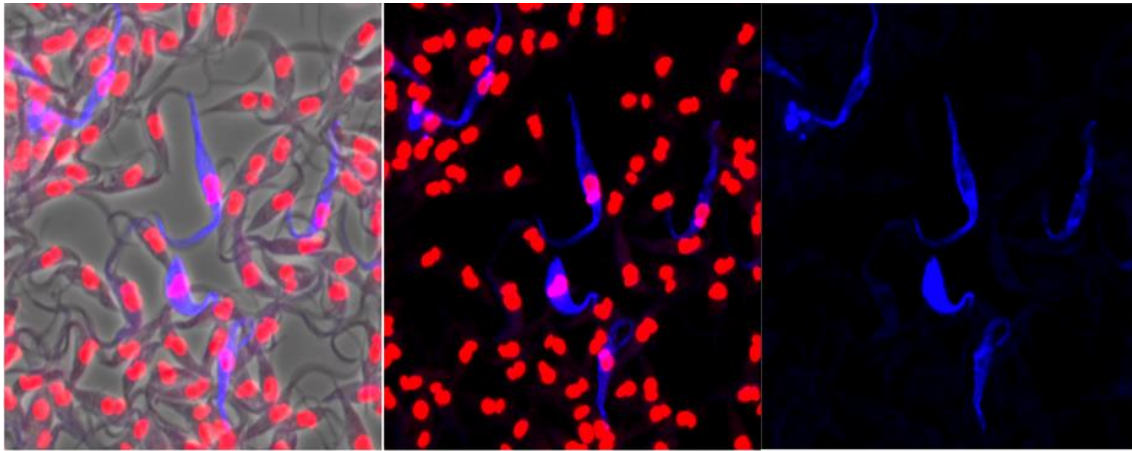


Figura 17. Resultados de la citometría de flujo que indican la presencia de biomarcadores en las células tratadas. UNT hace referencia a las células control no tratadas y WL hace referencia a las longitudes de excitación utilizadas.

En cuanto a los estudios llevados a cabo sobre parásitos de *Trypanosoma cruzi*, la incubación de los parásitos con un medio que presenta una concentración de 50 μM de la cicloescuaramida (**16**) durante una hora, permite obtener imágenes de microscopía confocal que atestiguan la internalización del compuesto por parte de los parásitos (**Figura 18**). No obstante, pese a que se observa el marcaje de algunos epimastigotes en el canal azul, la comparación con los canales azul y rojo superpuestos, donde el yoduro de propidio marca en rojo los núcleos de los parásitos, permite ver que la proporción de parásitos marcados en azul es significativamente baja. En este caso, resultaría interesante estudiar la internalización de otros conjugados cicloescuaramida por parte de los parásitos de *Trypanosoma Cruzii*, para determinar si la baja tasa de marcaje se debe a que no se produce una internalización significativa del compuesto, o a que el rendimiento cuántico del mismo es demasiado bajo y requiere de elevadas concentraciones y largos tiempos

de exposición para que la acumulación del conjugado genere una respuesta fluorescente significativa.



Fase
Yoduro de propidio
Canal Azul

Yoduro de propidio
Canal Azul

Canal Azul

Figura 18. Imágenes obtenidas por microscopía confocal tras tratar Epimastigotes de Trypanosoma Cruzi con cicloescuaramida (16) a concentración 50 μ M durante una hora.

4. Conclusiones

El primer objetivo planteado para este trabajo de final de máster consistía en la preparación de derivados escuaramídicos lineales de la cumarina FFN102. Dicho objetivo se ha cumplido con la síntesis de los diferentes derivados del ácido escuárico (**2**), (**3**), (**4**) y (**5**). Por otra parte, la obtención de derivados cicloescuaramídicos de la cumarina FFN102, se ha visto limitada a la obtención de un único derivado. Éste se ha preparado a través de la unión entre una cicloescuaramida C2 y la cumarina FFN102 mediante una escuaramida. En todos los derivados escuaramídicos preparados se observa un efecto de atenuación de la fluorescencia, probablemente debido a una transferencia electrónica fotoinducida en la que el anillo escuaramídico podría actuar como dador de electrones.

Finalmente, la evaluación de la capacidad de los compuestos sintetizados para actuar como biomarcadores requiere estudios adicionales para concretar dicha capacidad. No obstante, todos los compuestos testados sobre células HEK293/VMAT2 demuestran tener capacidad de penetración de la membrana celular pero las cumarinas sin conjugar muestran una fluorescencia unas diez veces superior en el interior de la célula. Ello demuestra que, para esta línea celular concreta, la introducción de la unidad escuaramida no aportaría ventajas en el proceso de internalización, o al menos, éstas se verían compensadas por la diferencia de rendimientos cuánticos. Sería interesante comparar los resultados obtenidos con nuevos experimentos en distintas líneas celulares para determinar si el comportamiento observado se hace extensivo a las otras líneas o si por el contrario, los derivados escuaramídicos muestran una mayor permeabilidad celular. En cuanto a la capacidad de la cicloescuaramida (**16**) para actuar como biomarcador del parásito *Trypanosoma cruzi*, se observa que ésta es capaz de penetrar en el interior del parásito pero requiere concentraciones y tiempos de exposición elevados, sin llegar a alcanzar resultados completamente satisfactorios.

5. Parte experimental

5.1. Información general

Todos los reactivos se han adquirido comercialmente y se han utilizado sin purificación previa. Los espectros de masas se han registrado con un espectrómetro de masas de alta resolución (HRMS) ThermoFisher (Orbitrap, QExactive), provisto de una entrada de muestra por electrospray (ESI). Los espectros de RMN (^1H , ^{13}C) se han registrado en un instrumento Bruker AVANCE-300 en DMSO-*d*6 o CDCl_3 . Los desplazamientos químicos (δ) están expresados en ppm i están referenciados a la señal residual del disolvente. Las síntesis asistidas por microondas se han llevado a cabo en viales de 0,5-2 mL con un reactor Biotage Initiator (potencia aplicable de 0-400W con incrementos de 1W, sensor de temperatura por IR, rango de presiones de 0-20 bar). La determinación de valores de pH se ha realizado mediante un pH-metro Mettler SevenCompact™. Los espectros de absorción de UV-Vis se han registrado en un espectrofotómetro Varian Cary 300Bio y los de fluorescencia en un espectrofluorímetro Varian Cary Eclipse.

5.2. Preparación de los fluoróforos y derivados

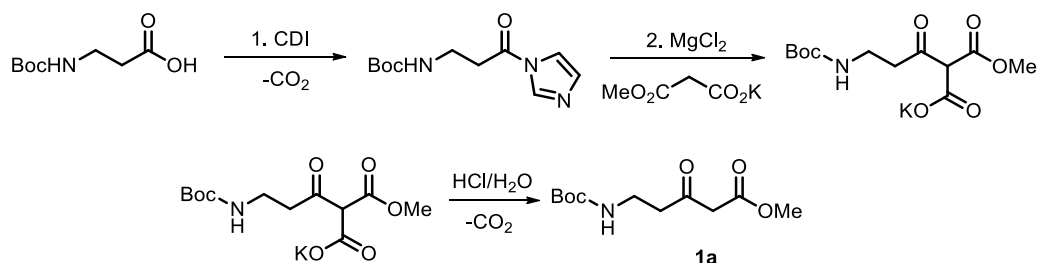
5.2.1. Preparación del 5-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-oxopentanoato de metilo (**1a**)⁵²

Una disolución de N-Boc- β -Alanina (2,370 g, 12,53 mmol) disuelta en THF anhidro (20 mL) y en atmósfera inerte, se adiciona gota a gota sobre una suspensión de 1,1-carbonildiimidazol (2,430 g, 14,99 mmol) en THF anhidro (30 mL). Se mantiene en agitación durante cuatro horas y se obtiene una disolución de color amarillo pálido. Se añade cloruro de magnesio (II) (1,190 g, 12,50 mmol) y 3-metoxi-3-oxopropanoato de potasio (3,900 g, 24,97 mmol) sólido mediante una espátula. Después de purgar el sistema con argón para mantener la atmósfera inerte, se obtiene una suspensión que se mantiene en agitación vigorosa y a temperatura ambiente durante toda la noche.

Al día siguiente la mezcla aparece como una suspensión blanquecina. La adición de agua (25 mL) y ácido clorhídrico 1 M (15 mL) detiene la reacción y permite la descarboxilación del compuesto de adición intermedio dando lugar a una disolución completa. La mezcla resultante se extrae tres veces con 100 mL de acetato de etilo (AcOEt). Una vez reunida la fase orgánica, ésta se lava una vez con 30 mL de ácido clorhídrico 1 M para eliminar restos de imidazol. La disolución orgánica resultante se trata con una disolución saturada de cloruro sódico "brine" y

⁵² Kong, C.; Jana, N.; Jones, C.; Driver, R. G.; Control of the Chemoselectivity of Metal N-Aryl Nitrene Reactivity: C-H bond amination versus electrocyclization. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 13271-13280.

seguidamente con sulfato sódico anhidro para eliminar restos de agua. Finalmente se elimina el disolvente a vacío en un evaporador rotativo y se seca. El producto final (**1a**) es un aceite amarillo que se obtiene con un 51% de rendimiento aislado (1,736 g).

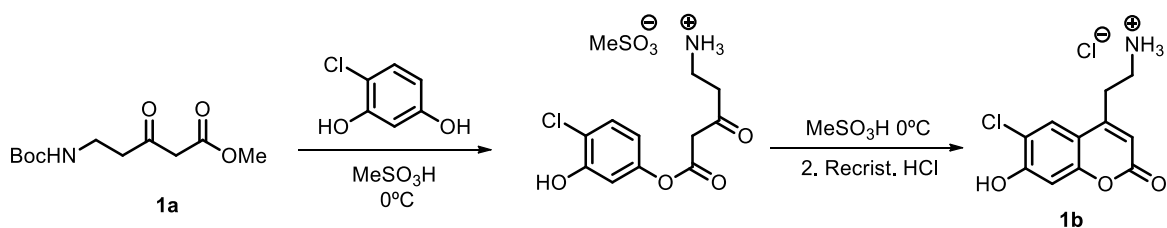


Esquema 12. Obtención del β -cetoéster (**1a**).

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , ppm) δ 1,43 (s, 9H); 2,78 (t, $J = 6,0$ Hz; 2H); 3,35-3,41 (q, $J = 6,0$ Hz, 2H); 3,47 (s, 2H); 3,74 (s, 3H); 4,96 (br, 1H).

5.2.2. Preparación del cloruro de 2-(6-cloro-7-hidroxi-2-oxo-2H-cumarin-4-ilo)etanamónio (**1b**)

En un matraz de fondo redondo se mezcla el cetoéster (**1a**) (1,736 g, 7,07 mmol) y 4-cloro-resorcinol (1,533 g, 10,62 mmol) y se añaden 11,5 mL de ácido mesílico (176,94 mmol). La mezcla se mantiene en agitación en un baño de hielo durante 3 horas. Pasado ese tiempo se añaden 90 mL de éter dietílico frío, con lo que tiene lugar la precipitación de un aceite rosáceo en el fondo del matraz. El aceite se lava con más éter dietílico frío y se trata con ácido clorhídrico 1 M para transformar la amina en el clorhidrato correspondiente. El producto cristaliza como pequeñas agujas de color rosa con un 17% de rendimiento (298 mg).

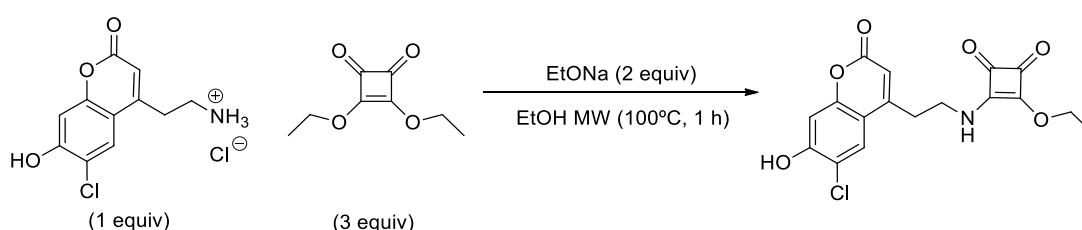


Esquema 13. Obtención de la cumarina (**1b**)

$^1\text{H NMR}$ (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). $^{13}\text{C NMR}$ (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 (+)** $[\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{ClNO}_3]^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+= 240,0422$; experimental 240,0415 $[\text{M}+\text{H}]^+$ y 262,0242 $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

5.2.3. Síntesis de 3-((2-(6-cloro-7-hidroxi-2-oxo-2H-cumarin-4-ilo)etil)amino)-4-etoxiciclobut-3-en-1,2-diona (2)

En un vial de microondas de 0,5-2 mL se añade la cumarina (**1a**) (104 mg, 0,38 mmol), escuarato de dietilo (196 mg, 1,15 mmol), etóxido sódico (54 mg, 0,96 mmol) y 2 mL de etanol absoluto. Tras sellar el vial éste se mantiene en el reactor a microondas durante una hora a 100°C. La mezcla resultante presenta un sólido de color beige separable del resto por centrifugación. Dicho sólido se lava con éter dietílico, ácido clorhídrico 1 M y con agua tras sucesivas centrifugaciones. Finalmente, el producto deseado se obtiene como un sólido beige con un rendimiento del 80% (109 mg, 0,30 mmol).

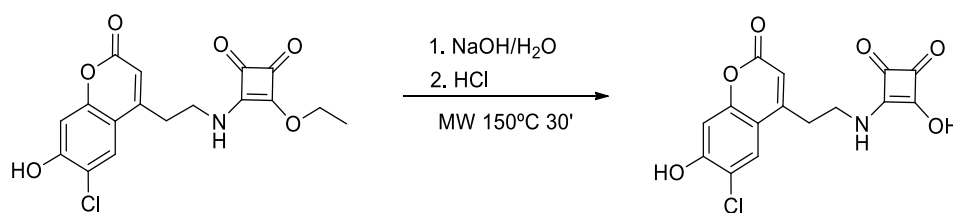


Esquema 14. Obtención del escuaramato (2)

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO, ppm) δ 1,24-1,37 (dt, $J = 6,0\text{Hz}$, 3H); 3,00 (t, $J = 6,0\text{Hz}$, 2H); 3,55-3,77 (dq, $J = 6,0\text{Hz}$, 2H); 4,51-4,65 (dq, $J = 6\text{Hz}$, 2H); 6,19 (s, 1H); 6,91 (s, 1H); 7,85 (s, 1H); 8,63 (t, 0,4H); 8,83 (t, 0,6H); 11,39 (br s, 1H). $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, DMSO, ppm) δ 15,4; 32,4; 43,0; 68,9; 103,6; 112,0; 117,2; 125,9; 152,6; 153,4; 156,4; 159,7; 172,4; 174,6; 182,2; 188,9. **HRMS ESI(-)**, calculada para $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{ClNO}_6$ [M] = 363,0510; experimental 362,0439 para [M] $^-$.

5.2.4. Síntesis de 3-((2-(6-cloro-7-hidroxi-2-oxo-2H-cumarin-4-il)etil)amino)-4-hidroxiciclobuten-3-en-1,2-diona (3)

En un vial de microondas de 0,5-2 mL se añade semiéster (**xx**) (40 mg, 0,11 mmol), 150 μL de NaOH 1 M y 2 mL de agua. La reacción se lleva a cabo en un reactor de microondas a 150°C durante 30 minutos. Se obtiene un precipitado amarillo y un sobrenadante naranja. Se centrifuga para separarlos y el sobrenadante se acidifica con HCl 1 M dando lugar a un precipitado amarillo. Éste último se lava con agua fría y se recupera el sólido por centrifugación con un rendimiento del 62% (23 mg, 0,07 mmol).

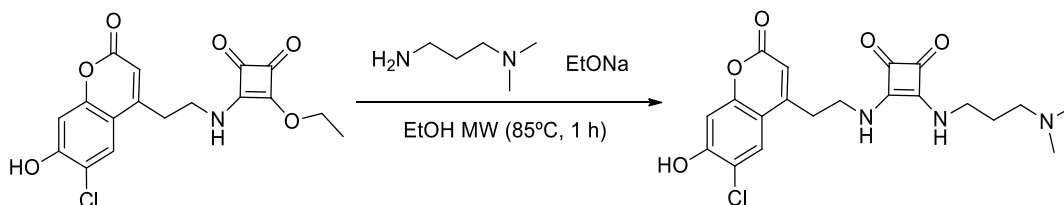


Esquema 15. Obtención del ácido escuarámico (**3**)

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO, ppm) δ 3,00 (t, $J = 6,5\text{Hz}$, 2H); 3,68-3,66 (q, $J = 6,3\text{Hz}$, 2H); 6,18 (s, 1H); 6,90 (s, 1H); 7,88 (s, 1H); 8,41 (t, 1H); 11,38 (br s, 1H). **$^{13}\text{C NMR}$** (75 MHz, DMSO, ppm) δ 32,6; 42,4; 69,0; 103,5; 112,0; 117,1; 125,9; 152,8; 152,4; 156,3; 159,8; 173,8; 184,8. **HRMS ESI(-)**, calculada per a $\text{C}_{15}\text{H}_9\text{ClNO}_5$ [M] $^-$ 334,0124; experimental 334,0119 [M] $^-$.

5.2.5. Síntesis del 3-((2-(6-cloro-7-hidroxi-2-oxo-2H-cumarin-4-il)etil)amino)-4-((3-(dimetilamino)propil)amino)ciclobut-3-en-1,2-diona (**5**)

En un vial de microondas de 0,5-2 mL se introducen el semiéster (**2**) (43 mg, 0,16 mmol), N,N-dimetilpropil-1,3-diamina (25 mg, 0,25 mmol), etóxido sódico (9 mg, 0,16 mmol) y 2 mL de etanol absoluto. Tras sellar el vial éste se mantiene en el reactor a microondas durante una hora a 85°C. La mezcla resultante presenta un precipitado amarillo separable del resto por centrifugación. Dicho sólido se lava con ácido clorhídrico 1 M y con agua tras sucesivas centrifugaciones. Finalmente, el producto deseado se obtiene como un sólido blanco con un rendimiento del 64% (37 mg, 0,10 mmol).



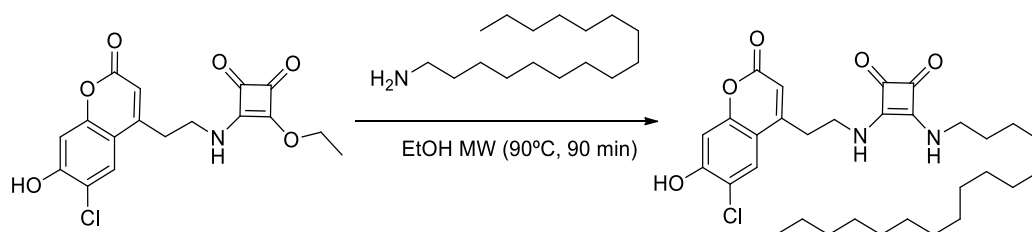
Esquema 16. Obtención de la escuaramida (**5**)

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO, ppm) δ 1,92 (s, 2H); 2,88 (s, 6H); 3,07-3,10 (t, $J = 4,5\text{ Hz}$, 4H); 3,53 (s, 2H); 3,93 (s, 2H); 6,07 (s, 1H); 6,54 (s, 1H); 7,72 (s, 1H). **$^{13}\text{C NMR}$** (75 MHz, DMSO, ppm) δ 26,6; 33,1; 43,0; 54,6; 103,6; 111,4; 117,5; 125,9; 153,0; 157,2; 168,0; 182,3. **HRMS ESI(-)**, calculada para $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{ClN}_3\text{O}_5$ [M] $^-$ = 418,1175; experimental 418,1173.

5.2.6. Síntesis de 3-((2-(6-cloro-7-hidroxi-2-oxo-2H-cumarin-4-il)etil)amino)-4-(hexadecilamino)ciclobut-3-en-1,2-diona (**4**)

En un vial de microondas de 0,5-2 mL se introduce el semiéster (**2**) (50 mg, 0,14 mmol), hexadecilamina (102 mg, 0,34 mmol) y 2 mL de etanol absoluto. Tras sellar el vial éste se

mantiene en el reactor a microondas durante noventa minutos a 90°C. La mezcla resultante presenta un sólido separable por centrifugación. Tras lavar con éter dietílico y con ácido clorhídrico 1 M, se obtiene el producto deseado como un sólido blanco con un 77% de rendimiento (60 mg, 0,11 mmol)



Esquema 17. Obtención de la escuaramida (4)

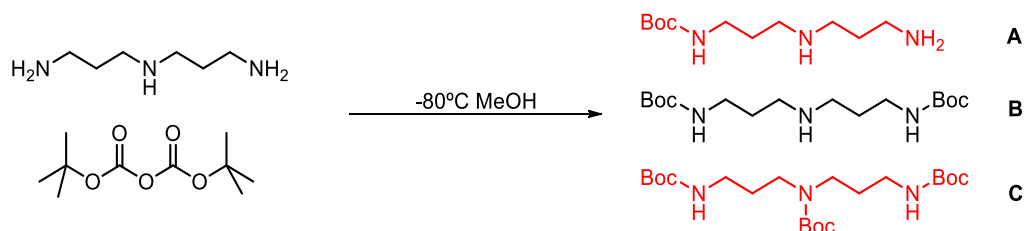
$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO, ppm) δ 0,84 (t, $J = 6,9\text{Hz}$, 3,9H); 1,22 (t, $J = 6,0\text{Hz}$, 32,5H); 3,02 (t, $J = 6,0\text{ Hz}$, 2H); 3,77-3,79 (q, $J = 5,7\text{ Hz}$, 2H); 6,19 (s, 1H); 6,90 (s, 1H); 7,39 (br s, 1H); 7,93 (s, 1H); 11,39 (s, 1H). $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, DMSO, ppm) δ 13,9; 22,0; 25,7; 29,0; 42,2; 43,2; 103,4; 111,7; 112,0; 117,1; 126,0; 153,3; 156,3; 159,6; 182,2. **HRMS ESI(-)**, calculada para $\text{C}_{31}\text{H}_{42}\text{ClN}_2\text{O}_5$ [M] $^-$ 557,2788 uma; experimental 557,2789 uma para [M] $^-$.

5.2.7. Preparación de di-tert-butil(azadiilobis(propano-3-1-diil)dicarbamato (7)⁵³

Una disolución de anhídrido t-butoxicarbonílico (64 mmol, 13,893 g en 25 mL de metanol) se adiciona gota a gota sobre 25 mL de una disolución de norespermidina (5,035 g; 38 mmol) en un baño de acetato de etilo y nitrógeno líquido a -80°C. Tras una hora de reacción, se deja atemperar y se evapora el disolvente a vacío sin utilizar calor. El producto resultante se disuelve en diclorometano (600 mL) y se lava con una disolución de NaOH diluida en agua para extraer la amina que no ha reaccionado. En este momento la fase orgánica contiene los productos resultantes de la monoprotección (A), diprotección (B) y tripotección (C) de los grupos amina. La fase orgánica se extrae tres veces con una disolución acuosa de pH 7 para eliminar el producto de monoprotección (A). Para la separación de los productos dibocprotegido (B) y tribocprotegido (C) se lava tres veces la fase orgánica con una disolución acuosa de pH 2. De esta manera la fase acuosa resultante contiene el producto dibocprotegido (B) que puede extraerse basificando hasta pH 11 y lavando tres veces con diclorometano. La fase orgánica resultante de esta extracción se seca con "brine" y sulfato sódico anhidro y el disolvente se evapora a vacío

⁵³ Konai, M. M.; Ghosh, C.; Yarlagaadda, V.; Samaddar, S.; Haldar, J.; Membrane Active Phenylalanine Conjugated Lipophilic Norspermidine Derivatives with Selective Antibacterial Activity, *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 9409-9423.

para rendir la triamina dibocprotegida (**B**) como un aceite incoloro con un 28% de rendimiento (10,6 mmol, 3,5 g).

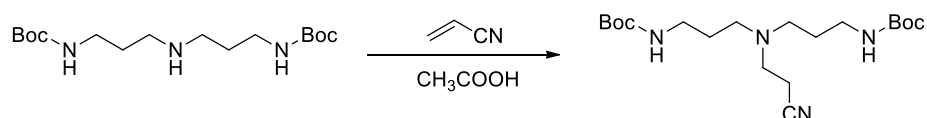


Esquema 18. Obtención de la amina (**7**)

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , ppm) δ 1,43 (s, 18,9H); 1,64 (m, $J = 6,3\text{Hz}$, 4,9H); 2,65 (t, $J = 6,6\text{ Hz}$, 4H); 3,17-3,23 (q, $J = 5,7\text{ Hz}$, 4,6H); 5,17 (s br, 1,5H). **HRMS ESI(+)**, calculada para $\text{C}_{16}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+ = 332,2544$; experimental 332,2542.

5.2.8. Preparación de di-tert-butil-(((2-cianoetil)azanodiil)bis(propano-3-1-diil)dicarbamato (**8**))

En un matraz de reacción se introducen 1,004 g de la amina (**7**) (3,0 mmol), 15 mL de acrilonitrilo (229 mmol) y 340 μL de ácido acético (6 mmol) y se mantiene a reflujo durante 24 horas. Pasado ese tiempo se evapora el disolvente a vacío y se obtiene un aceite de color rojizo. A continuación, se disuelve el aceite en 10 mL de cloroformo y se vierten sobre 4 mL de amoníaco acuoso concentrado. La fase orgánica se extrae y se lava tres veces con agua, y tras ello se seca con "brine" y sulfato sódico anhidro. La eliminación del disolvente rinde el producto deseado como un aceite rojizo con un 63% de rendimiento (660 mg, 1,9 mmol).



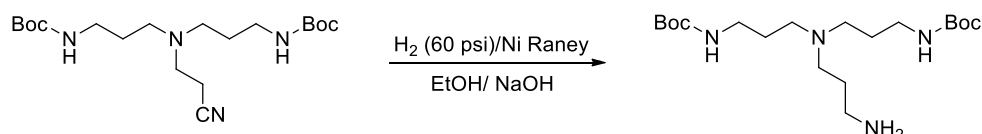
Esquema 19. Obtención del nitrilo (**8**)

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , ppm) δ 1,44 (s, 18,0H); 1,62-1,69 (quintuplete, $J = 6,6\text{Hz}$, 4,4H); 2,42-2,51(t, $J = 3,6\text{Hz}$, 5,9H); 2,74-2,79 (t, $J = 6,6\text{ Hz}$, 1,7H); 2,84-2,89 (t, $J = 6,6\text{ Hz}$, 0,7H); 3,15-3,22 (q, $J = 6,6\text{ Hz}$, 4H); 4,95 (br s, 1,5H). **HRMS ESI(+)**, calculada para $\text{C}_{19}\text{H}_{36}\text{N}_4\text{O}_4^+$ $[\text{MH}]^+ = 385,2809$; experimental 385,2816 para $[\text{MH}]^+$ y 407,2636 para $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

5.2.9. Preparación de di-tert-butil(((3-aminopropil)azanodiil)bis(propano-3-1-diil)dicarbamato (**9**))

El nitrilo (**8**) (1,064 g, 3,05 mmol) se disuelve en 20 mL de una disolución de NaOH (0,500 g, 12,5 mmol) en etanol y se introduce en un frasco hidrogenador junto con 3,188 g del catalizador Ni

Raney. La mezcla se purga con hidrógeno tres veces y se hidrogena a 60 psi durante 24 horas. La mezcla resultante se filtra a vacío a través de Celita® 521 y se lava con abundante etanol acuoso (95:5). El filtrado se diluye con 5 mL de agua y se elimina el etanol a presión reducida. El resto acuoso se lava tres veces con diclorometano extrayendo el producto en la fase orgánica, que se seca con “brine” y sulfato sódico anhidro. La evaporación a vacío del disolvente da lugar a la amina deseada como un líquido ligeramente amarillo con un 63% de rendimiento (0,672 g, 1,73 mmol).

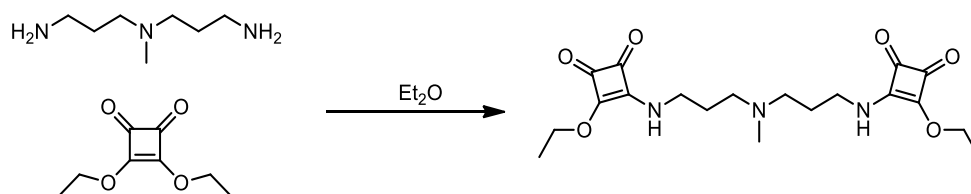


Esquema 20. Preparación de la amina (9)

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , ppm) δ 1,44 (s, 18H); 1,57-1,65 (quintuplete, $J = 2,7$ Hz, 10,8 H); 2,41-2,45 (t, $J = 6,3$ Hz, 5,9H); 2,72-2,77 (t, $J = 6,6$ Hz, 2,2H); 3,13-3,20 (q, $J = 6,3$ Hz, 4,0 H). **HRMS ESI(+)**, calculada para $\text{C}_{19}\text{H}_{41}\text{N}_4\text{O}_4^+$ $[\text{MH}]^+ = 389,3122$; experimental 389,3123 para $[\text{MH}]^+$

5.2.10. Preparación de 4,4'-(((metilazanodiil)bis)propano-3,1-diil)bis(azanodiil) bis-3-etoxiciclobut-3-en-1,2-diona (**13**)⁵⁴

Una disolución de N^1 -(3-aminopropil)- N^1 -metilpropan-1,3-diamina (1,100 g, 7,57 mmol) en éter dietílico (90 mL) se adiciona gota a gota sobre una disolución de escuarato de etilo (3,338 g, 19,62 mmol) en éter dietílico (50 mL) y se mantiene a temperatura ambiente y en agitación durante un día. La mezcla contiene un precipitado de color amarillo pálido que puede recuperarse por filtración. El lavado con éter dietílico permite obtener el producto puro con un 74% de rendimiento (2,197 g, 5,58 mmol).



Esquema 21. Obtención del semiéster (**13**)

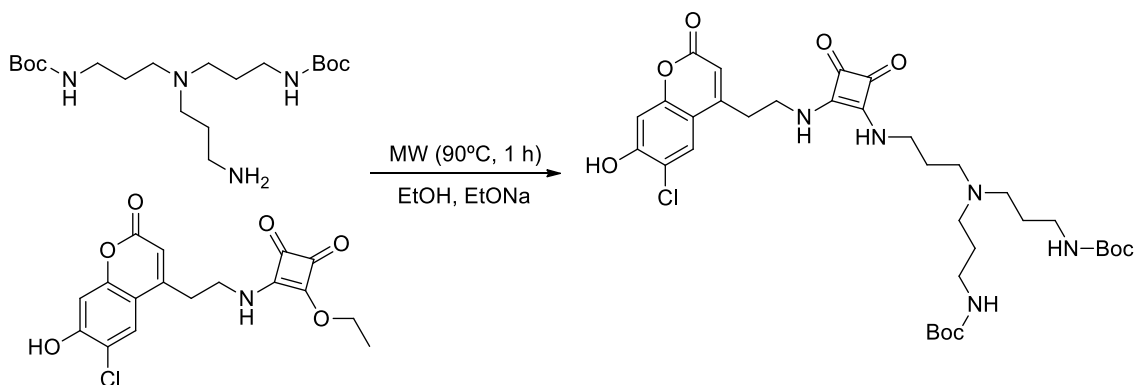
$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , ppm) δ 1,44 (m, 6H); 1,80 (s, 4H); 2,22 (s, 3H); 2,52 (s, 4H); 2,52 (s, 3H); 3,71 (br s, 1H); 4,71 (m, 4H); 7,11 (br s, 0,6H); 7,85 (br, s, 0,8H); 8,15 (br, s, 0,6H). $^{13}\text{C NMR}$ (75

⁵⁴ 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.

MHz, DMSO, ppm) δ 16,4; 27,8; 42,0; 44,3; 56,2; 70,2; 173,1; 177,9; 183,5; 190,2. **HRMS ESI(+)**, calculada para $C_{19}H_{27}N_3O_6$ [M]=393,1900; experimental 394,1973 para $[MH]^+$ y 416,1790 para $[M+Na]^+$.

5.2.11. Síntesis de di-tert-butil-(((3-((2-((2-(6-cloro-7-hidroxi-2-oxo-2H-cumarin-4-il)etil)amino)-3,4-dioxociclobut-1-ene-1-il)amino) propilazanodiil)bis(propa no-3,1-diil)dicarbamato (**14**)

En un vial de microondas de 0,5-2 mL se añade el semiéster (**2**) (213 mg, 0,56 mmol), amina (**9**) (290 mg, 0,75 mmol), etóxido sódico (32 mg, 0,56 mmol) y 2 mL de etanol absoluto. Tras sellar el vial éste se mantiene en el reactor a microondas durante una hora a 90°C. La mezcla resultante presenta un precipitado amarillo separable por centrifugación. Tras el lavado con etanol y el secado del precipitado se obtiene el producto deseado como un sólido amarillo con un rendimiento del 46% (192 mg, 0,56 mmol).

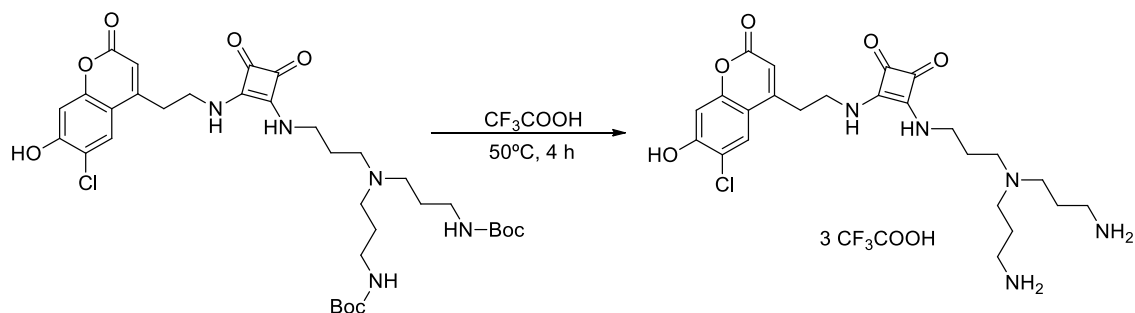


Esquema 22. Obtención de la escuaramida (**14**)

1H NMR (300 MHz, DMSO, ppm) δ 1,35 (s, 9,9H); 1,44-1,48 (multiplete, $J = 6,6$ Hz, 1,7H); 2,31 (t, $J = 6,5$ Hz, 3,3H); 2,89-2,92 (q, $J = 6,0$ Hz, 3,7H); 3,40-3,47 (q, $J = 7$ Hz, 4,0H), 5,89 (s, 0,9H); 6,51 (s, 0,7H); 6,78 (s, 1H); 7,59 (s, 0,8H) 7,72 (s, 1,0H). **HRMS ESI(+)**, calculada para $C_{35}H_{49}N_5O_9Cl$ $[MH]^+=706,3213$; experimental 706,3217 para $[MH]^+$ y 728,3033 para $[M+Na]^+$.

5.2.12. Síntesis de 3-((3-(bis(3-aminopropil)amino)propil)amino-4-((2-(6-cloro-7-hidroxi-2-oxo-2H-cumarin-4-il)etil)amino)ciclobut-3-en-1,2-diona. (**15**)

En un matraz de fondo redondo provisto de agitador magnético, se introducen 157 mg de la escuaramida (**14**) (0,23 mmol) y 1 mL de ácido trifluoroacético. La mezcla se mantiene a 50°C y con agitación durante 4 horas. La evaporación del ácido trifluoroacético da lugar al producto deseado como triple sal de trifluoroacetato con un 100% de rendimiento (188 mg, 0,23 mmol).

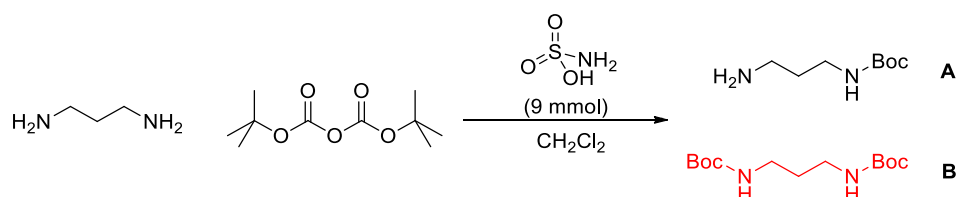


Esquema 23. Obtención de la escuaramida (15).

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO, ppm) δ 1,91 (br m, 3,3H); 2,87 (br m, 2,6H); 3,03 (br m, 2,4H); 3,14 (br m, 3,3H), 3,35 (br m, 3,8H); 6,19 (s, 1,2H); 6,92 (s, 1,0H); 7,82 (br s, 3,3H) 7,94 (s, 1,3H); 9,88 (br s, 1,1H); 11,47 (br s, 1,3H). **HRMS ESI(+)**, calculada para $\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{N}_5\text{O}_5\text{Cl}$ $[\text{MH}]^+ = 506,2165$; experimental 506,2168 para $[\text{MH}]^+$ y 528,1992 para $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

5.2.13. Preparación de tert-butil(3-aminopropil)carbamato (10)⁵⁵

Una disolución de anhídrido Boc (3798 mg, 17,4 mmol) en diclorometano (30 mL) se adiciona gota a gota sobre 30 mL de una disolución de 1,3-propandiamina (7,5 mL, 90 mmol) y ácido sulfámico (49 mg, 9 mmol) en diclorometano y en un baño de hielo. Tras la adición, se retira el baño de hielo y se mantiene la agitación durante 15 minutos adicionales. Tras ello se lava tres veces la fase orgánica con 20 mL de agua y se evapora el diclorometano a presión reducida. El aceite resultante se disuelve en 15 mL de agua, se ajusta a pH 3 y se extrae tres veces en éter dietílico para eliminar el producto resultante de la doble protección (B). A continuación, se basifica la fase acuosa hasta pH 12 y se extrae el producto monoprotegido (A) en fase orgánica con diclorometano. La evaporación a presión reducida del disolvente da lugar al producto deseado como un aceite incoloro con un 75% de rendimiento (2,263 g; 12,99 mmol).



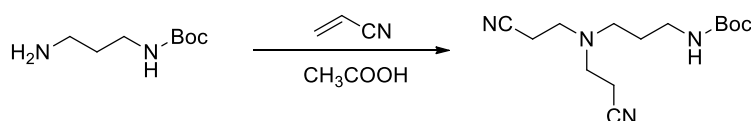
Esquema 24. Obtención de la amina (10)

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , ppm) δ 1,31 (br, 2H); 1,44 (s, 9,5H); 1,61 (m, $J = 6,3$ Hz, 2,3H); 2,76 (t, $J = 6,6$ Hz, 2,0H); 3,21 (q, $J = 6,0$ Hz, 2,0H); 4,88 (s br, 0,9H). $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3 , ppm) δ 28,6; 33,4; 38,6; 39,8; 79,3; 156,3.

⁵⁵ Ver información suplementaria de la referencia 14

5.2.14. Preparación de tert-butil(3-(bis(2-cianoetil)amino)propil)carbamato (**11**)⁵⁶

En un matraz de reacción se introducen 2,263 g de la amina (**10**) (12,99 mmol), 100 mL de acrilonitrilo (1527 mmol) y 1,5 mL de ácido acético (26 mmol). La mezcla se calienta a reflujo durante 24 horas. A continuación, se evapora el disolvente a vacío y se obtiene un aceite de color rojizo. El crudo de reacción se disuelve en 10 mL de cloroformo y se vierte sobre 4 mL de amoníaco acuoso concentrado. La fase orgánica se extrae y se lava tres veces con agua, y tras ello se seca con brine y sulfato sódico anhidro. La evaporación del disolvente rinde el producto deseado como un aceite rojizo con un 76% de rendimiento (2777 mg, 9,90 mmol).

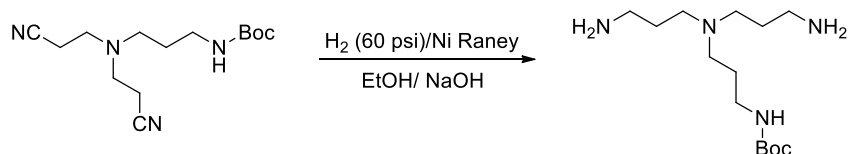
Esquema 25. Obtención del nitrilo (**11**)

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, ppm) δ 1,44 (s, 8,3H); 1,67 (m, *J* = 7,5 Hz, 2,0H); 2,49 (t, *J* = 6,6 Hz, 4H); 2,59 (t, *J* = 6,6 Hz, 1,9H); 2,86 (t, *J* = 6,9 Hz, 4H); 3,20 (q, *J* = 6,6 Hz, 1,9H); 4,74 (s br, 0,7 H). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃, ppm) δ 17,1; 28,1; 28,5; 38,6; 49,8; 51,1; 79,4; 118,7; 156,2. HRMS ESI(+), calculada para C₁₄H₂₄N₄O₂ [M]=280,1899; experimental 303,1791 para [M+Na]⁺.

5.2.15. Preparación de tert-butil(3-(bis(3-aminopropil)amino)propil)carbamato (**12**)⁵⁷

El nitrilo (**11**) (2,753 g, 9,82 mmol) se disuelve en 40 mL de una disolución de NaOH (1,000 g, 50 mmol) en etanol y se introduce en un frasco hidrogenador con 8,900 g del catalizador Ni Raney. La mezcla se purga con hidrógeno tres veces y se hidrogena a 60 psi durante 24 horas. La mezcla resultante se filtra a vacío con Celita® 521 y se lava con abundante etanol acuoso (95:5). El filtrado se diluye con 5 mL de agua y se elimina el etanol a presión reducida. El resto acuoso se lava tres veces con diclorometano extrayendo el producto en la fase orgánica, que se seca con “brine” y sulfato sódico anhidro. La evaporación a vacío del disolvente da lugar a la amina deseada como un líquido ligeramente amarillo con un 98% de rendimiento (2784 mg, 9,65 mmol).

⁵⁶ Ver información suplementaria de la referencia 14⁵⁷ Ver información suplementaria de la referencia 14

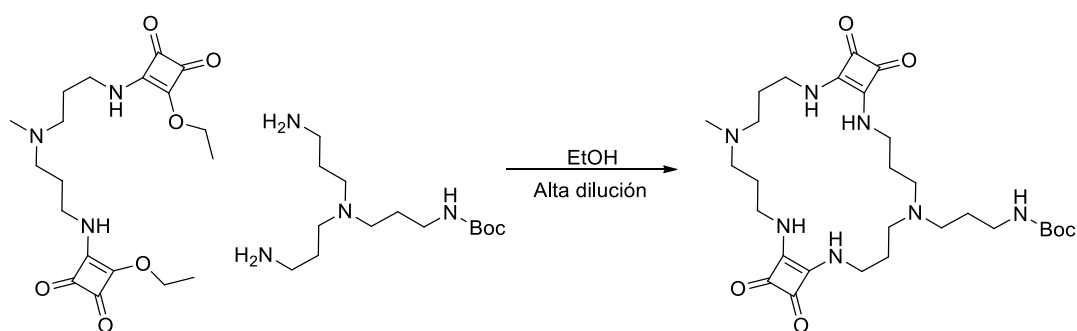


Esquema 26. Obtención de la amina (12)

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , ppm) δ 1,44 (s, 9,4H); 1,54-1,63 (quintuplet, $J = 6,9$ Hz, 6,0H); 2,43 (t, $J = 6,3$ Hz, 5,7H); 2,72 (t, $J = 6,9$ Hz, 3,7H); 3,17 (t, $J = 5,7$ Hz, 2,0H); 4,47 (br, 1H). $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3 , ppm) δ 27,0; 28,6; 30,9; 39,9; 40,7; 51,9; 52,7; 78,9; 156,2. **HRMS ESI(+)**, calculada para $\text{C}_{14}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{O}_2$ $[\text{M}] = 288,2525$; experimental 289,2597 para $[\text{M}+\text{H}]^+$

5.2.16. Síntesis de tert-butyl(3-(19-metil-12,13,25,26-tetraoxo-2,6,10,15,19,23-hexaazatriciclo[22.2.0.0^{11,14}]*hexacosa-1(24),11(14)-dien-6-il*)propil)carbamato (17).

Se pesan 366,3 mg de la amina (12) (1,27 mmol) y 500 mg del diéster (13) (1,27 mmol) y se disuelven separadamente en 10 mL de etanol absoluto cada uno. Cada una de las disoluciones se toma con una jeringuilla Hamilton y se coloca en una bomba Harvard. Se programa una adición gota a gota de 20 μL por minuto sobre 5 L de etanol de forma que la concentración de los reactivos oscile entre 0,5 μM en el primer minuto hasta 0,25 mM al final de la adición. Tras 72 horas, se obtiene un precipitado que puede separarse por centrifugación. El producto se lava con etanol absoluto para eliminar restos de reactivos de partida y tras el secado a vacío se obtiene el macrociclo deseado con un rendimiento del 45% (336 mg, 0,57 mmol).

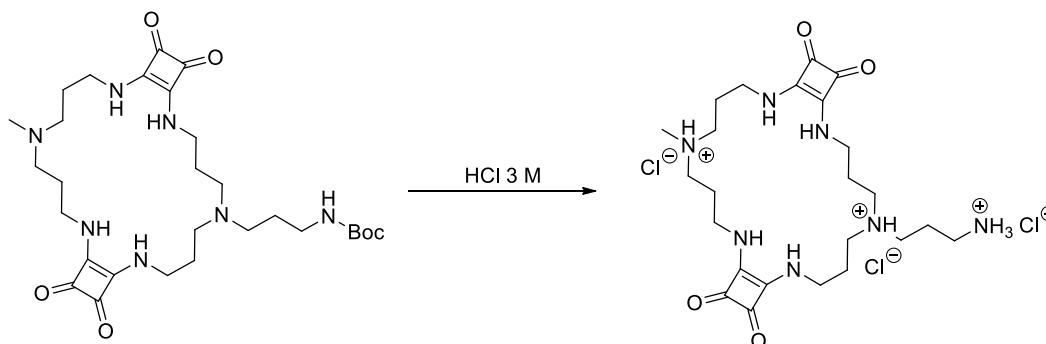


Esquema 27. Obtención del macrociclo (17)

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO, ppm) δ 1,37 (s, 9,0H); 1,46-1,51 (m, $J = 6,3$ Hz, 2,2H); 1,61-1,63 (q, $J = 6,0$ Hz, 8,1H); 2,12 (s, 3,0H); 2,32 (t, $J = 6,6$ Hz, 5,3H). 2,40 (t, $J = 7,5$ Hz, 5,0H) 2,91-2,93 (q, $J = 5,9$ Hz, 2,1H); 7,25 (s, 2,1H). $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, DMSO, ppm) δ 18,59; 26,68; 28,30; 50,27; 53,90; 56,05; 77,40; 155,63; 167,84; 182,35. **HRMS ESI(+)**, calculada para $\text{C}_{29}\text{H}_{47}\text{N}_7\text{O}_6$ $[\text{MH}]^+ = 590,3661$; experimental 590,3663 para $[\text{M}+\text{H}]^+$, 295,6870 para $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ ($z = 2$) y 612,3482 para $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

5.2.17. Síntesis de 6-(3-aminopropil)-19-metil-2,6-10,15,19,23-hexaazatriciclo[22.2.0.0^{11,14}]hexacosa-1(24),11(14)-dieno-12,13,25,26-tetraona (**18**)

Disolvemos 336 mg del macrociclo (**14**) (0,57 mmol) en 8 mL de HCl 3 M y lo mantenemos en agitación y a 50°C durante 4 horas. Pasado ese tiempo se evapora el disolvente y se seca a vacío sobre pentóxido de fósforo. Se obtiene un sólido amarillento de apariencia escamosa que se corresponde con el clorhidrato del producto deseado (100% rendimiento, 340 mg, 0,57 mmol).

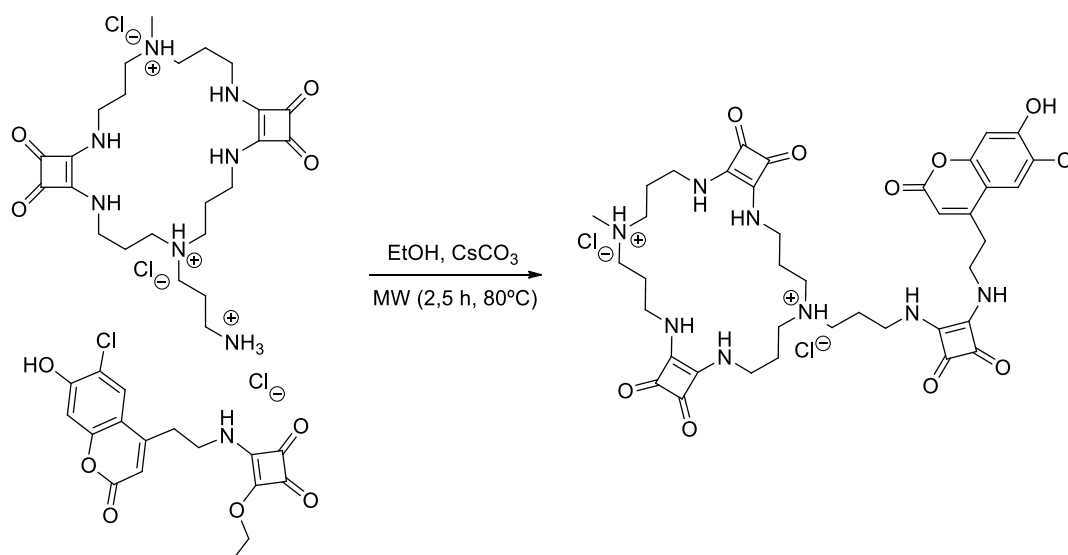


Esquema 28. Obtención del macrociclo (**18**)

¹H NMR (600 MHz, DMSO, ppm) δ 1,46-1,51 (m, *J* = 6,3 Hz, 2,2H); 1,61-1,63 (q, *J* = 6,0 Hz, 8,1H); 2,12 (s, 3,0H); 2,32 (t, *J* = 6,6 Hz, 5,3H). 2,40 (t, *J* = 7,5 Hz, 5,0H) 2,91-2,93 (q, *J* = 5,9 Hz, 2,1H); 7,25 (s, 2,1H). ¹³C NMR (150 MHz, DMSO, ppm) δ 21,1; 24,8; 25,2; 36,2; 48,2; 49,9; 53,0; 168,1; 182,4. HRMS ESI(-), calculada para C₂₄H₃₉N₇O₄ [M+³⁵Cl]⁻ = 524,2747; experimental 524,2757.

5.2.18. Síntesis de 6-(3-((2-((2-(6-cloro-7-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-4-il)etil)amino)-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)amino)propil)-19-metil-2,6,15,19,23-hexaazatriciclo[22.2.0.0^{11,14}]hexacosa-1(24), 11(14)-dieno-12,13,25,26-tetraona (**16**)

En un vial de microondas de 0,5-2 mL se añade el semiéster (**2**) (31 mg, 0,08 mmol), macrociclo (**15**) (82 mg, 0,12 mmol), carbonato de cesio (133 mg, 0,40 mmol) y 2 mL de etanol absoluto. Tras sellar el vial éste se mantiene en el reactor a microondas durante dos horas y media a 80°C. La mezcla resultante presenta un precipitado marrón separable por centrifugación. El lavado con etanol, agua ácida y el posterior secado da lugar al producto deseado como un sólido amarillo con un rendimiento del 25% (19 mg, 0,02 mmol).

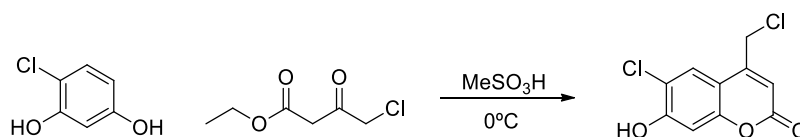


Esquema 29. Obtención del macrociclo (16)

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, DMSO, ppm) δ 1,94 (s, 9,4H); 2,75 (s, 2,8H); 3,04 (s, 2,9H); 3,14 (br m, 7,4H); 3,55 (s, 6,9H). 3,67 (s, 2,7H) 3,79 (s, 2,5H); 6,21 (s, 1,0H); 6,92 (s, 1,0H); 7,89 (s, 3,3H); 8,04 (br s, 3,0H); 9,61 (br s, 0,2H); 9,84 (br s, 0,3H); 11,42 (s, 0,9H). $^{13}\text{C NMR}$ (150 MHz, DMSO, ppm) δ 24,9; 42,2; 103,5; 111,9; 126,0; 153,3; 156,3; 159,8; 168,0; 182,5. **HRMS ESI(+)**, calculada para $\text{C}_{39}\text{H}_{47}\text{N}_8\text{O}_9\text{Cl}$ $[\text{M}+\text{H}]^+=807,3227$; experimental 807,3229 para $[\text{M}+\text{H}]^+$ y 404,1653 para $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$.

5.2.19. Síntesis de 6-cloro-4-(clorometil)-7-hidroxi-2H-cromen-2-ona (19)

En un matraz de fondo redondo se mezcla el 4-cloroacetato de etilo (2,130 mL, 16 mmol) y 4-cloro-resorcinol (2,121 g, 10 mmol) y se añaden 30 mL de ácido mesílico (465,6 mmol). La mezcla se mantiene en agitación en un baño de hielo durante 3 horas. Pasado ese tiempo se añaden 90 mL de éter dietílico frío, con lo que tiene lugar la formación de un precipitado rosado separable por centrifugación. El lavado del sólido con más éter dietílico y su posterior secado dan lugar al producto deseado con un 99% de rendimiento (3,56 g, 10 mmol).

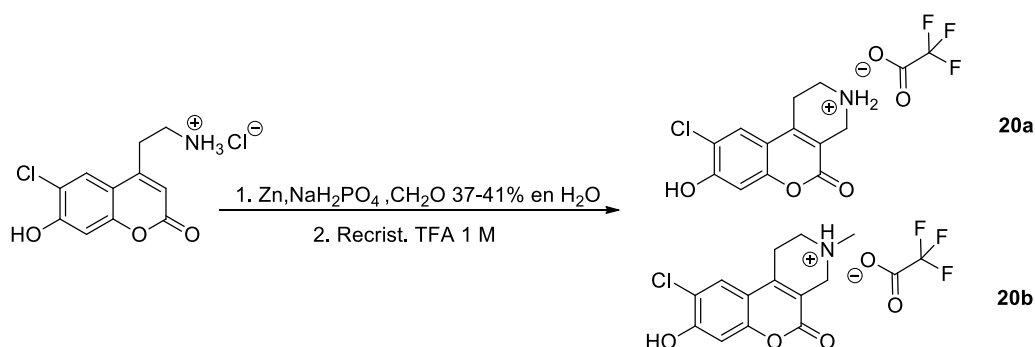


Esquema 30. Obtención de la cumarina (19)

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO, ppm) δ 4,99 (s, 2,6H); 6,49 (s, 1,0H); 6,94 (s, 1,1H); 7,86 (s, 1,0H); 11,50 (s, 0,9H). **HRMS ESI(-)**, calculada para $\text{C}_{10}\text{H}_6\text{O}_3\text{Cl}_2$ $[\text{M}]=243,9694$; experimental 242,9612 para $[\text{M}-\text{H}]^-$.

5.2.20. Síntesis de la mezcla de 9-cloro-8-hidroxi-5-oxo-2,3,4,5-tetrahidro-1H-cromeno[3,4-c]piridin-3-íó 2,2,2-trifluoroacetato y 9-cloro-8-hidroxi-3-metil-5-oxo-2,3,4,5-tetrahidro-1H-cromeno[3,4-c]piridin-3-íó 2,2,2-trifluoroacetato (**20a** y **20b**).

En un matraz de reacción se añaden 106 mg de la cumarina (**1b**) (0,38 mmol), 88 mg de Zn (1,34 mmol), 121 mg de dihidrogenofosfato sódico dihidratado (0,76 mmol), 33 mg de formaldehído (1,11 mmol), 10 mL de agua y se mantiene en agitación y protegido de la luz durante 24 horas. Pasado ese tiempo la mezcla se ha convertido en una suspensión blanca cuya separación puede llevarse a cabo por centrifugación. La fase sólida separada está formada por el Zn y un precipitado blanco que pueden separarse a través de la disolución del Zn con ácido clorhídrico 3 M caliente. La mezcla de cumarinas se obtiene tras recristalización con ácido trifluoroacético 1 M en agua como cristales aciculares de color amarillo pálido.

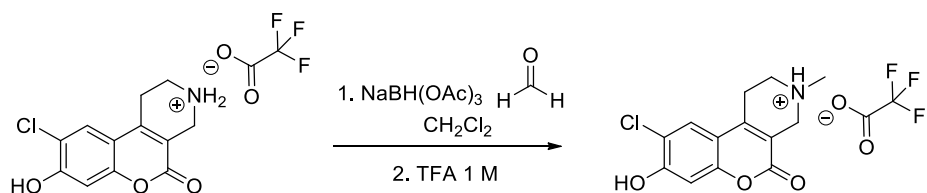


Esquema 31. Obtención de la mezcla de cumarinas (20a y 20b)

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO, ppm) δ 2,93 (s, 1,0H); 3,05 (t, 1,7H); 3,96 (s, 1,9H); 6,95 (s, 0,9H); 7,80 (s, 1,0H); 9,12 (s br, 1,0H); 11,53 (s br, 0,9H). **HRMS ESI (+)** (**20a**) $\text{C}_{12}\text{H}_{11}^{35}\text{ClNO}_3^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+=252,0422$; exp. 252,0422 para $[\text{M}+\text{H}]^+$ y 330,0562 $[(\text{M}+\text{H})\text{DMSO}]^+$ (**20b**) $\text{C}_{13}\text{H}_{13}^{35}\text{ClNO}_3^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+=266,0578$; exp. 266,0579 $[\text{M}+\text{H}]^+$ y 344,0718 $[(\text{M}+\text{H})\text{DMSO}]^+$.

5.2.21. Síntesis de 9-cloro-8-hidroxi-3-metil-5-oxo-2,3,4,5-tetrahidro-1H-cromeno [3,4-c]piridin-3-íó 2,2,2-trifluoroacetato (**20b**)

A la mezcla de las cumarinas (**20a** y **20b**) (143 mg, 0,39 mmol) se le añaden 0,608 g de una disolución acuosa de formaldehído al 37% (7,5 mmol), 3,817 g de $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ (18,3 mmol) y 15 mL de diclorometano. La suspensión resultante se agita durante 12 horas a 25°C y el crudo resultante se extrae en agua, se evapora el disolvente y se redisuelve en la mínima cantidad de ácido trifluoroacético 1 M caliente. Se añade hidróxido sódico hasta pH 8 y se centrifuga el precipitado formado. El sólido obtenido se recristaliza en ácido trifluoroacético 1 M en agua para dar lugar a la cumarina metilada como cristales aciculares de color amarillo pálido.



Esquema 32. Obtención de la cumarina (20b)

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO, ppm) δ 2,95 (s, 2,4H); 3,16 (s br, 2,0H); 4,07 (s, 1,9H); 6,96 (s, 1,0H); 7,82 (s br, 1,0H); 10,07 (s br, 1,0H); 11,54 (s, 0,9H). $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, DMSO, ppm) δ 22,18; 41,99; 48,45; 49,09; 103,45; 110,94; 112,44; 117,60; 125,53; 144,69; 151,75; 156,55; 158,38. **HRMS ESI (+)** $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{ClNO}_3^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+=266,0578$; exp. 266,0579 $[\text{M}+\text{H}]^+$ y 344,0718 $[(\text{M}+\text{H})\text{DMSO}]^+$.

5.3. Caracterización por espectroscopia de fluorescencia de los productos 1b, 2, 3, 5, 16, 19, 20b

5.3.1. Obtención de los espectros de excitación y emisión a distintos valores de pH

En primer lugar, se prepara para cada uno de los productos una disolución de concentración conocida (aproximadamente 10 mM) en DMSO. A continuación, se preparan cinco disoluciones tampón con valores de pH comprendidos entre 8 y 4:

- Tampón fosfato: pH 8,1/ [PBS] = 0,01 M / I = 0,15
- Tampón fosfato: pH 7,1/ [PBS] = 0,01 M / I = 0,15
- Tampón fosfato: pH 6,1/ [Cacodilato] = 0,01 M / I = 0,15
- Tampón fosfato: pH 5,1/ [AcOH] = 0,01 M / I = 0,15
- Tampón fosfato: pH 4,1/ [AcOH] = 0,01 M / I = 0,15

Las disoluciones que van a medirse se preparan añadiendo 1 μL de la disolución madre en DMSO del producto correspondiente, 2 μL de DMSO y 2997 μL del tampón de pH correspondiente. Los espectros de excitación se registran excitando la muestra entre 250 nm y 450 nm y captando la radiación emitida a 456 nm (λ_{EM} máxima). Los espectros de emisión se obtienen excitando la muestra a 375 nm (λ_{EX} máxima) y captando la radiación emitida entre 400 nm y 600 nm. En los anexos también pueden encontrarse los espectros de emisión excitando la muestra a 332 nm (λ_{EX} máxima) de la banda del fenol para las disoluciones con pH 5,1 y 4,1. A continuación se presenta una tabla con las concentraciones de las disoluciones utilizadas en la caracterización por espectroscopia de fluorescencia de los productos.

Tabla 2. Concentraciones de las disoluciones madre y de las disoluciones medidas a distintos valores de pH

	Concentración _{madre} (M)	Concentración _f (M)
Cumarina (1b)	1,0·10 ⁻²	3,3·10 ⁻⁶
Escuaramato (2)	1,0·10 ⁻²	3,3·10 ⁻⁶
Ácido escuarámico (3)	9,9·10 ⁻³	3,3·10 ⁻⁶
Escuaramida (5)	1,0·10 ⁻²	3,3·10 ⁻⁶
Cicloescuaramida (16)	1,0·10 ⁻²	3,3·10 ⁻⁶
Cumarina (19)	1,0·10 ⁻²	3,3·10 ⁻⁶
Cumarina (20b)	1,0·10 ⁻²	3,3·10 ⁻⁶

5.3.2. Obtención de los rendimientos cuánticos (ϕ)

La determinación de los rendimientos cuánticos relativos se ha realizado utilizando sulfato de quinina en ácido perclórico 0,1 M como patrón y siguiendo el procedimiento descrito por Christian Würth y colaboradores para la determinación de rendimientos cuánticos relativos y absolutos en muestras transparentes⁵⁸.

$$\phi = \frac{\text{Fotones emitidos por fluorescencia}}{\text{Fotones absorbidos}} \quad (1)$$

$$\phi_m = \phi_p \cdot \left(\frac{Abs_p}{Abs_m}\right) \cdot \left(\frac{E_m}{E_p}\right) \cdot \left(\frac{\eta_m}{\eta_p}\right)^2 = \phi_p \cdot \left(\frac{b_m}{b_p}\right) \cdot \left(\frac{\eta_m}{\eta_p}\right)^2 \quad (2)$$

$$\phi_m = \phi_p \cdot \left(\frac{b_m}{b_p}\right) \quad (3)$$

ϕ = Rendimiento cuántico

Abs = Absorbancia de la disolución a 350 nm

E = Integral del espectro de emisión fluorescente excitando a 350 nm

η = Índice de refracción del disolvente

b = Pendiente de la representación de E frente a Abs

p y m = patrón y muestra respectivamente

⁵⁸ Ver referencia 50.

Tanto las muestras como los patrones se han preparado en fase acuosa con un 0,1% de DMSO, por lo que es posible transformar la ecuación (2) en la (3) puesto que el cociente de índices de refracción es 1. Para cada compuesto medido se preparan 4 disoluciones que presenten absorbancias máximas menores a 0,1 u.a. para evitar fenómenos de autoabsorción. Tras obtener su espectro de absorción, se registra su espectro de emisión excitando la muestra a la longitud de onda para la que esté tabulado el valor de rendimiento cuántico del patrón. De esta manera, integrando el espectro de emisión fluorescente y disponiendo de la absorbancia a la longitud de onda de excitación, se obtiene una medida del número de fotones emitidos con respecto al número de fotones absorbidos.

6. Anexos

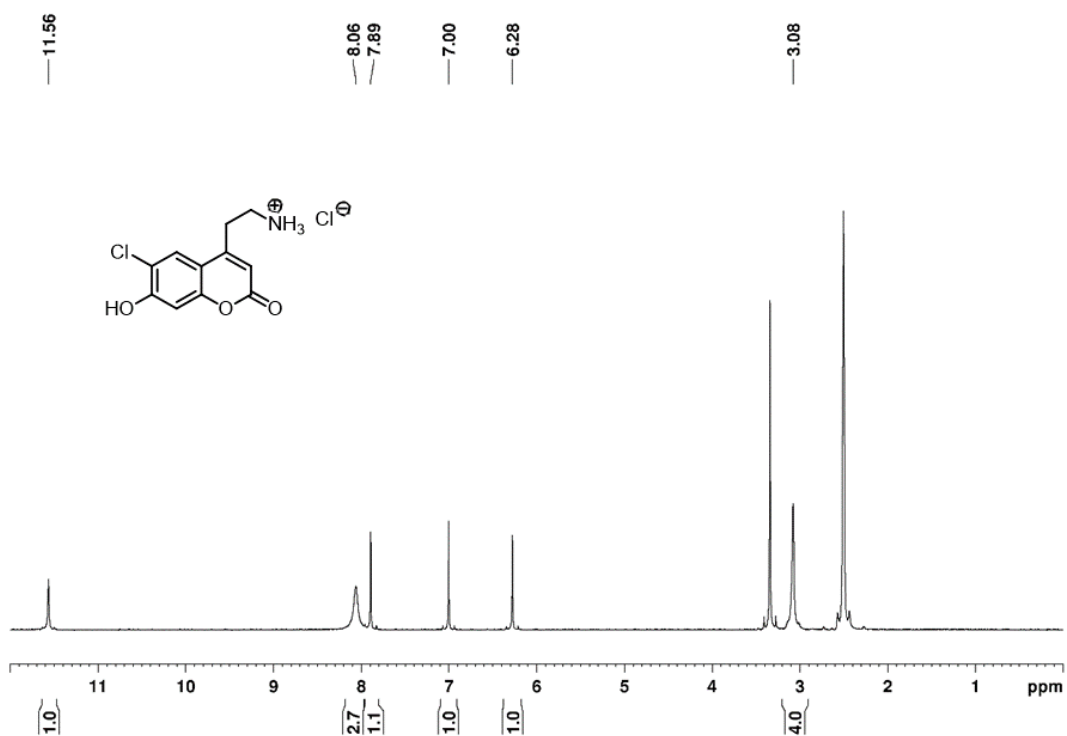
6.1. Espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN de los compuestos más destacados

Figura 19. Espectro de ^1H -RMN de **1b** en DMSO- d_6 , 300 MHz, 298 K

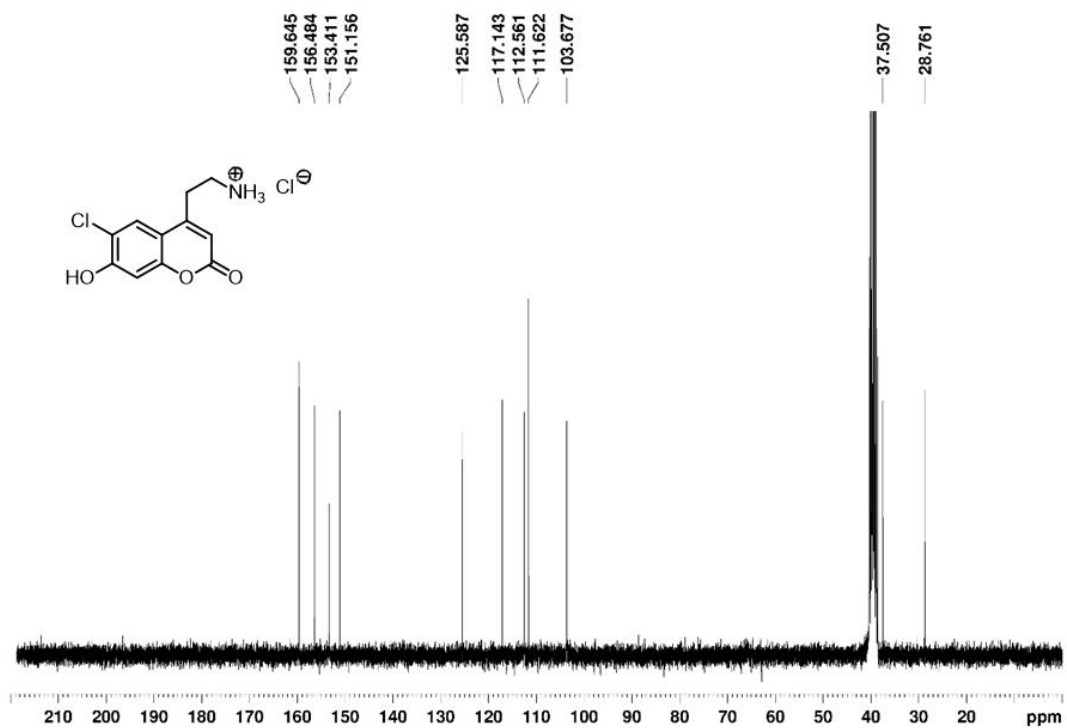


Figura 20. Espectro de ^{13}C -RMN de **1b** en DMSO- d_6 , 75 MHz, 298 K

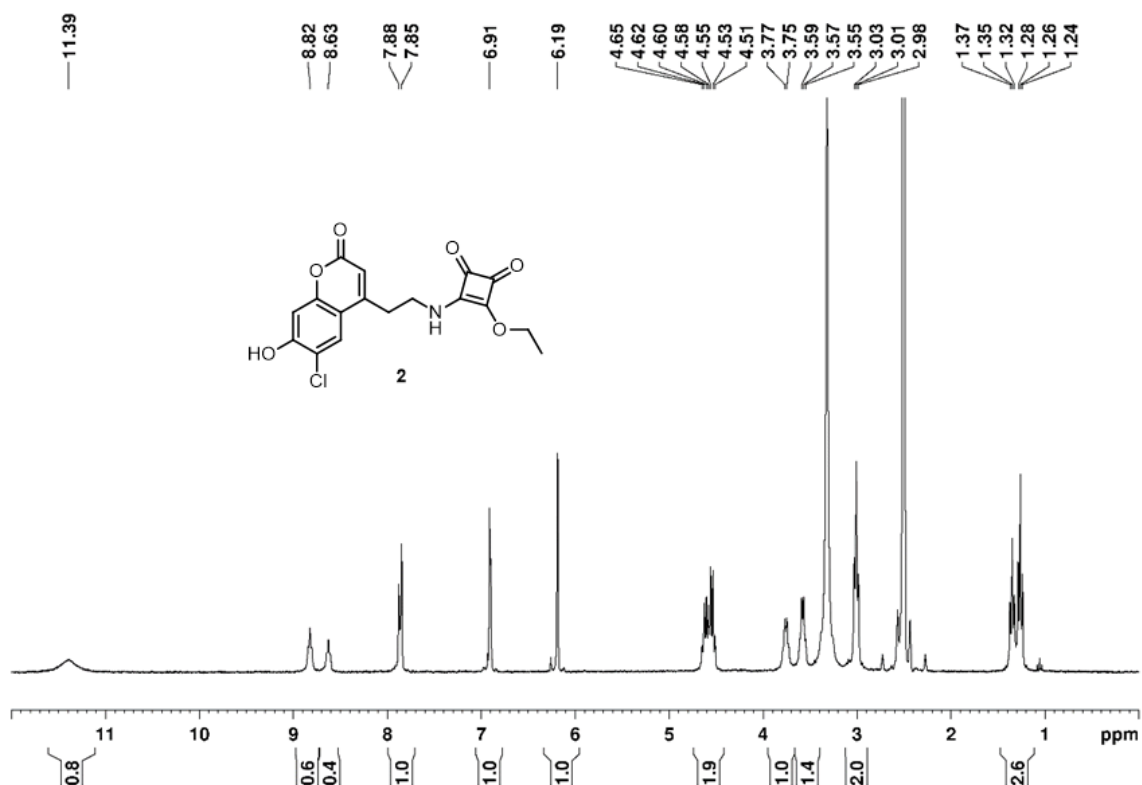


Figura 22. Espectro de ¹H-RMN de (2) en DMSO-d₆, 150 MHz, 298 K

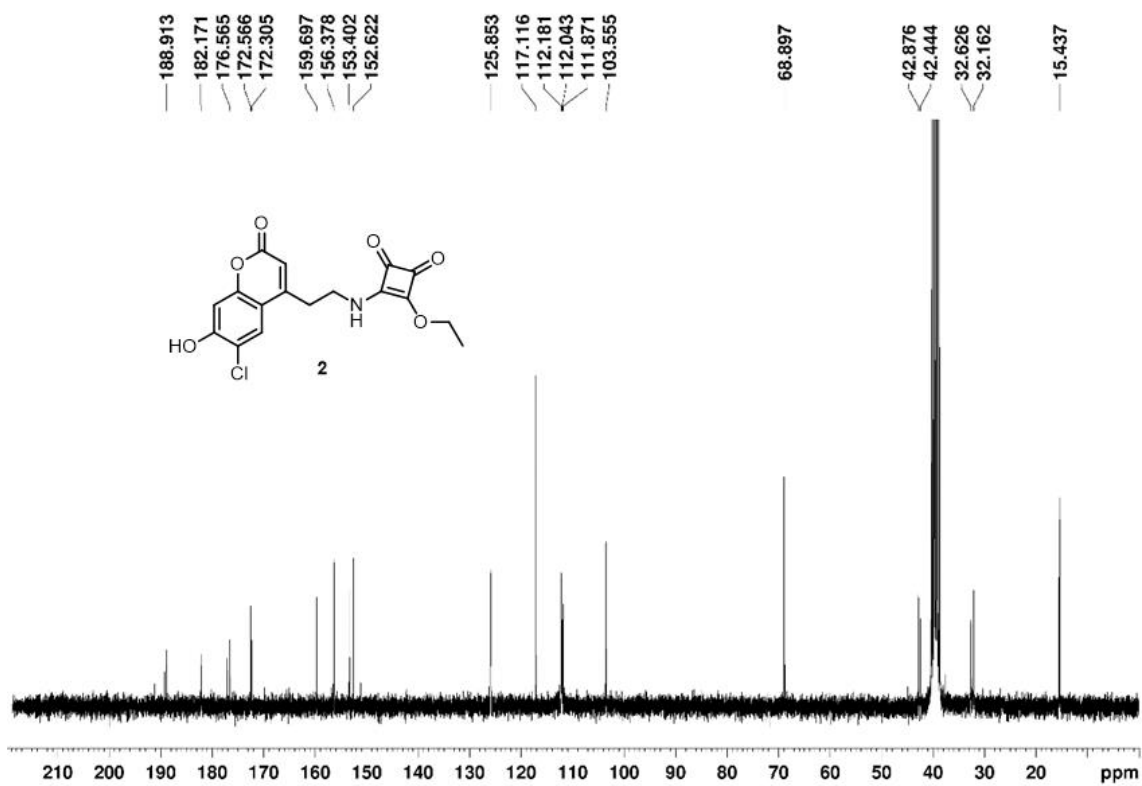


Figura 21. Espectro de ¹³C-RMN de (2) en DMSO-d₆, 300 MHz, 298 K

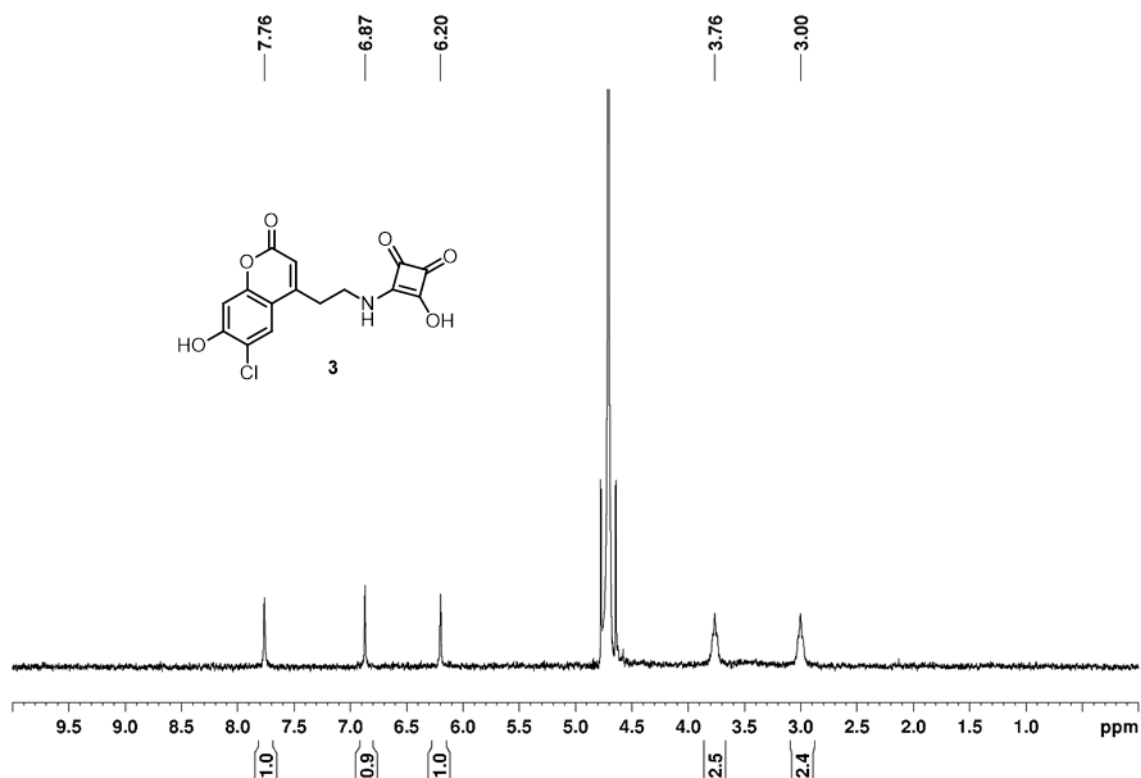


Figura 23. Espectro de ^1H -RMN de (3) en DMSO-d_6 , 300 MHz, 298 K

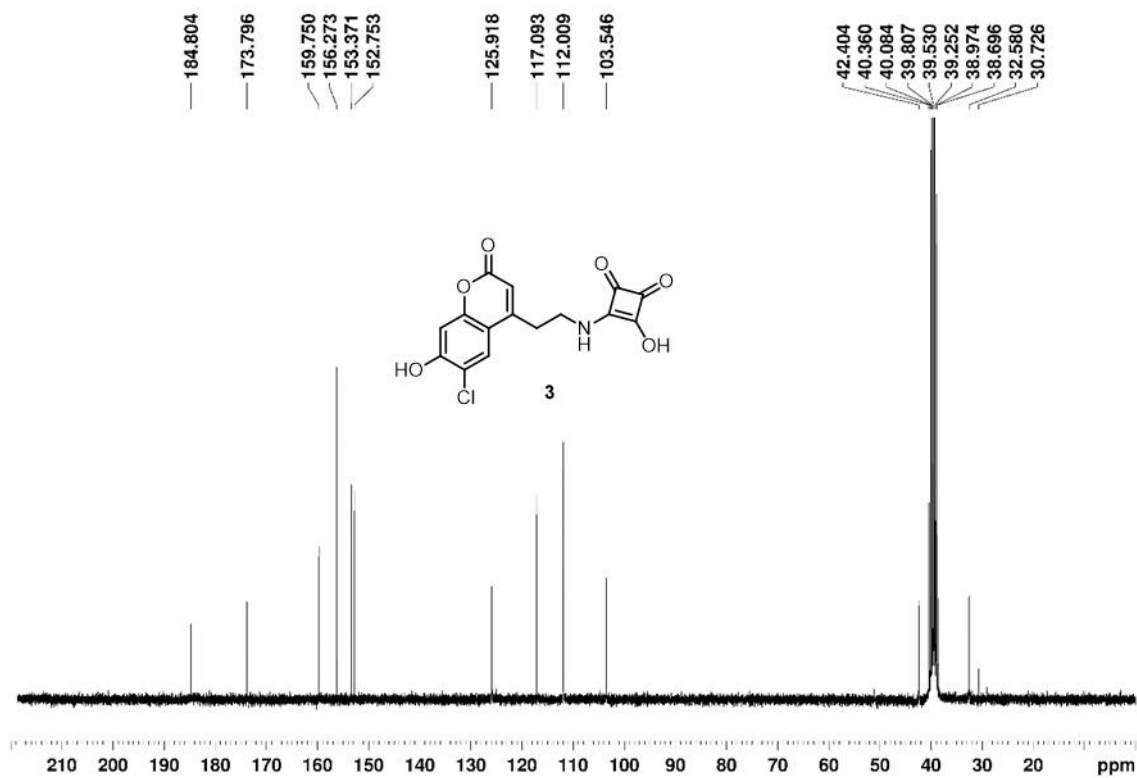


Figura 24. Espectro de ^{13}C -RMN de (3) en DMSO-d_6 , 150 MHz, 298 K

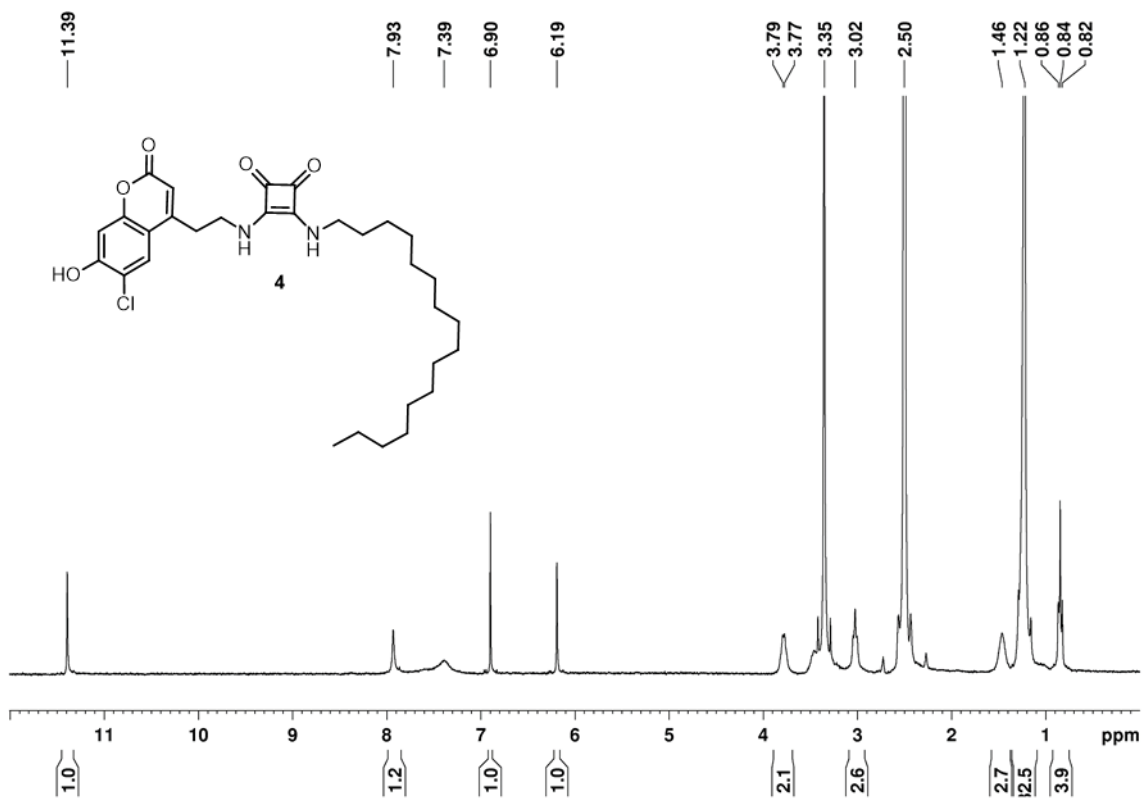


Figura 25. Espectro de $^1\text{H-RMN}$ de (4) en DMSO- d_6 , 300 MHz, 298 K

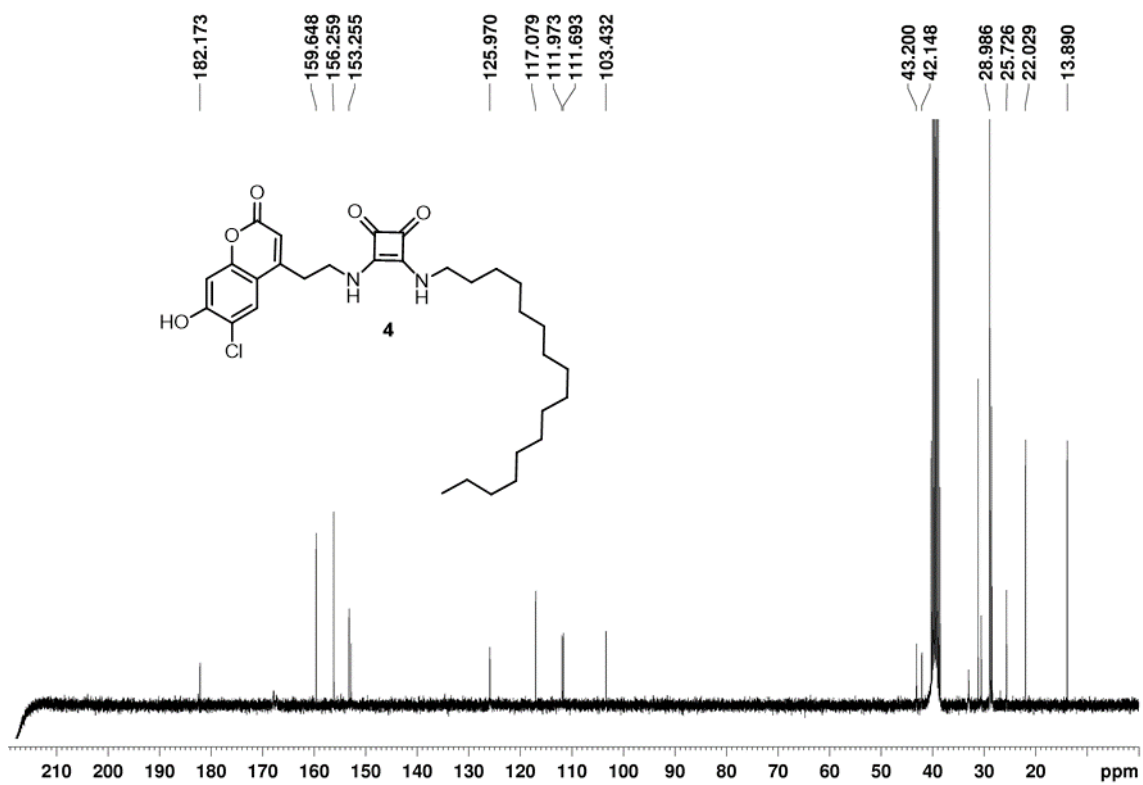


Figura 26. Espectro de $^{13}\text{C-RMN}$ de (4) en DMSO- d_6 , 150 MHz, 298 K

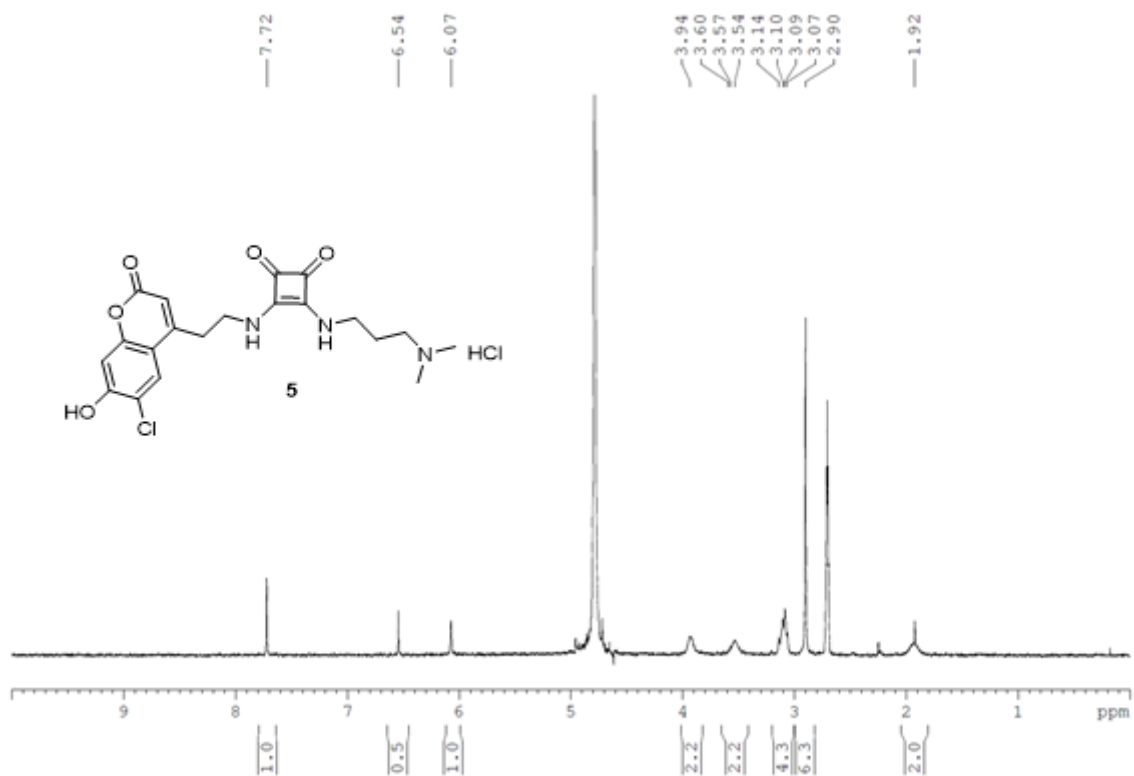


Figura 27. Espectro de ¹H-RMN de (5) en D₂O, 10 % DMSO-d₆, 300 MHz, 298 K

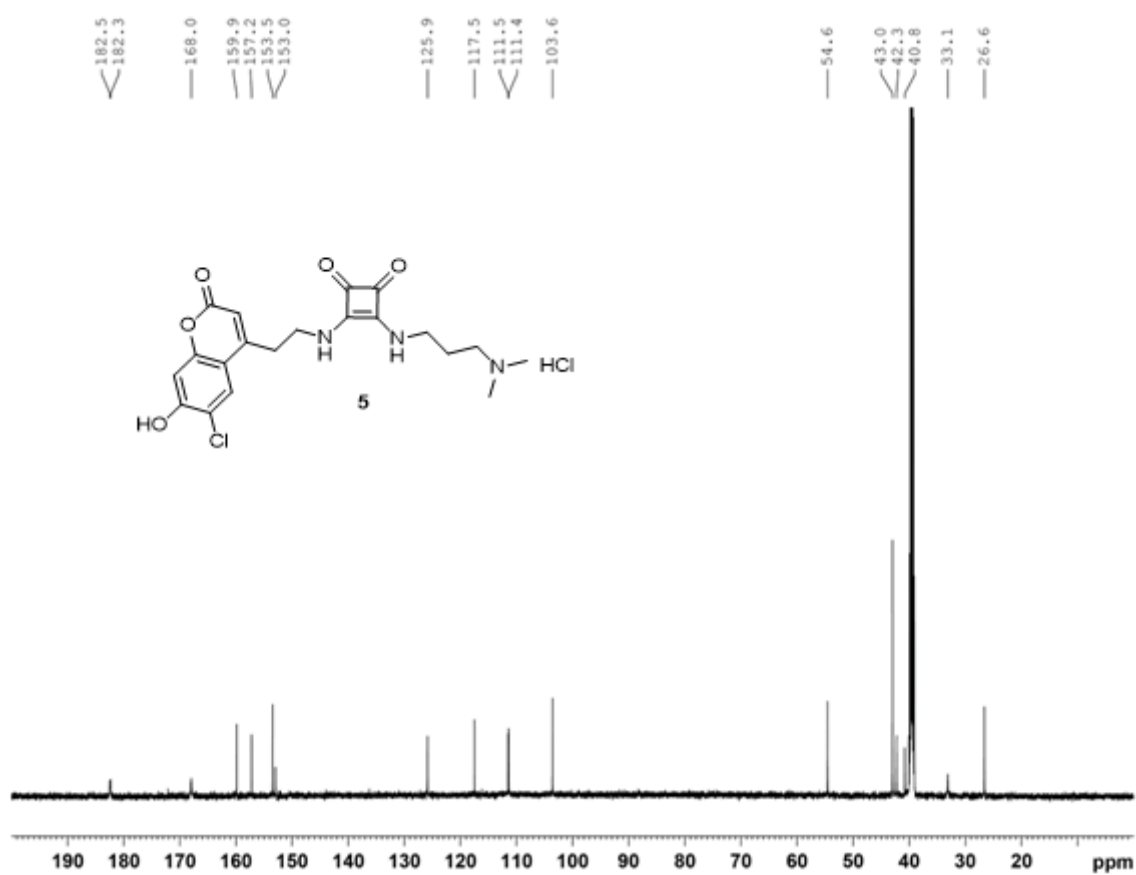


Figura 28. Espectro de ¹³C-RMN de (5) en D₂O, 10 % DMSO-d₆, 150 MHz, 298 K

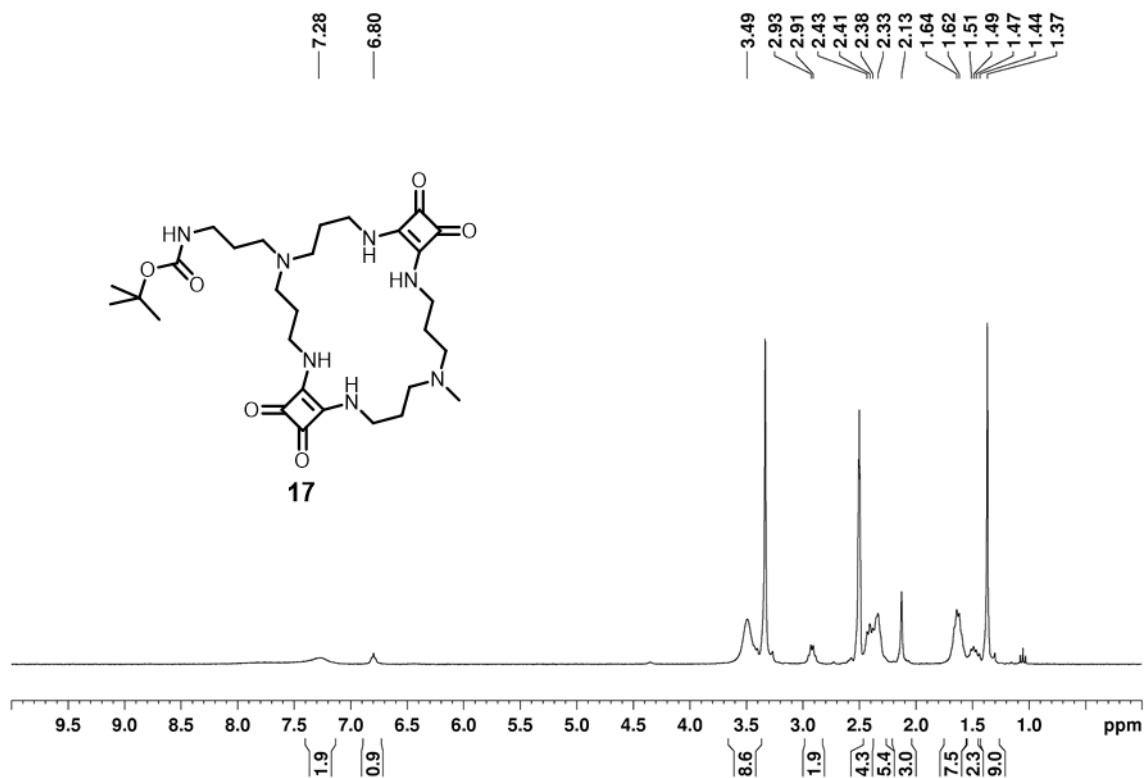


Figura 29. Espectro de ^1H -RMN de (17) en DMSO-d_6 , 600 MHz, 298 K

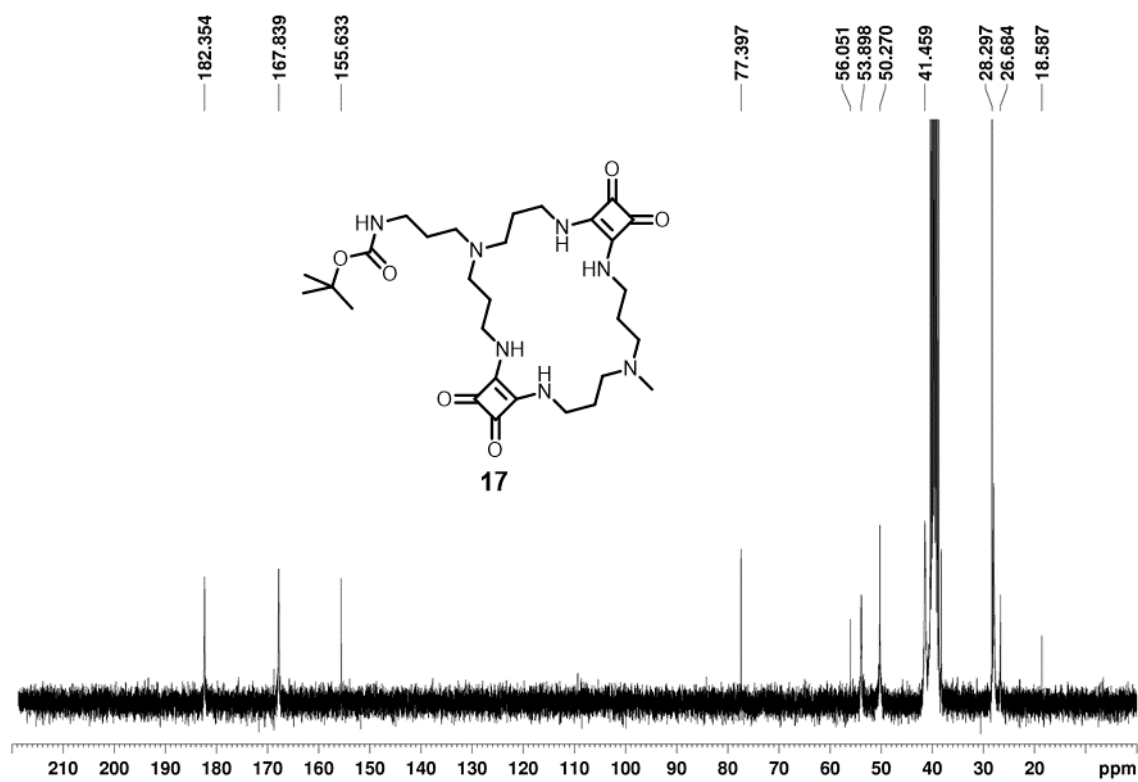


Figura 30. Espectro de ^{13}C -RMN de (17) en DMSO-d_6 , 150 MHz, 298 K

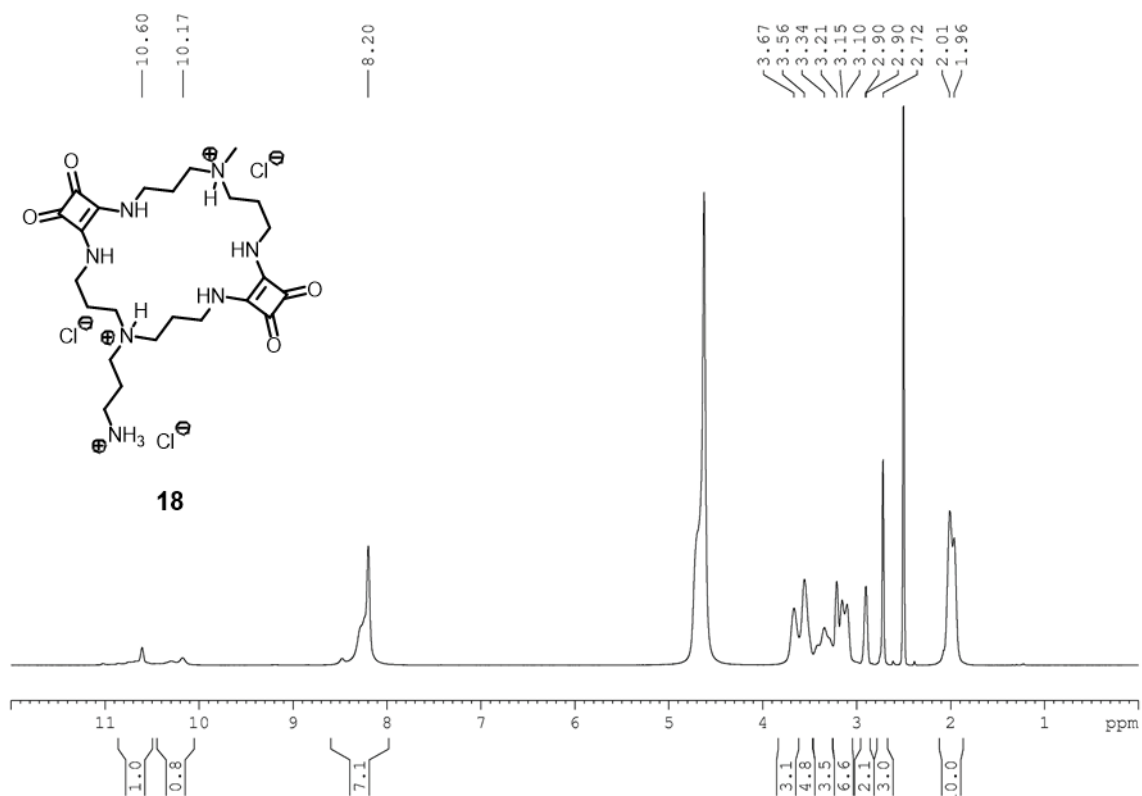


Figura 31. Espectro de ^1H -RMN de (**18**) en DMSO-d_6 , 600 MHz, 298 K

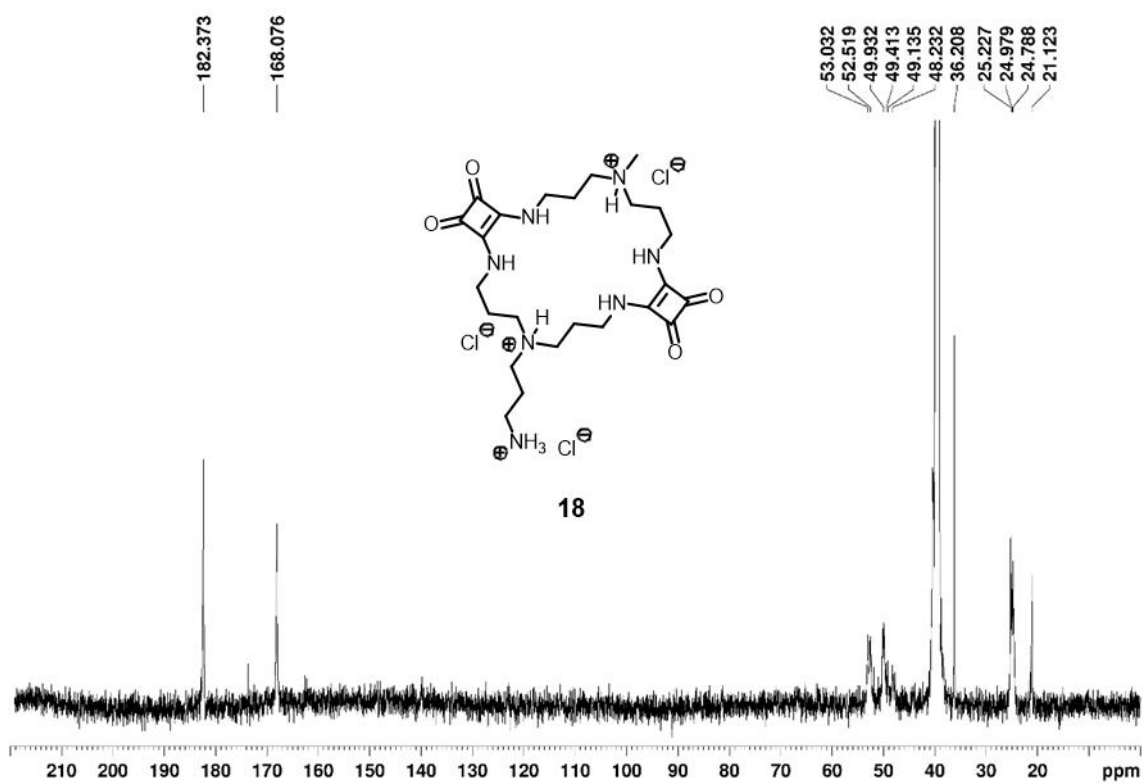


Figura 32. Espectro de ^{13}C -RMN de (**18**) en DMSO-d_6 , 150 MHz, 298 K

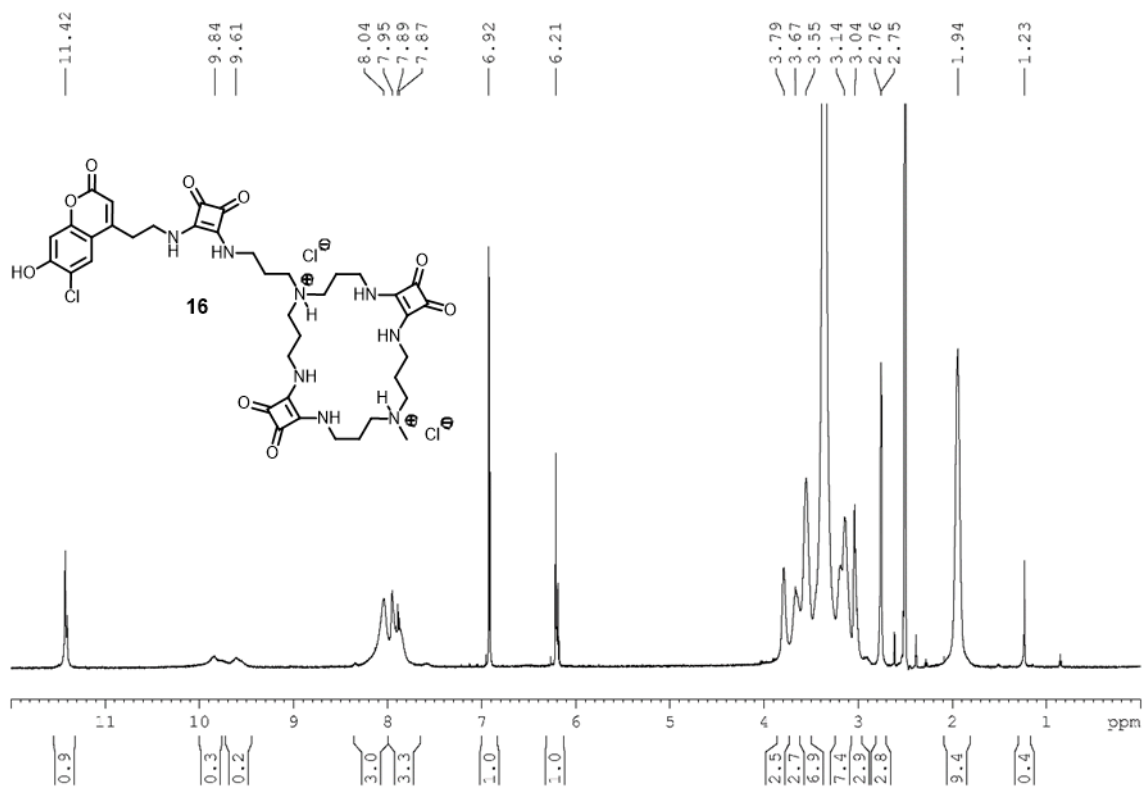


Figura 34. Espectro de ^1H -RMN de (16) en DMSO-d_6 , 600 MHz, 298 K

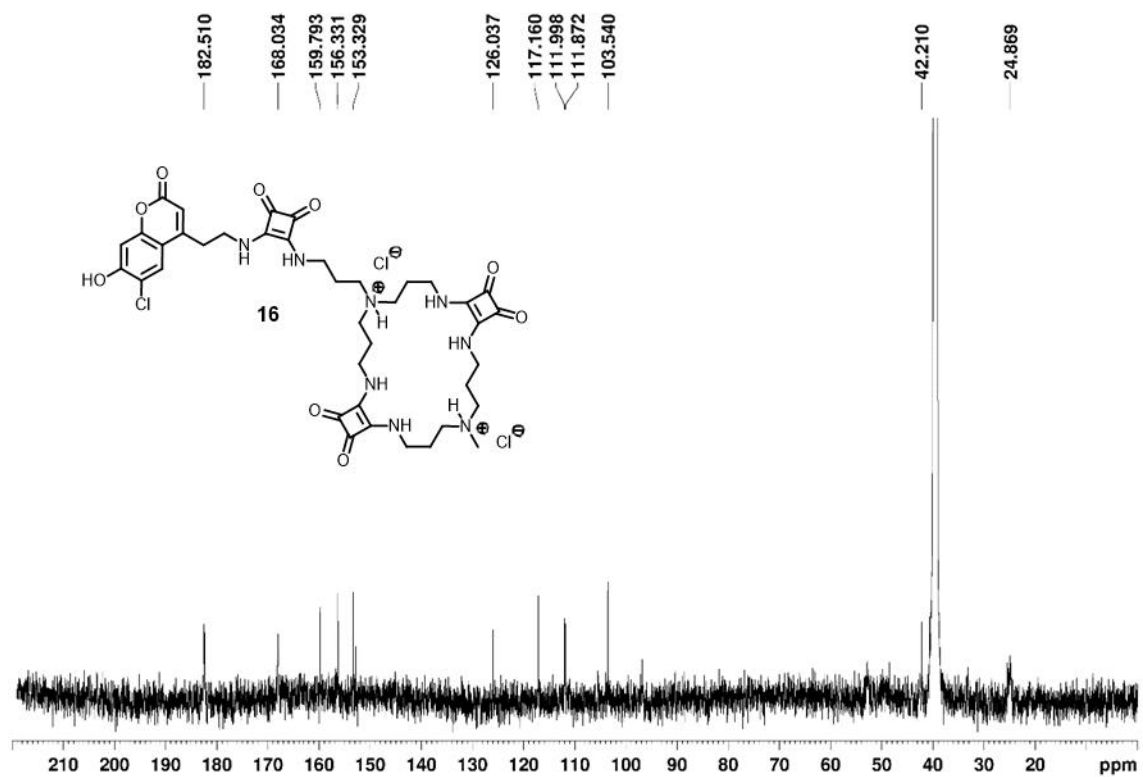


Figura 33. Espectro de ^{13}C -RMN de (18) en DMSO-d_6 , 150 MHz, 298 K

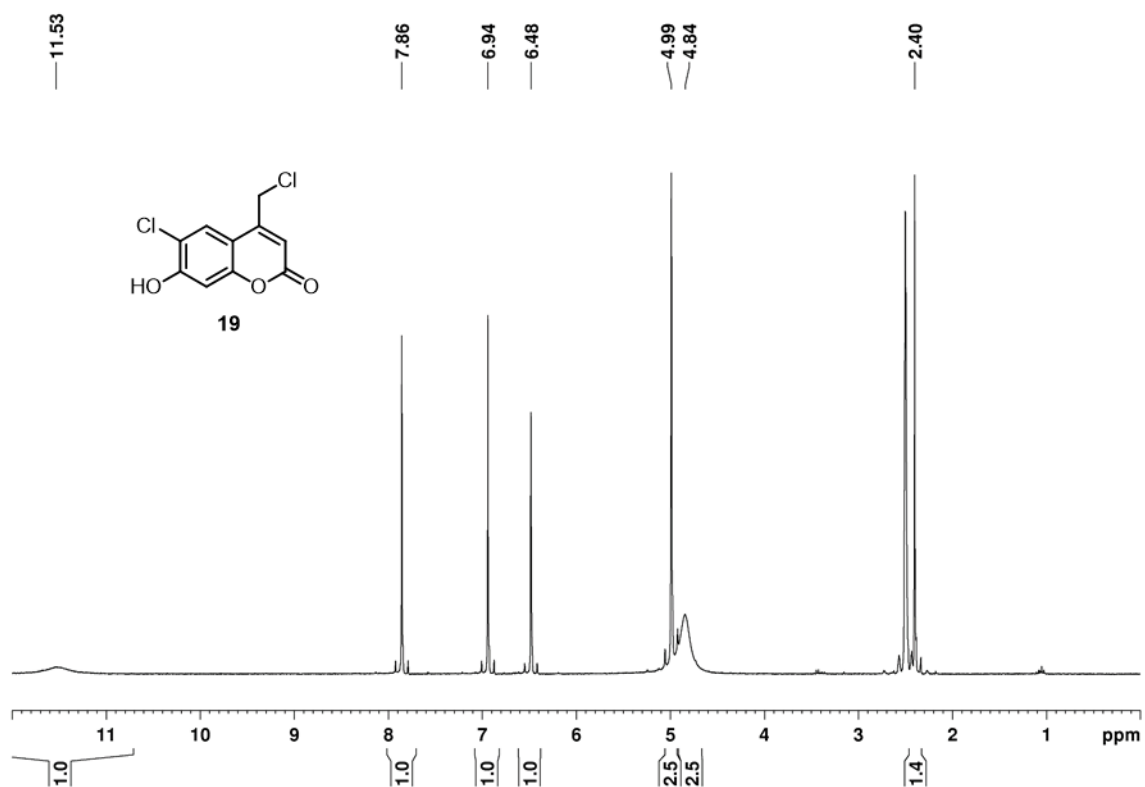


Figura 35. Espectro de ¹H-RMN de (19) en DMSO-d₆, 300 MHz, 298 K

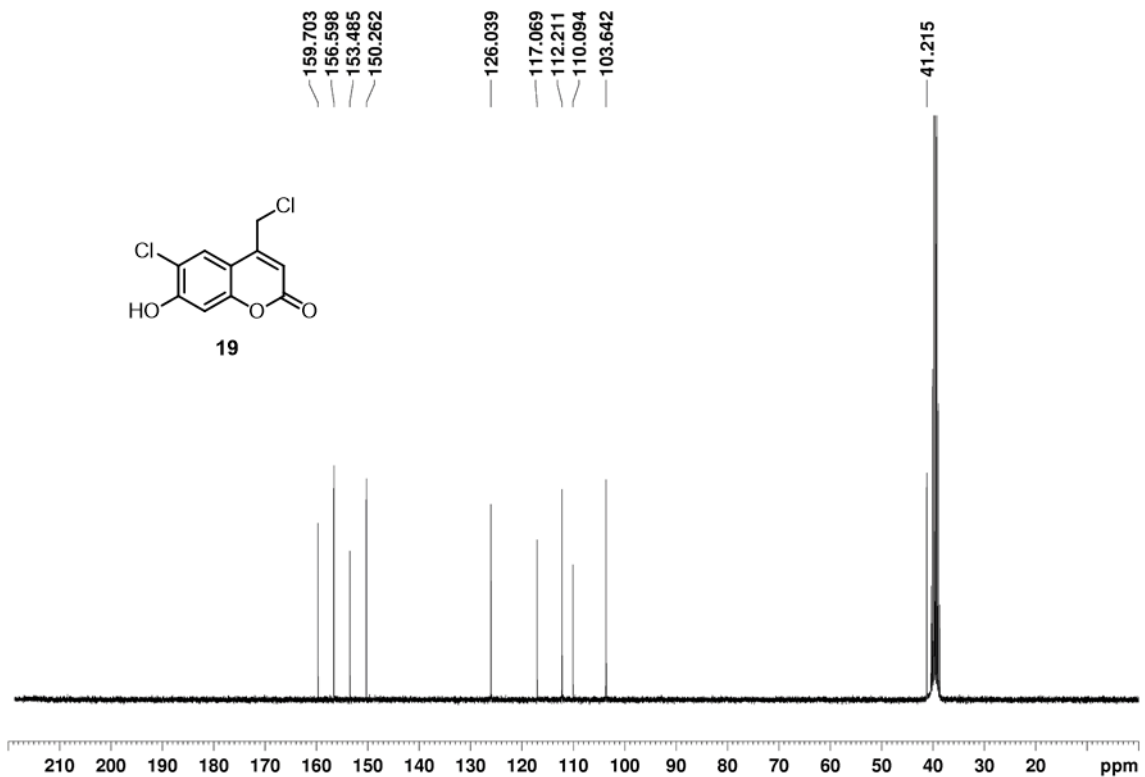


Figura 36. Espectro de ¹³C-RMN de (19) en DMSO-d₆, 75 MHz, 298 K

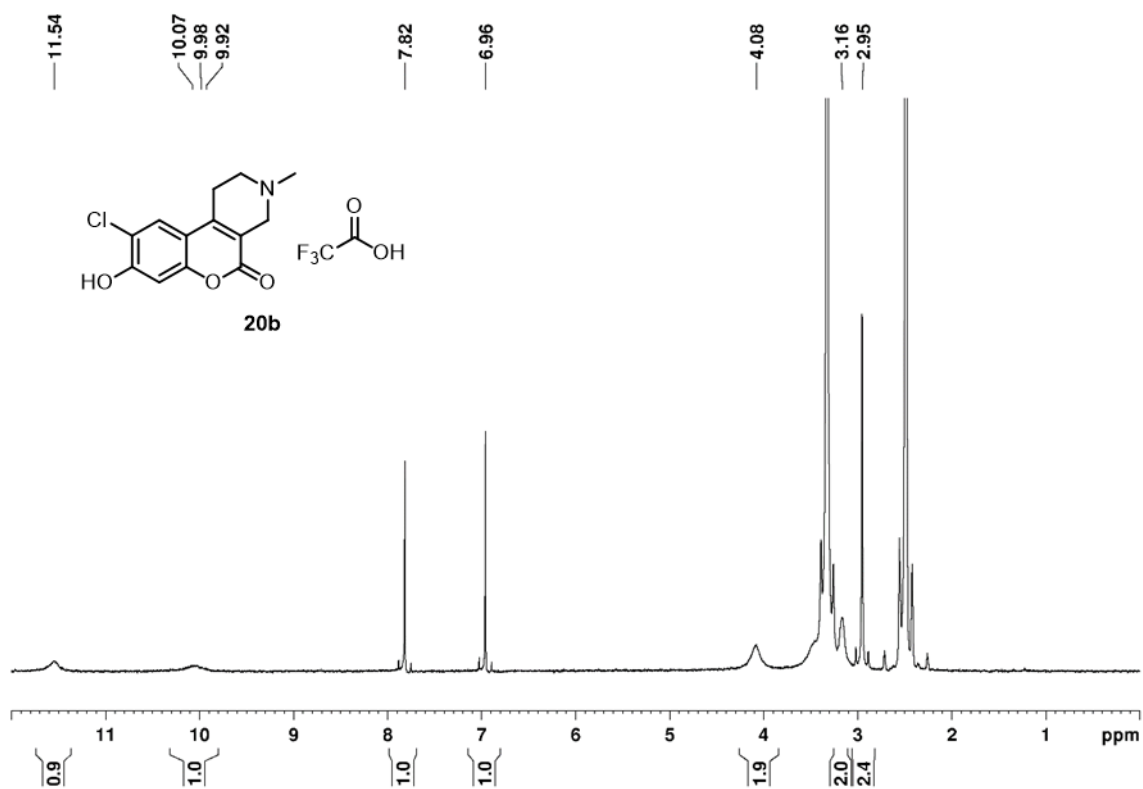


Figura 37. Espectro de 1H -RMN de (**20b**) en $DMSO-d_6$, 300 MHz, 298 K

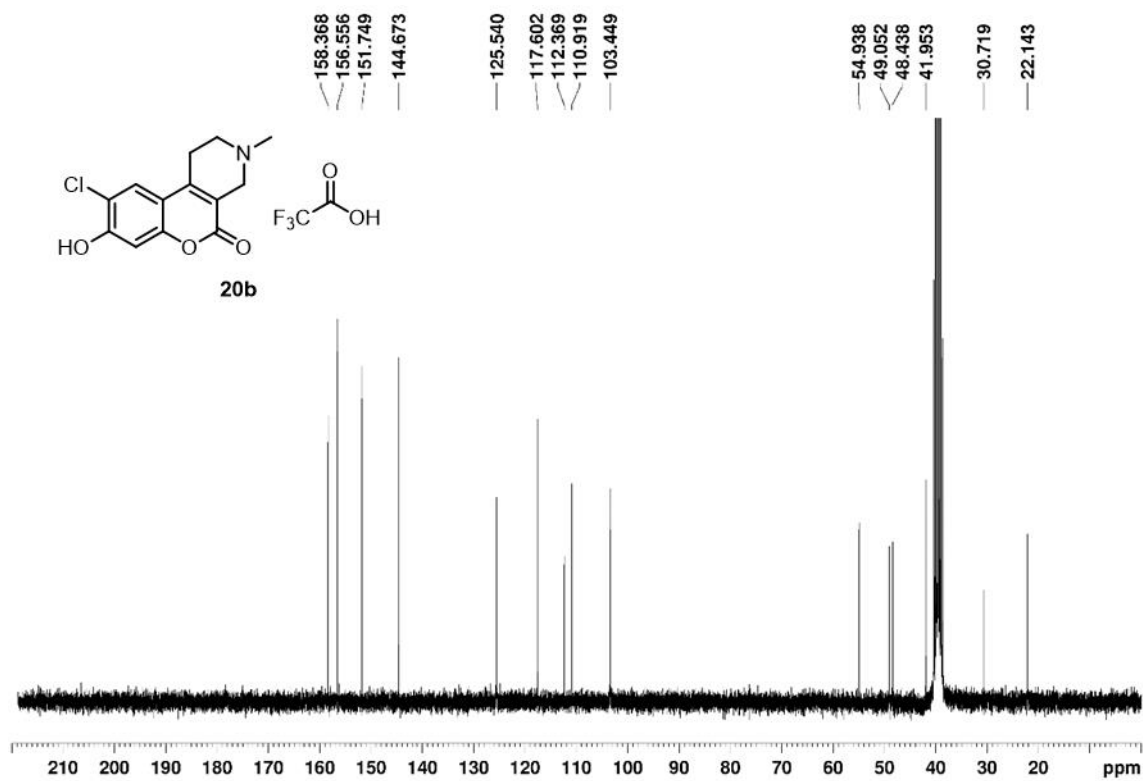


Figura 38. Espectro de ^{13}C -RMN de (**20b**) en $DMSO-d_6$, 75 MHz, 298 K

6.2. Espectros de excitación y emisión a diferentes valores de pH

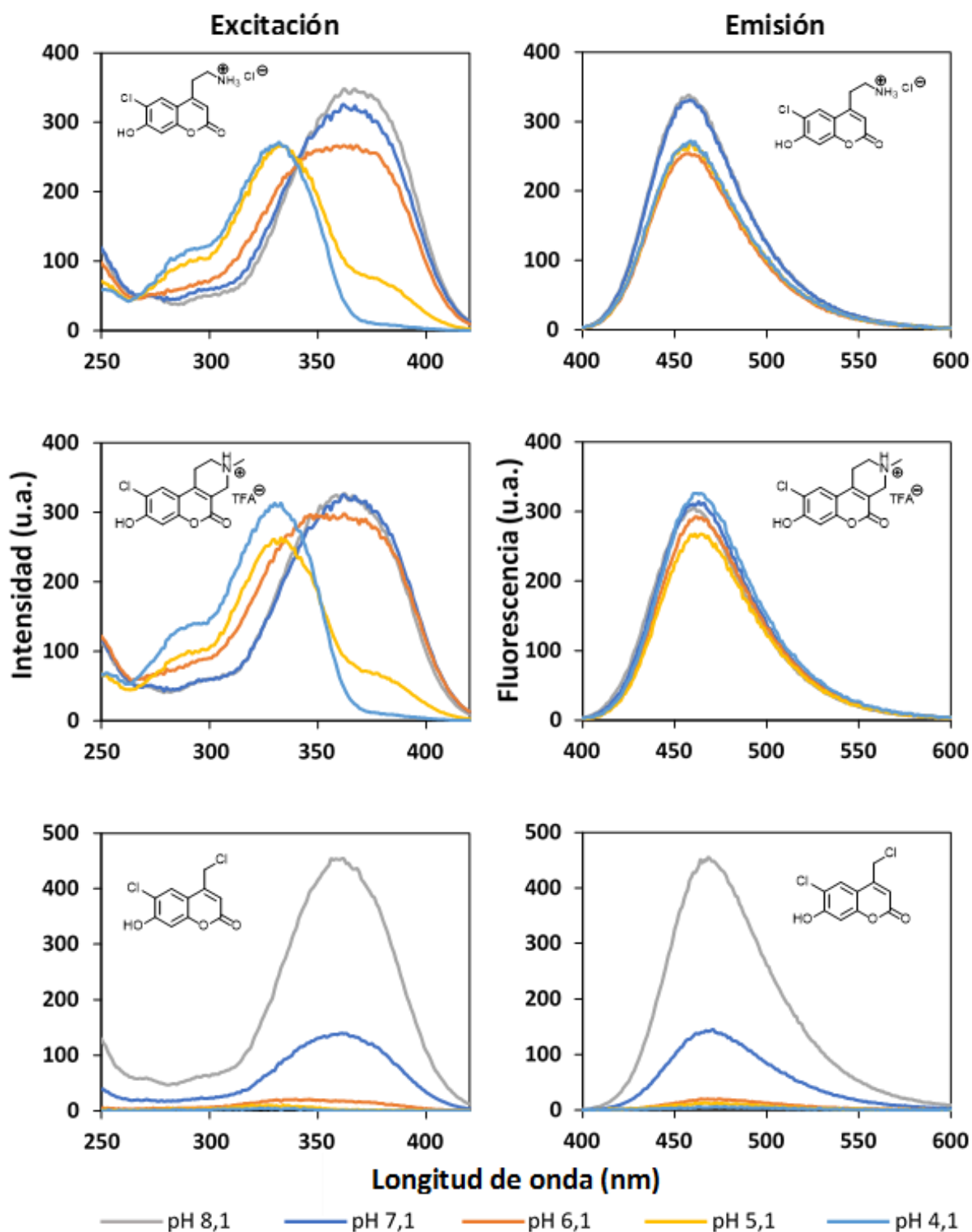


Figura 39. Espectros de excitación (izquierda) y emisión (derecha) de los compuestos **1b**, **20b** y **19** a concentración $3,3 \mu\text{M}$. Los espectros de los compuestos **1b** y **20b** se han registrado a una amplitud de ventana espectral de 2,5 mientras que el compuesto **19** se ha registrado a una amplitud de 5. Los espectros de excitación se han obtenido excitando la muestra entre 250 nm y 450 nm y recogiendo la radiación emitida a 456 nm. Los espectros de emisión se han obtenido excitando la muestra a 375 nm (pH 8,1/7,1/6,1) y 332 nm (pH 5,1/4,1) y recogiendo la radiación emitida entre 400 y 600 nm.

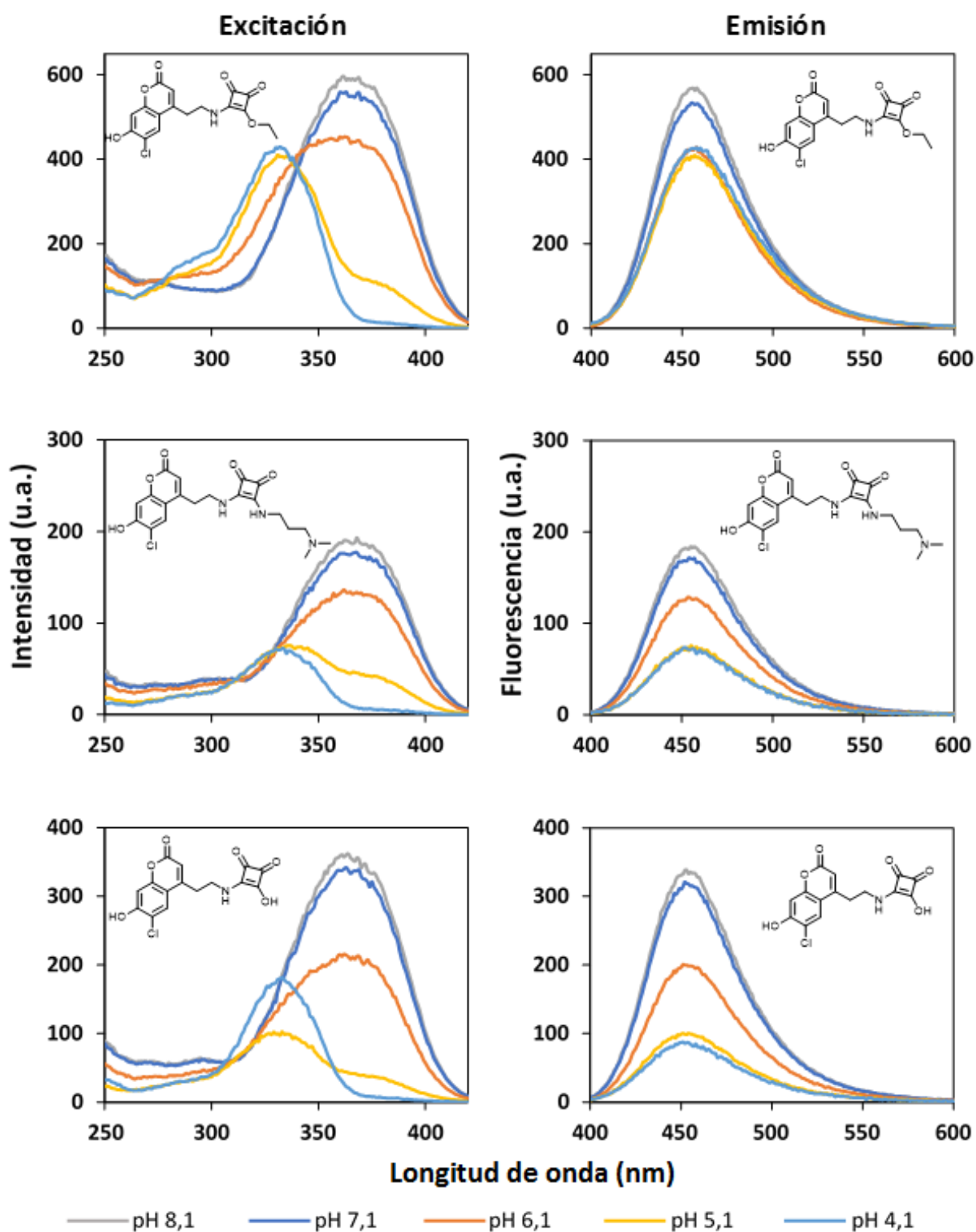


Figura 40. Espectros de excitación (izquierda) y emisión (derecha) de los compuestos **2**, **3** y **5** a concentración $3,3 \mu\text{M}$ y para una amplitud de ventana de 5. Los espectros de excitación se han obtenido excitando la muestra entre 250 nm y 450 nm y recogiendo la radiación emitida a 456 nm. Los espectros de emisión se han obtenido excitando la muestra a 375 nm (pH 8,1/7,1/6,1) y 332 nm (pH 5,1/4,1) y recogiendo la radiación emitida entre 400 y 600 nm.

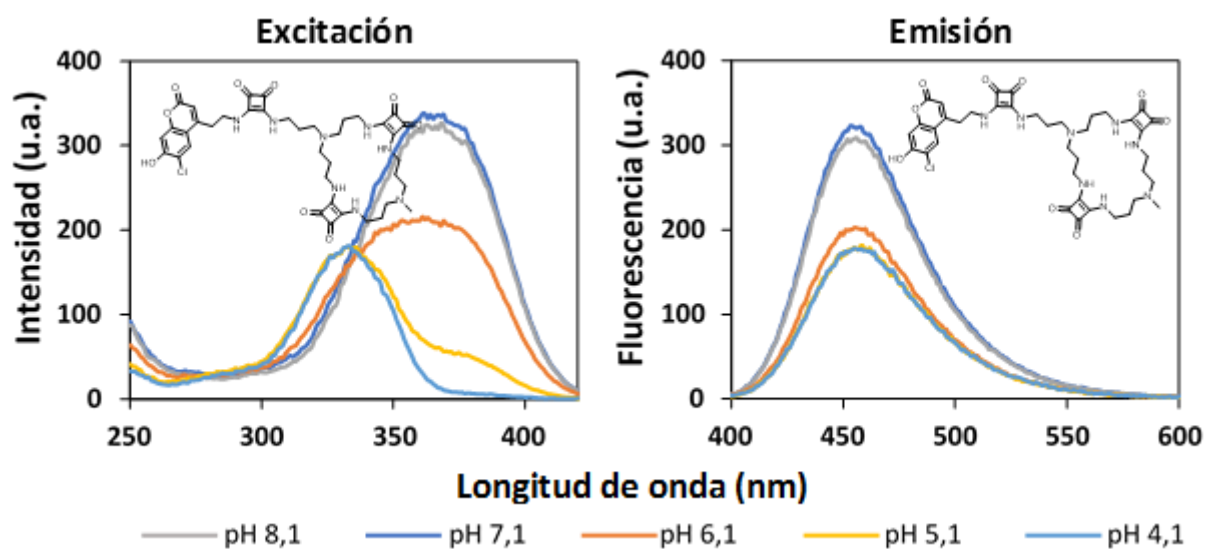


Figura 41. Espectros de excitación (izquierda) y emisión (derecha) del compuesto **16** a concentración $3,3 \mu\text{M}$ y para una amplitud de ventana de 5. Los espectros de excitación se han obtenido excitando la muestra entre 250 nm y 450 nm y recogiendo la radiación emitida a 456 nm. Los espectros de emisión se han obtenido excitando la muestra a 375 nm (pH 8,1/7,1/6,1) y 332 nm (pH 5,1/4,1) y recogiendo la radiación emitida entre 400 y 600 nm.

6.3. Espectros registrados para la obtención de los rendimientos cuánticos

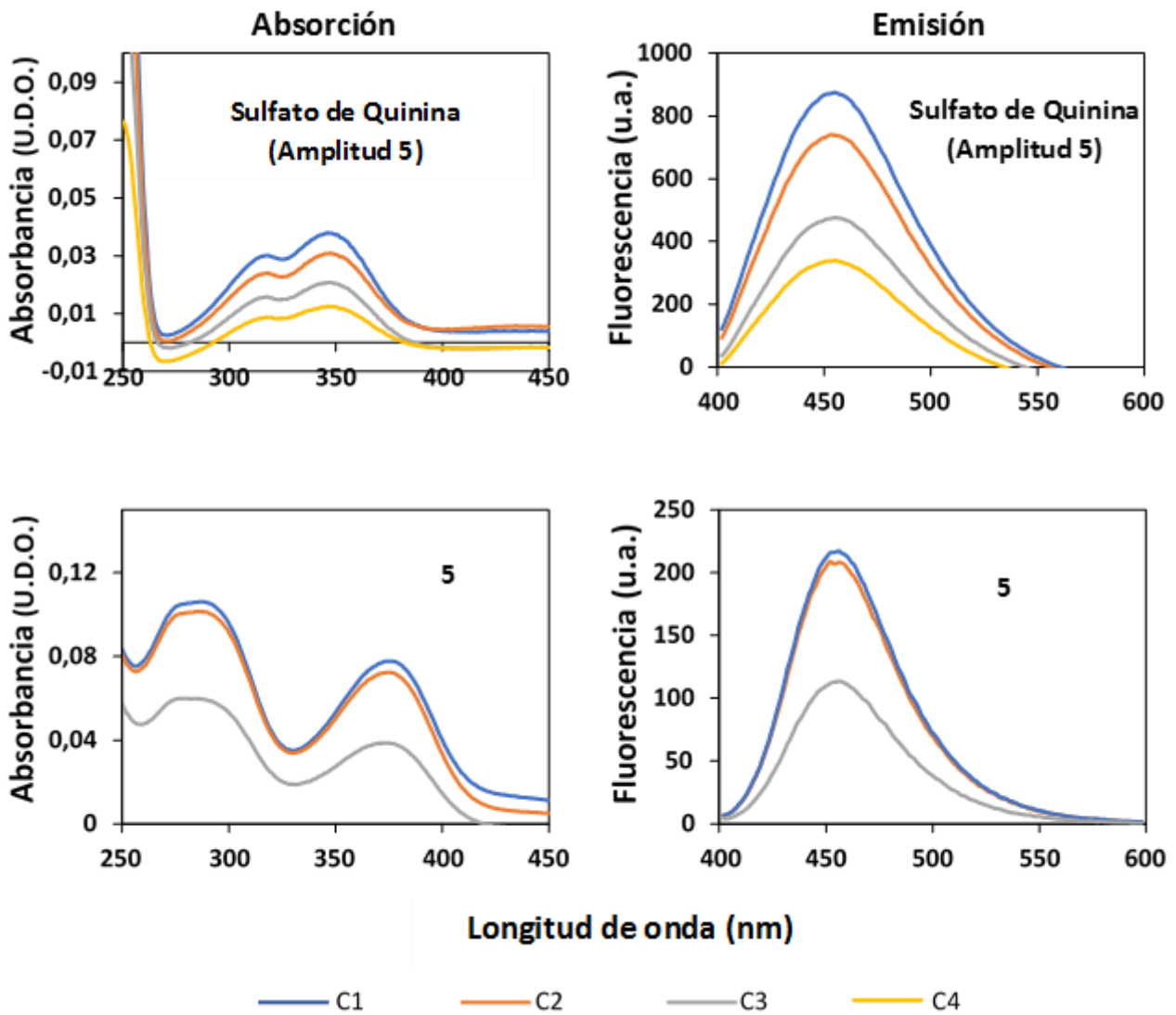


Figura 42. Espectros de absorción (izquierda) y de emisión (derecha) del patrón sulfato de Quinina y el compuesto 5 para una ventana espectral de 5. Los espectros de emisión se han registrado excitando la muestra a 350 nm y recogiendo la radiación emitida entre 400 nm y 600 nm

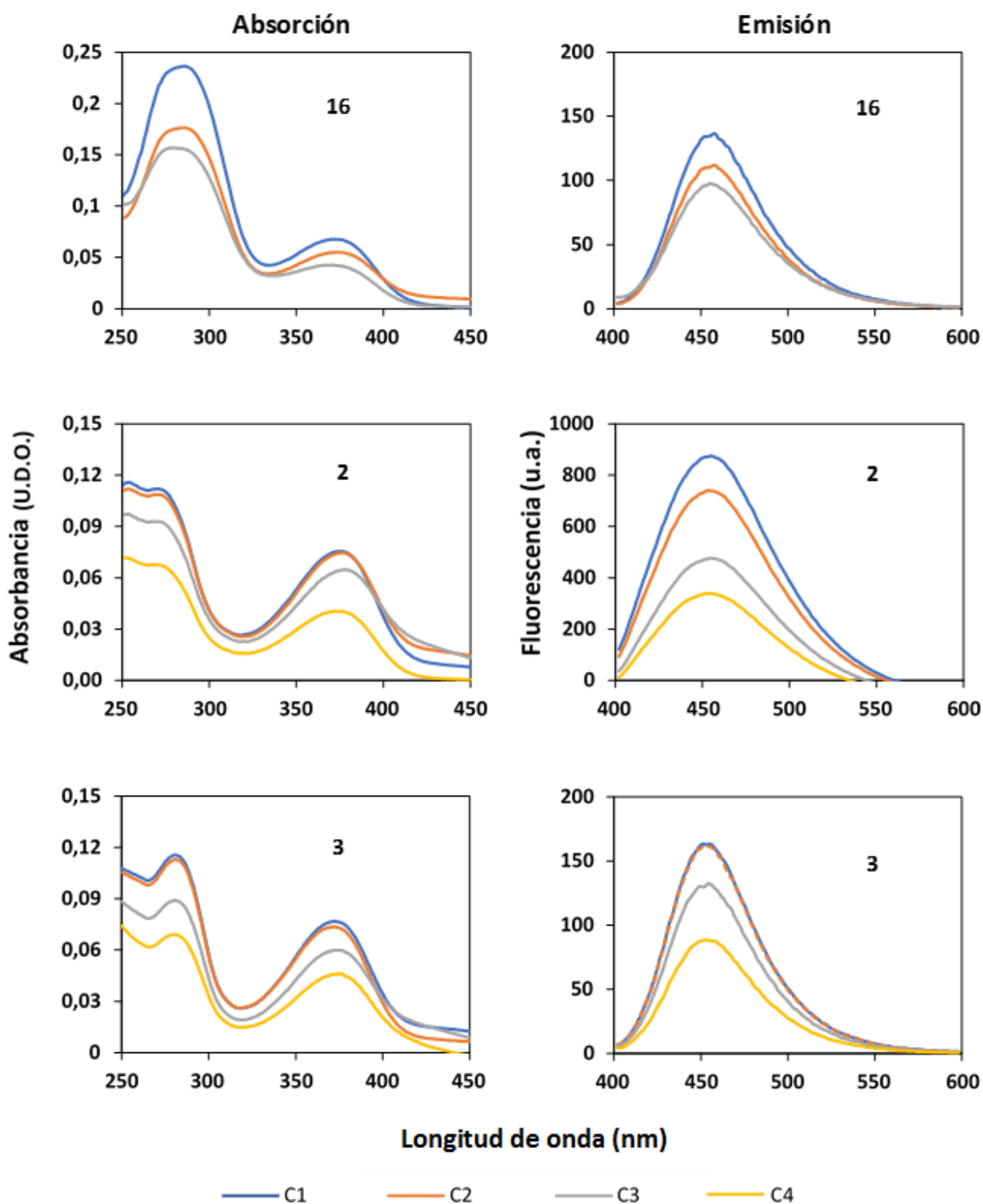


Figura 43. Espectros de absorción (izquierda) y de emisión (derecha) de los compuestos 16, 2, y 3 para una ventana espectral de 5. Los espectros de emisión se han registrado excitando la muestra a 350 nm y recogiendo la radiación emitida entre 400 nm y 600 nm

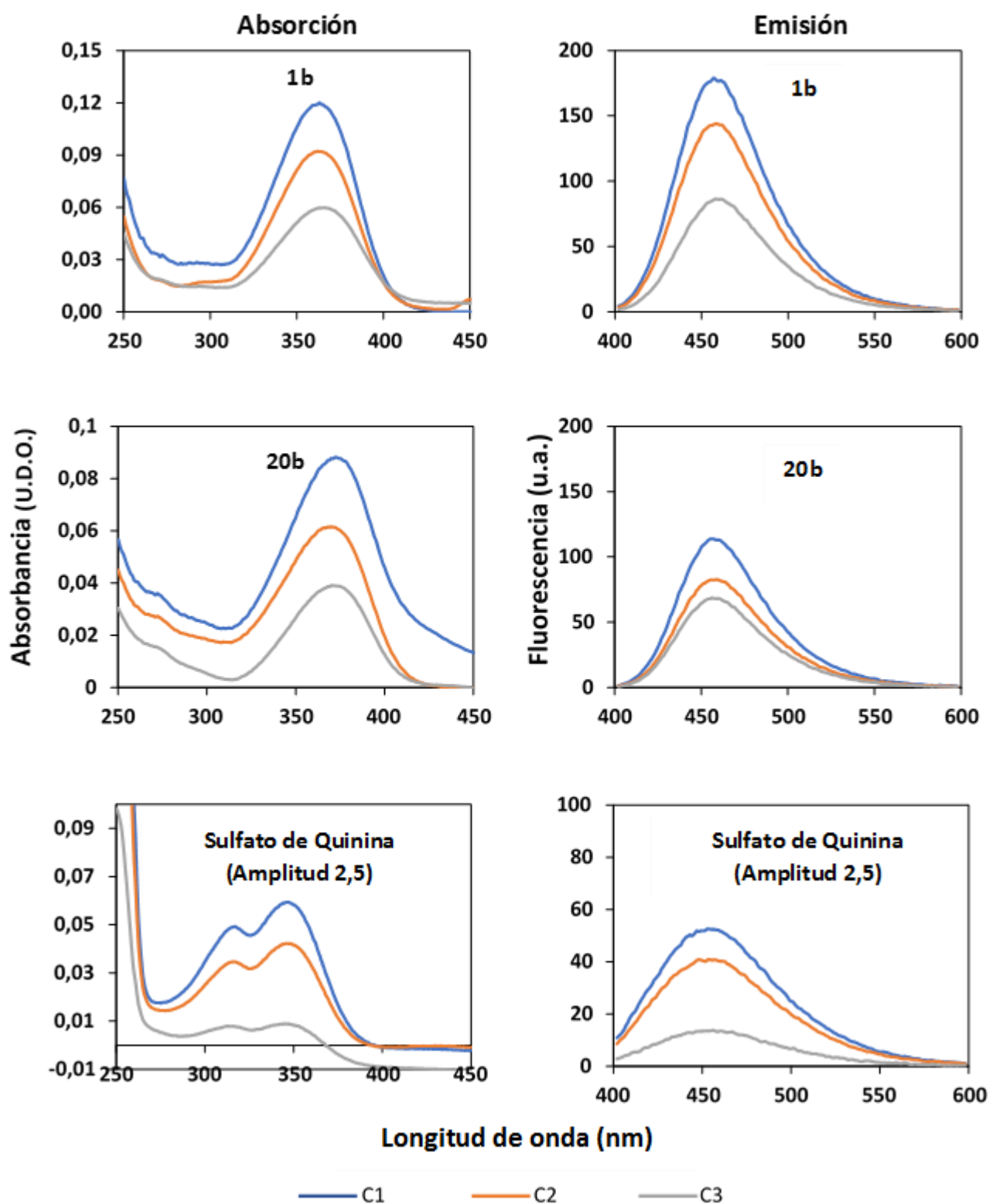


Figura 44. Espectros de absorción (izquierda) y de emisión (derecha) del patrón sulfato de Quinina y los compuestos 1b y 20b para una ventana espectral de 2,5. Los espectros de emisión se han registrado excitando la muestra a 350 nm y recogiendo la radiación emitida entre 400 nm y 600 nm.

Tabla 3. Disoluciones utilizadas para la obtención de los rendimientos cuánticos. Concentraciones molares, absorbancias a 350 nm y valores de la integral entre 400 nm y 600 nm del espectro de emisión excitando a 350 nm.

Compuesto	Disolución	Concentración (M)	Absorbancia ₃₅₀	∫Fluorescencia
Sulfato de quinina (2,5)	C1	$1,0 \cdot 10^{-5}$	0,0584	4602
	C2	$6,3 \cdot 10^{-6}$	0,0418	3610
	C3	$2,5 \cdot 10^{-6}$	0,0084	1206
1b	C1	$6,3 \cdot 10^{-6}$	0,1224	12003
	C2	$3,8 \cdot 10^{-6}$	0,0816	8582
	C3	$2,5 \cdot 10^{-6}$	0,0514	5811
20b	C1	$3,0 \cdot 10^{-6}$	0,0651	7470
	C2	$2,6 \cdot 10^{-6}$	0,0487	5476
	C3	$1,8 \cdot 10^{-6}$	0,0382	4490
Sulfato de quinina (5)	C1	$6,3 \cdot 10^{-6}$	0,0372	68418
	C2	$5,0 \cdot 10^{-6}$	0,0304	56614
	C3	$3,8 \cdot 10^{-6}$	0,0203	33488
	C4	$2,5 \cdot 10^{-6}$	0,0123	21388
5	C1	$3,5 \cdot 10^{-6}$	0,0531	8973
	C2	$3,0 \cdot 10^{-6}$	0,0510	8583
	C3	$2,6 \cdot 10^{-6}$	0,0435	7046
	C4	$1,8 \cdot 10^{-6}$	0,0294	4762
3	C1	$3,5 \cdot 10^{-6}$	0,0559	10706
	C2	$3,0 \cdot 10^{-6}$	0,0547	10565
	C3	$2,6 \cdot 10^{-6}$	0,0425	8621
	C4	$1,8 \cdot 10^{-6}$	0,0319	5833
2	C1	$3,5 \cdot 10^{-6}$	0,0503	13671
	C2	$3,0 \cdot 10^{-6}$	0,0533	14260
	C3	$1,8 \cdot 10^{-6}$	0,0273	7440
16	C1	$3,5 \cdot 10^{-6}$	0,0528	8998
	C2	$2,6 \cdot 10^{-6}$	0,0423	7394
	C3	$1,8 \cdot 10^{-6}$	0,0363	6740

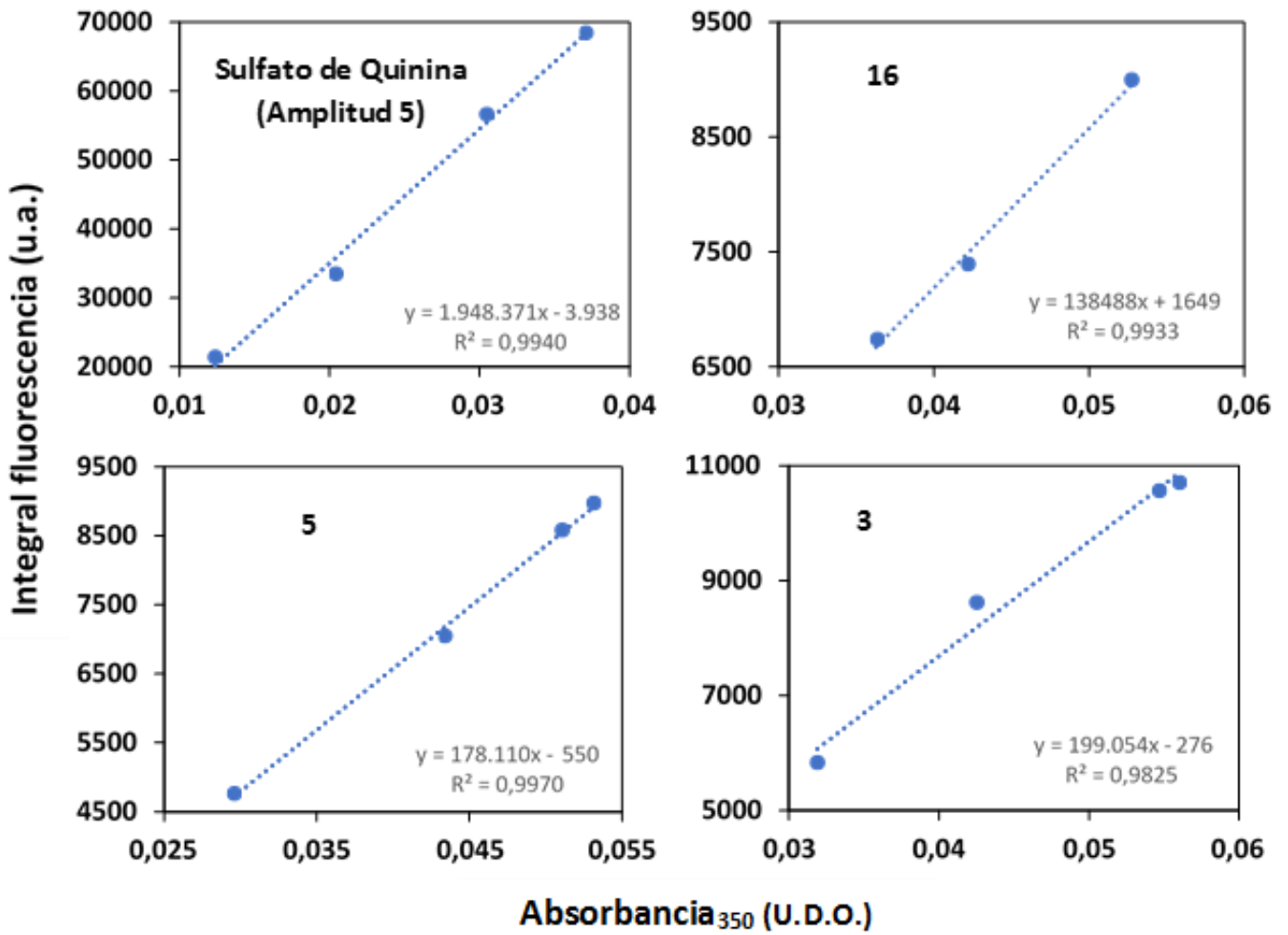


Figura 45. Representaciones y ajustes lineales de la integral de fluorescencia frente a la absorbancia a 350 nm para el patrón Sulfato de Quinina con una amplitud de ventana de 5 y los compuestos 16, 5 y 3

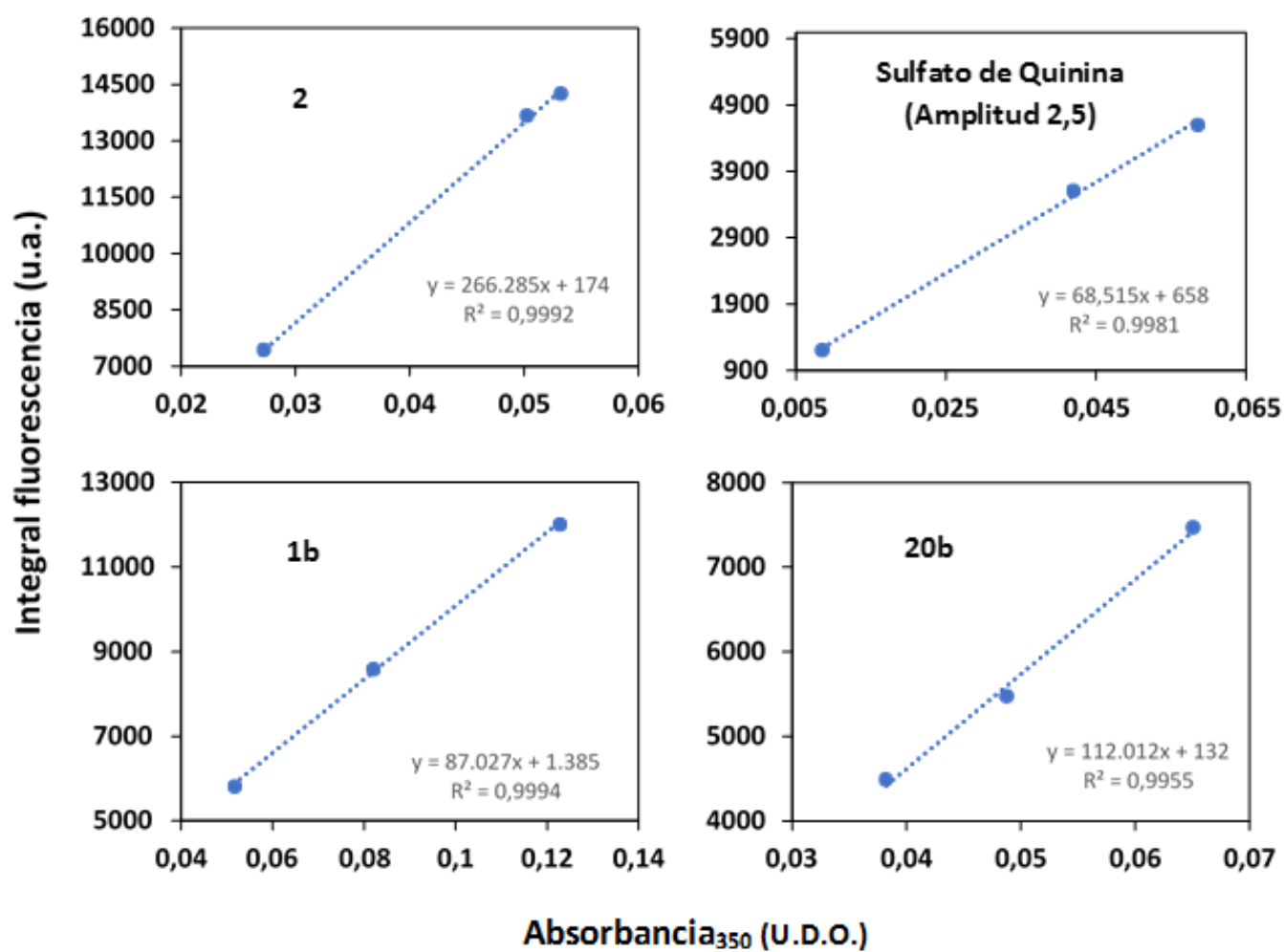


Figura 46. Representaciones y ajustes lineales de la integral de fluorescencia frente a la absorbancia a 350 nm para el patrón Sulfato de Quinina y los compuestos **1b** y **20b** para una amplitud de ventana de 2,5 y el compuesto **2** para una amplitud de ventana espectral de 5.

